

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ COVID-19 В ФОРМАТЕ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А. К. Шуряева¹, Т. В. Малова¹, Е. Е. Давыдова², Ю. А. Савочкина¹, Е. В. Богословская¹, Р. Р. Минтаев^{1,2}, Г. М. Цыганова¹, Е. Е. Шивлягина¹, А. Ш. Ибрагимова¹, А. О. Носова¹, Г. А. Шипулин¹, С. М. Юдин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение "Центр стратегического планирования" Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской академии наук, Москва, Россия

В конце декабря 2019 года в городе Ухань, Китай, возникла вспышка неизвестного коронавируса, позднее идентифицированного как SARS-CoV-2. Вирус вызывает опасное респираторное коронавирусное заболевание человека - COVID-19. Цель. Для выявления случаев заболевания и предотвращения его распространения на территории Российской Федерации необходимо создание эффективной диагностической тест-системы. Материалы и методы. На основании анализа выравнивания нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2 были выбраны праймеры и зонд для ОТ-ПЦР, оптимизированы условия проведения анализа. Результаты. В кратчайшие сроки разработана и зарегистрирована диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в мазках со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки, мокроте и фекалиях. Высокая специфичность системы показана на репрезентативной выборке генетического материала вирусного и бактериального происхождения, аналитическая чувствительность составила 1×10^3 ГЭ/мл в мазках со слизистой носоглотки и ротоглотки и мокроте, 5×10^4 ГЭ/мл в образцах фекалий. Диагностические показатели (чувствительность и специфичность), установленные при клинических испытаниях на образцах, полученных от пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19, от пациентов с иной этиологией заболевания и клинически здоровых людей, составили 100% (диапазон 94,2–100 % с доверительной вероятностью 95 %).

Ключевые слова: коронавирус, молекулярная диагностика, SARS-CoV-2, COVID-19, SARS-COV-2, ОТ-ПЦР в реальном времени, диагностика инфекционных заболеваний

Финансирование: исследование проведено за счет собственных средств ФГБУ "ЦСП" ФМБА России.

Статья получена: 15.07.2020 **Статья принята к печати:** 13.08.2020 **Опубликована онлайн:** 19.08.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.011

DEVELOPMENT OF THE KIT FOR DIAGNOSTICS OF COVID-19 BY REAL TIME RT-PCR

Shuryaeva AK¹, Malova TV¹, Davydova EE², Savochkina YuA¹, Bogoslovskaya EV¹, Mintaev RR^{1,2}, Tsyganova GM¹, Shivlyagina EE¹, Ibragimova ASH¹, Nosova AO¹, Shipulin GA¹, Yudin SM¹

¹ Federal State Budgetary Institution "Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks" of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Late in December 2019, an outbreak of an unknown coronavirus, later identified as SARS-CoV-2, emerged in the city of Wuhan, China. It causes a dangerous respiratory coronavirus disease in humans — COVID-19. Objective. To detect cases of the disease and prevent its spread across the Russian Federation it is necessary to create an effective diagnostic test system. Material and methods. Based on the analysis of the alignment of the SARS-CoV-2 nucleotide sequences, primers and a probe for RT-PCR were selected, and the analysis conditions were optimized. Results. The diagnostic system was developed and registered in the shortest possible time in real-time RT-PCR format for detecting SARS-CoV-2 coronavirus RNA in smears from the nasopharynx and oropharynx, sputum and feces. The high specificity of the system was verified on a representative set of viruses and microorganisms, the analytical sensitivity was 1×10^3 copies / ml in smears from the mucous membrane of the nasopharynx and oropharynx and sputum, 5×10^4 copies / ml in fecal samples. Diagnostic sensitivity and specificity established during clinical trials on samples from patients with confirmed COVID-19 infection, from patients with a different etiology of a disease and clinically healthy people were to 100% (range 94.2-100% with a confidence level of 95%).

Keywords: coronavirus, molecular diagnostics, COVID-19, SARS-CoV-2, SARS-COV-2, real-time RT-PCR, diagnosis of infectious diseases

Funding: the study received funding from the Strategic Planning Center, Federal State Budgetary Institution under the Federal Medical-Biological Agency of Russia

Received: 15.07.2020 **Accepted:** 13.08.2020 **Published online:** 19.08.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.011

Вирус SARS-CoV-2 — новый штамм коронавируса, выявленный в конце 2019 года во время вспышки пневмонии в Китае [1, 2, 3]. Он вызывает опасное респираторное коронавирусное заболевание человека — COVID-19. В тяжёлой форме COVID-19 осложняется пневмонией с острой дыхательной недостаточностью, которая обуславливает высокий уровень смертности.

SARS-CoV-2 является одноцепочечным РНК-вирусом, относится к роду бета-коронавирусов, генетически близок к SARS [4, 5, 6]. На сегодняшний день клиническое значение имеют бета-коронавирусы OC43, HKU1, SARS, MERS и SARS-CoV-2 и альфа-коронавирусы 229E и NL63 [2, 5, 7].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила COVID-19 чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (PHEIC), а затем в марте 2020 года была объявлена пандемия [6]. Уровень распространения болезни в мире расценивается как очень высокий. Число случаев заболевания, в том числе со смертельными исходами, а также число затронутых стран неуклонно растёт, в связи с чем правительства разных стран принимают беспрецедентные меры для предотвращения распространения данного вируса. По данным на 30 июня 2020г. в мире зарегистрировано 10 360 882 случаев заражения коронавирусом SARS-CoV-2,

507 014 из них закончились летальным исходом. Россия по количеству случаев заражения находится на третьем месте (первое и второе — США и Бразилия соответственно), число зарегистрированных случаев на 30.06.20—646 929, с летальным исходом — 9 306 [8].

Для своевременного выявления заболевания и предотвращения его дальнейшего распространения на территории Российской Федерации возникла острая необходимость в создании в кратчайшие сроки диагностической системы для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологических образцах с высокой чувствительностью и специфичностью, что стало целью данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На момент начала разработки тест-системы 19.01.20 в базе данных GISAID были размещены нуклеотидные последовательности 8 полноразмерных геномов вируса SARS-CoV-2 (ранее CoV Wuhan), имеющих незначительные генетические различия: (BetaCoV/Nonthaburi/74/2020|EPI_ISL_403963-crop, BetaCoV/Nonthaburi/61/2020|EPI_ISL_403962, BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019|EPI_ISL_402119, BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-04/2020|EPI_ISL_402120, BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-05/2019|EPI_ISL_402121, BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019|EPI_ISL_402123, BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019|EPI_ISL_402124, BetaCoV/Wuhan-Hu-1/2019|EPI_ISL_402125 и короткий фрагмент BetaCoV/Kanagawa/1/2020|EPI_ISL_402126). Для выравнивания геномов нового коронавируса SARS-CoV-2 и геномов других коронавирусов использовали программу Mega X, алгоритм Clustal W. Для выбора диагностических праймеров и зонда был определен участок генома в области гена РНК-зависимой РНК полимеразы коронавируса, RdRp, позиция 15643-15778 по последовательности MN985325. Данный участок был консервативен для всех известных на момент разработки геномов SARS-CoV-2 и имел значимые нуклеотидные отличия от последовательностей геномов других близкородственных коронавирусов, включая SARS-CoV.

Дизайн праймеров и зонда проводили в соответствии со стандартными требованиями к выбору олигонуклеотидных праймеров и TaqMan зондов [9, 10], были использованы онлайн-ресурсы Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [11] и OligoAnalyzer Tool [12], термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичные структуры оценивали с помощью онлайн-сервиса The mfold Web Server [13]. В качестве флуорофоров для зондов были использованы 6-Карбоксиродамин (R6G) в сочетании с гасителем флуоресценции black-hole quencher 1 (BHQ1) и Карбоксифлуоресцеин (FAM) в сочетании с гасителем флуоресценции BHQ1. Синтез праймеров и зондов проводила АО Гентерра.

Разрабатываемый набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, «АмплиТест SARS-CoV-2», предназначен для проведения всех этапов исследования: экстракции РНК вируса из образцов, обратной транскрипции и ПЦР. Учитывая особенности течения заболевания при заражении новым вирусом SARS-CoV-2, характеризующимся как поражением респираторного тракта, так и, в отдельных случаях, кишечными симптомами, в качестве материала для исследования использовали три вида клинического материала: мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки, мокроту и фекалии.

Для оценки эффективности всех стадий исследования использовали контрольные образцы. Внутренний

контрольный образец (ВКО) представляет собой искусственно синтезированную рекомбинантную последовательность РНК, длиной около 500 п.о., заключенную в оболочку ms2-фага [14, 15]. ВКО добывается на этапе экстракции РНК во все исследуемые образцы, что позволяет контролировать успешность прохождения этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификации. Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой рекомбинантную РНК, содержащую целевой участок генома коронавируса SARS-CoV-2 протяженностью ~500 п.о., в оболочке бактериофага ms2 [14, 15]. Контрольный образец ПКО вводится на этапе экстракции нуклеиновых кислот как отдельный образец. Концентрации препаратов ВКО и ПКО измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Отсутствие остаточной ДНК в препаратах ВКО и ПКО подтверждали с помощью постановки ПЦР без стадии обратной транскрипции.

Пробоподготовку образцов клинического материала (мазков и мокроты) проводили в соответствии с опубликованными клиническими рекомендациями [16]. Подготовка образцов фекалий была несколько модифицирована, осветленный экстракт готовили, тщательно ресуспендируя 0,1 г (0,1 мл) фекалий в 0,9 мл фосфатном буфере. Центрифугировали 5 мин при 7000 g («MiniSpin», Eppendorf), отбирали верхнюю фазу.

Для экстракции нуклеиновых кислот применяли обработку гуанидинизотиоцианатом при 65°C с последующей преципитацией изопропанолом тотальной ДНК/РНК в присутствии соосадителя гликогена. После отмывки осадка от примесей и солей растворяли его в ТЕ-буфере, содержащем 0,02 мг/мл полиаденината калия.

Обратную транскрипцию и ПЦР проводили в один этап (one step). Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 25 мкл РНК-пробы, по 0,6 мМ каждого праймера (АО Гентерра, Россия), 0,3 мМ каждого зонда (АО Гентерра, Россия), 0,5 мМ каждого дНТФ (Биосан, Россия), 1 мкл TaqF полимеразы (АО Гентерра, Россия), 0,5 мкл ТМ-ревертазы (Mmlv) (АО Гентерра, Россия), Random-праймеры — 0,15 мМ (АО Гентерра, Россия), polyA — 0,01 мг/мл (АО Гентерра, Россия), азид натрия 0,05 % («Sigma-Aldrich», США), трис-HCl-буфер (pH 8,3) с концентрацией трис (оксиметил)-аминометана 70 мМ («Sigma-Aldrich», США), магния хлорид — не более 5 мМ («Sigma-Aldrich», США), калия хлорид — не более 80 мМ («Sigma-Aldrich», США), стабилизатор ферментов — не более 0,2 мг/мл (АО Гентерра, Россия), стерильная H₂O — до 25 мкл.

ОТ-ПЦР проводили в мультиплексном формате, сигнал накопления флуоресценции ВКО регистрировали по каналу для флуорофора FAM, сигнал накопления флуоресценции при амплификации целевой НК коронавируса SARS-CoV-2 детектировали по каналу для флуорофора HEX.

Программа амплификации включала следующие стадии термоциклирования: 50°C — 30 мин; 95°C — 15 мин; следующие стадии повторялись 45 циклов — 95°C — 15 с, 60°C — 30 с, 72°C — 15 с. Детекцию проводили при 60°C по каналам для флуорофоров FAM/HEX. Время проведения ОТ-ПЦР — около 2 часов. Результат оценивали пороговым методом, определяя Ct по пересечению кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на середине экспоненциального участка графика прироста флуоресценции в логарифмическом масштабе. Результаты амплификации интерпретировали как положительные,

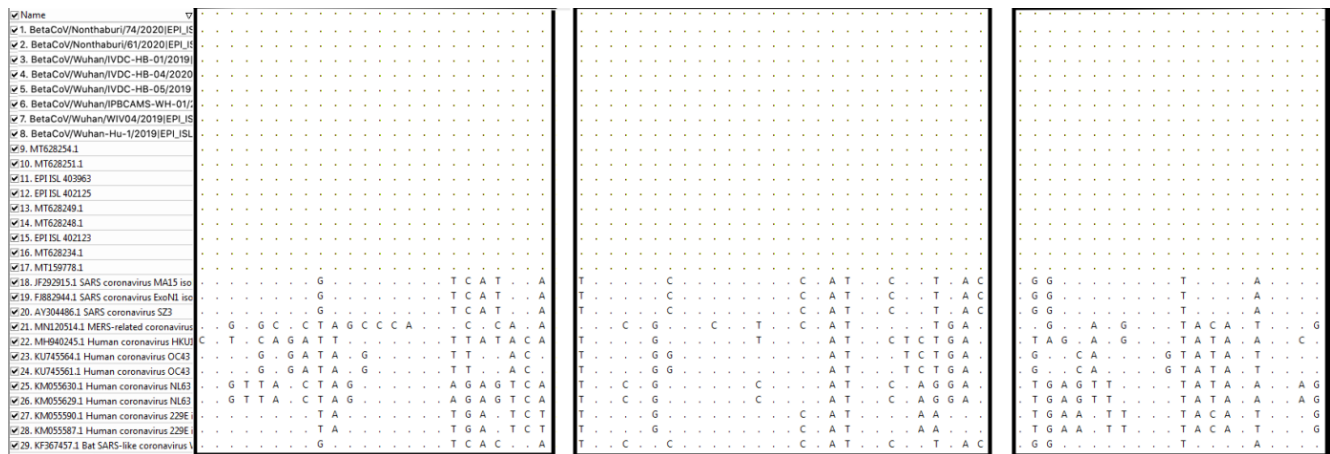


Рисунок. Выравнивание последовательностей геномов коронавирусов SARS-CoV-2, OC43, HKU1, SARS, MERS, 229E и NL63 в области конструирования праймеров и зонда

если наблюдали пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Аналитическую специфичность ОТ-ПЦР с выбранными праймерами и зондом оценивали в исследовании РНК штаммов коронавируса Human coronavirus 229E (ATCC® RV-740TM), Betacoronavirus 1 OC43 (ATCC® VR-1558™), вируса гриппа А (H1N1) (ATCC® VR-1469), вируса гриппа А (H3N2) (ATCC® VR-776) и вируса гриппа В (Victoria Lineage) (ATCC® VR-1930) из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США), HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NL63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV (European Virus Archive Global 011N-03868 — Coronavirus RNA specificity panel), ДНК штаммов Streptococcus pneumoniae (№ 131116), Streptococcus pyogenes (№ 130001), Haemophilus influenza (№ 151221), Staphylococcus aureus (№ 201108), Klebsiella pneumoniae (№ 180129) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в концентрации не менее 1×10^6 геномных эквивалентов в 1 мл (ГЭ/мл).

Аналитическую чувствительность (предел обнаружения) оценивали на модельных образцах биологического материала (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота, фекалий) с добавлением разведений стандартного образца — защищенной рекомбинантной РНК, содержащей целевой участок генома коронавируса SARS-CoV-2, в оболочке бактериофага ms2. Использовали следующие разведения: 1×10^4 , 5×10^3 , 2×10^3 , 1×10^3 , 5×10^2 и 1×10^2 ГЭ/мл. Каждое разведение тестировалось для 3 образцов каждого материала, в двух повторах. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторах.

Диагностические показатели оценивали при анализе всех видов клинического материала (мазки из ротоглотки и носоглотки, мокрота, фекалии), предварительно

охарактеризованного как содержащий или не содержащий коронавирус SARS-CoV-2, а также материала, полученного от здоровых людей и пациентов с иной этиологией заболевания, контаминированного стандартным образцом в концентрации не менее 10^3 ГЭ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве мишени для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 был выбран ген РНК-зависимой РНК полимеразы, RdRP, на рисунок приведено выравнивание разных последовательностей коронавируса SARS-CoV-2 и других коронавирусов на участке отжига праймеров и зонда. Нуклеотидные последовательности в данной области известных на момент разработки геномов коронавируса SARS-CoV-2 полностью идентичны и имели множество различий с геномами других близкородственных коронавирусов, что обеспечивает высокую специфичность выбранных праймеров для амплификации РНК коронавируса SARS-CoV-2 (рисунок).

Диагностический набор разрабатывался в условиях отсутствия клинического материала в Российской Федерации (не было зарегистрировано ни одного случая заболевания COVID-19), поэтому первоначально был синтезирован участок генома коронавируса в области гена RdRp протяженностью ~500 п.о. Целевой фрагмент коронавируса был клонирован в плазмидную конструкцию, позволяющую получить рекомбинантную РНК, содержащую целевой участок генома коронавируса SARS-CoV-2, в оболочке бактериофага ms2 [14, 15]. Данная рекомбинантная РНК в белковой оболочке использовалась в качестве ПКО в составе диагностического набора, что позволяло оценить эффективность всех этапов исследования.

Оптимизация набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2» произведена на зарегистрированных в Российской

Таблица 1. Результаты повторных клинических испытаний (оценка диагностической чувствительности и специфичности) набора реагентов

Тип образцов	Всего исследовано образцов	Результаты применения набора реагентов	
		Положительных	отрицательных
Мазки из носо- и ротоглотки	113	50	0
		0	63
Мокрота	103	50	0
		0	53
Фекалии	100	50	0
		0	50

Таблица 2. Результаты множественного выравнивания 50386 известных последовательностей генома коронавируса SARS-CoV-2, представленных в базе данных GISAID в областях выбранных праймеров и зонда. В столбцах указано: 1 — порядковый номер нуклеотида по референсной последовательности MN985325, 2–5 выявленные полиморфизмы среди проанализированных последовательностей в данном положении, 6 — количество последовательностей геномов SARS-CoV-2 в базе данных GISAID, не имеющих отличия в конкретной позиции с MN985325, 7 — количество последовательностей геномов SARS-CoV-2 GISAID, имеющих отличие в конкретной позиции, 8 — количество последовательностей геномов SARS-CoV-2 GISAID, в которых в конкретной позиции нуклеотид не установлен

sum.count GISAID=50386; ref MN985325					Кол-во GISAID seq со- впадающих с MN985325	Кол-во GISAID seq с отличиями от MN985325	Кол-во GISAID seq, для которых отсутствует достоверное прочтение
Нуклеотидная последовательность по MN985325	Полиморфизмы						
	A	T	G	C			
1	2	3	4	5	6	7	8
Область прямого праймера							
15643	50359	0	0	0	50359	0	28
15644	2	0	50356	0	50356	2	29
15645	50361	0	0	0	50361	0	26
15646	50358	2	1	0	50358	3	26
15647	50358	0	1	1	50358	2	27
15648	0	50361	0	0	50361	0	26
15649	50370	0	0	0	50370	0	17
15650	0	0	50377	0	50377	0	10
15651	50380	0	0	0	50380	0	7
15652	2	0	50380	0	50380	2	5
15653	50376	0	5	0	50376	5	6
15654	0	50377	0	4	50377	4	6
15655	0	1	50378	0	50378	1	8
15656	0	50379	0	0	50379	0	8
15657	0	50379	0	0	50379	0	8
15658	0	2	50375	0	50375	2	10
15659	50380	0	0	0	50380	0	7
15660	0	16	0	50361	50361	16	10
15661	50378	0	0	0	50378	0	9
15662	0	7	0	50367	50367	7	13
15663	50374	0	3	0	50374	3	10
15664	0	0	50374	0	50374	0	13
15665	50377	0	0	0	50377	0	10
15666	0	0	0	50376	50376	0	11
Область зонда							
15726	0	55	0	50317	50317	55	15
15727	0	0	50379	0	50379	0	8
15728	50381	0	0	0	50381	0	6
15729	0	50381	0	0	50381	0	6
15730	0	0	50381	0	50381	0	6
15731	0	0	0	50381	50381	0	6
15732	0	50381	0	0	50381	0	6
15733	1	0	50379	0	50379	1	7
15734	0	50379	0	0	50379	0	8
15735	0	50378	0	0	50378	0	9
15736	0	0	50379	0	50379	0	8
15737	0	50379	0	0	50379	0	8
15738	0	6	50373	0	50373	6	8
15739	0	50379	0	0	50379	0	8
15740	0	0	50378	0	50378	0	9
15741	0	50379	0	0	50379	0	8
15742	0	50379	0	0	50379	0	8
15743	0	50378	0	0	50378	0	9

15744	0	26	0	50340	50340	26	21
15745	50379	0	0	0	50379	0	8
15746	50379	0	0	0	50379	0	8
15747	0	50379	0	0	50379	0	8
15748	50378	0	0	0	50378	0	9
15749	1	0	50376	0	50376	1	10
15750	0	0	0	50377	50377	0	10
15751	50377	0	0	0	50377	0	10
15752	0	0	0	50377	50377	0	10
15753	0	50376	0	0	50376	0	11
Область обратного праймера (комплементарная)							
15758	0	13	0	50361	50361	13	13
15759	50370	0	2	0	50370	2	15
15760	0	50371	0	0	50371	0	16
15761	1	1	0	50369	50369	2	16
15762	0	50370	0	1	50370	1	16
15763	0	0	0	50371	50360	0	16
15764	50370	1	0	0	50371	1	16
15765	50371	0	0	0	50371	0	16
15766	45	1	50325	0	50325	46	16
15767	0	0	50371	0	50371	0	16
15768	0	50371	0	0	50371	0	16
15769	0	10	0	50360	50360	10	17
15770	0	50370	0	0	50370	0	17
15771	50370	0	0	1	50370	1	16
15772	0	2	50368	0	50368	2	17
15773	1	50368	0	0	50368	1	18
15774	0	1	50371	0	50371	1	15
15775	1	1	50362	0	50362	2	23
15776	0	0	0	50371	50371	0	16
15777	0	50344	0	0	50344	0	43
15778	50366	0	0	0	50366	0	21

Федерации в качестве медицинских изделий приборах ПЦР-диагностики — Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Сингапур), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).

Оценка специфичности на генетическом материале других вирусов, а также бактерий, не выявила перекрестных реакций, набор реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2» показал 100 % аналитическую специфичность. Контроль аналитической чувствительности (предела обнаружения) набора реагентов проводили на модельных образцах биологического материала, контаминированных стандартным образцом рекомбинантного бактериофага ms2, содержащего фрагмент генома SARS-CoV-2. Для мазков со слизистой носоглотки и ротоглотки, а также мокроты предел обнаружения генома SARS-CoV-2 составил 1×10^3 ГЭ/мл, для фекалий — 5×10^4 ГЭ/мл.

Диагностическую чувствительность и специфичность оценивали на выборке из 115 модельных образцов различного биологического материала (мазки из ротоглотки и носоглотки, мокрота, фекалии), контаминированной стандартным образцом до концентрации не менее 10^3 ГЭ/мл, а также на 195 пробах биологического материала, полученного от здоровых людей и пациентов с иной патологией заболевания. В дальнейшем при распространении

коронавирусной инфекции в РФ клинические испытания были проведены повторно, исследовали 150 образцов мазков из носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий, содержащих вирус SARS-CoV-2, полученных от пациентов с установленной инфекцией COVID-19, а также 166 образцов биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий), не содержащих РНК SARS-CoV-2 (табл. 1). Диагностические показатели (чувствительность и специфичность) составили 100% (диапазон 94,2-100 % с доверительной вероятностью 95%). Таким образом, при оценке диагностической чувствительности и специфичности на пробах от пациентов ложноположительных и ложноотрицательных случаев не было выявлено.

Известна высокая способность коронавирусов к приобретению новых мутаций [17]. Мутации в областях генома SARS-CoV-2, комплементарных праймерам и зонду, могут привести к ложноотрицательным результатам или снизить чувствительность выявления клинических изолятов с нуклеотидными заменами. Для оценки накопления мутаций в областях праймеров и зонда было проведено их сравнение с последовательностями изолятов коронавируса SARS-CoV-2, опубликованными в базе данных GISAID (множественное выравнивание 50386 последовательностей с помощью алгоритма MAFFT доступно в базе GISAID на 30 июня 2020).

Результаты наличия нуклеотидных полиморфизмов в областях праймеров и зонда по данным выравнивания известных на 30.06.2020 последовательностей геномов SARS-CoV-2 приведены в таблице 2 (табл. 2).

Для прямого праймера из известных 50386 последовательностей выявлены 45 (не более 0,1% от общего количества), имеющих единичные полиморфизмы (48 нуклеотидных отличий), замены локализованы в центральной области олигонуклеотида (в основном одна замена на праймер) и не являются критическими.

Выявлены 80 последовательностей (из 50386), имеющих по одному полиморфизму в области обратного праймера, из них 13 последовательностей имеют замену G/A на 3' конце (замена приводит к образованию C/A эффективного неканонического взаимодействия [18]).

Выявлены также 82 последовательности с полиморфизмами в области зонда, C/T замены.

Все выявленные полиморфизмы принадлежат изолятам SARS-CoV-2, выделенных по всему миру, преимущественно в США, Австралии, Англии, Нидерландах, Швейцарии, Китае. При анализе известных 237 отечественных изолятов, расположенных в GISAID в областях прямого и обратного праймеров нуклеотидные отличия не выявлены. Один отечественный изолят (hCoV-19/Russia/StPetersburg-R118955S/2020[EPI_ISL_450]) имеет нуклеотидное отличие G/A в области зонда, однако данная замена не является критической, так как обеспечивает достаточно устойчивое неканоническое C/A взаимодействие зонда с матрицей [18], и находится близко к 3'-концу зонда.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии критических для ПЦР диагностики нуклеотидных различий в областях праймеров и зондов для всех известных изолятов SARS-CoV-2 (низкая распространённость полиморфизмов, не более одной-двух замен для одного изолята, образование устойчивых неканонических пар).

Таким образом, анализ геномов всех известных изолятов SARS-CoV-2 показал на сегодняшний день высокую надежность разработанного ПЦР набора «АмплиТест SARS-CoV-2», обеспечивающую выявление РНК коронавируса в подавляющем большинстве случаев.

Однако, необходимо отметить, что высокая изменчивость геномов коронавируса предполагает необходимость постоянного мониторинга накопления мутаций в областях праймеров и зонда у новых изолятов, с целью внесения при необходимости изменений в последовательности используемых олигонуклеотидов для сохранения высокой чувствительности диагностикума.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ФГБУ «ЦСП» ФМБА России был разработан набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ОТ-ПЦР в реальном времени «АмплиТест SARS-CoV-2», набор содержит контроли всех этапов исследования. На момент разработки тест-системы в России не было зарегистрировано ни одного набора реагентов для выявления РНК нового коронавируса. Набор был зарегистрирован как изделие медицинского назначения 06.03.20, регистрационное удостоверение №РЗН 2020/9765, 30.06.20 внесены изменения в регистрационные документы.

В рамках проведенных технических и клинико-лабораторных испытаний, а также практике использования в клинических исследованиях, набор реагентов продемонстрировал высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности, что делает его использование перспективным для своевременного выявления заболевания COVID-19. На сегодняшний день набор активно используется на территории Российской Федерации.

Литература

1. Bogoch I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel // *Journal of travel medicine*. 2020. Vol. 27. №. 2. P.1–3.
2. Hui D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China // *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. Vol. 91. P. 264–266.
3. Rothan H. A., Byrareddy S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak // *Journal of Autoimmunity*. – 2020. P. 1–4.
4. Chan J. F. W. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease // *Clinical microbiology reviews*. 2015. Vol. 28. №. 2. P. 465–522.
5. Elfiky A. A., Mahdy S. M., Elshemey W. M. Quantitative structure activity relationship and molecular docking revealed a potency of anti-hepatitis C virus drugs against human corona viruses // *Journal of medical virology*. 2017. Vol. 89. №. 6. P. 1040–1047.
6. Ibrahim I. M. et al. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction // *Journal of Infection*. 2020. Vol. 80. №. 5. P. 554–562.
7. WHO: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) — The Kingdom of Saudi Arabia Retrieved. 24 February 2020. URL: <https://www.who.int/csr/don/24-february-2020-mers-saudi-arabia/en/>
8. John Hopkins University. Coronavirus Resource Center. [Электронный ресурс] URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Дата обращения: 30.06.2020.
9. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. — Springer Science & Business Media, 2008.
10. Yuryev A. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.
11. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic. Acids Res.* 2007. URL: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
12. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. URL: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
13. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). URL: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.
14. Cheng Y, Niu J, Zhang Y, Huang J, Li Q. Preparation of his-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3557–62.
15. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, Du Bois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards // *J Clin Microbiol*. 1998;36(12):3590–4.
16. Jatsyshina S. B. et al. Laboratory diagnosis of influenza and other acute respiratory viral infections by polymerase chain reaction // *Laboratornaya sluzhba*. 2017. Vol. 6. №. 3. P. 238–267.
17. Sanchez, C. M., F. Gebauer, C. Sune, A. et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses // *Virology*. – 1992. P. 92–105.
18. Hatim T. Allawi and John SantaLucia, Jr. Nearest-Neighbor Thermodynamics of Internal A,C Mismatches in DNA: Sequence Dependence and pH Effects // *Biochemistry*. 1998. 37. 9435–9444.

References

1. Bogoch I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel // *Journal of travel medicine*. 2020. Vol. 27. №. 2. P.1–3.
2. Hui D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China // *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. Vol. 91. P. 264–266.
3. Rothan H. A., Byrareddy S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak // *Journal of Autoimmunity*. – 2020. P. 1–4.
4. Chan J. F. W. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease // *Clinical microbiology reviews*. 2015. Vol. 28. №. 2. P. 465–522.
5. Elfiky A. A., Mahdy S. M., Elshemey W. M. Quantitative structure activity relationship and molecular docking revealed a potency of anti-hepatitis C virus drugs against human corona viruses // *Journal of medical virology*. 2017. Vol. 89. №. 6. P. 1040–1047.
6. Ibrahim I. M. et al. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction // *Journal of Infection*. 2020. Vol. 80. №. 5. P. 554–562.
7. WHO: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) — The Kingdom of Saudi Arabia Retrieved. 24 February 2020. URL: <https://www.who.int/csr/don/24-february-2020-mers-saudi-arabia/en/>
8. John Hopkins University. Coronavirus Resource Center. [Электронный ресурс] URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Дата обращения: 30.06.2020.
9. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. — Springer Science & Business Media, 2008.
10. Yuryev A. *Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.
11. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic. Acids Res*. 2007. URL: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
12. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. URL: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
13. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). URL: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=rfold/DNA-Folding-Form>.
14. Cheng Y, Niu J, Zhang Y, Huang J, Li Q. Preparation of his-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3557–62.
15. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, Du Bois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards // *J Clin Microbiol*. 1998;36(12):3590–4.
16. Jatsyshina S. B. et al. Laboratory diagnosis of influenza and other acute respiratory viral infections by polymerase chain reaction // *Laboratornaya sluzhba*. 2017. Vol. 6. №. 3. P. 238–267.
17. Sanchez, C. M., F. Gebauer, C. Sune, A. et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses // *Virology*. – 1992. P. 92–105.
18. Hatim T. Allawi and John SantaLucia, Jr. Nearest-Neighbor Thermodynamics of Internal A,C Mismatches in DNA: Sequence Dependence and pH Effects // *Biochemistry*. 1998. 37. 9435–9444.