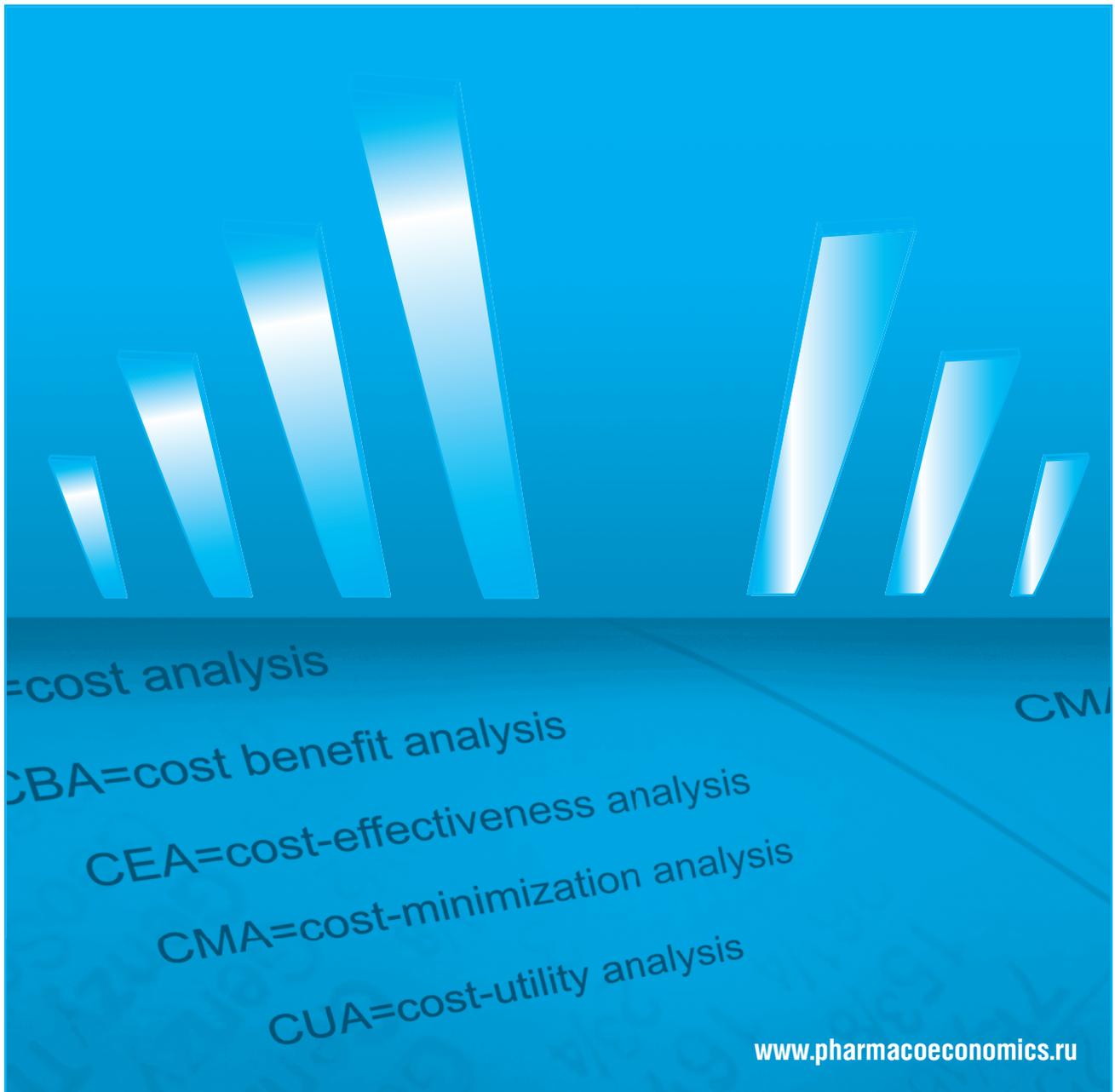


# Фармакоэкономика

Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология



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

## FARMAKOEKONOMIKA

Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology

2022 Vol. 15 No. 2

# №2

Том 15

2022



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

ISSN 2070-4909 (print)

ISSN 2070-4933 (online)

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

Дмитрюкова М.Ю.<sup>1</sup>, Голод А.А.<sup>1</sup>, Сенина М.Е.<sup>1</sup>, Гушин А.Е.<sup>2,3</sup>

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

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

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

Для контактов: Дмитрюкова Марина Юрьевна, e-mail: [m.dmitryukova@nextbio.ru](mailto:m.dmitryukova@nextbio.ru)

## РЕЗЮМЕ

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

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

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

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

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

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

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

## Конфликт интересов

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

## Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

## Для цитирования

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

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

Dmitryukova M.Yu.<sup>1</sup>, Golod A.A.<sup>1</sup>, Senina M.E.<sup>1</sup>, Gushchin A.E.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> NextBio LLC (8 Polimernaya Str., Moscow 111394, Russia)

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

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

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

### SUMMARY

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

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

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

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

### KEYWORDS

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

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

### Conflict of interests

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

### Authors' contribution

The authors contributed equally to this article.

### For citation

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

### Основные моменты

#### Что уже известно об этой теме?

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

#### Что нового дает статья?

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

#### Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

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

### Highlights

#### What is already known about the subject?

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

#### What are the new findings?

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

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

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

## ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

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

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

Кроме того, лабораторная диагностика используется в целях организации противоэпидемиологических мер, в т.ч. тестирования людей, прибывших из мест с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой, контактных лиц, даже не имеющих симптомов заболевания<sup>2</sup>.

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

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

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

## Определение предела обнаружения / Determination of limit detection

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

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

## Определение воспроизводимости и повторяемости / Determination of reproducibility and repeatability

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

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

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

## Клинические испытания / Clinical tests

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

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

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

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

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

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

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

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

## Этические аспекты / Ethical aspects

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

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

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

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

#### Методы статистического анализа / Methods of statistical analysis

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

Расчет клинической чувствительности (Ч) выполняли по формуле:

$$Ч = A / (A + B),$$

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

Расчет клинической специфичности (Сп) проводили по формуле:

$$Сп = D / (D + C),$$

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

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

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

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

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

### Контроль качества / Quality control

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

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

### Автоматическая экстракция нуклеиновых кислот / Automatic extraction of nucleic acids

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

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

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

### Аналитические характеристики / Analytical characteristics

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

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

### Клинические характеристики / Clinical characteristics

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

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

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

## ОБСУЖДЕНИЕ / DISCUSSION

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

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

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

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

Таблица 1. Результаты определения предела обнаружения при тестировании разведения стандартного образца SARS-CoV-2

Table 1. Results of limit detection evaluation during testing the standard SARS-CoV-2 sample

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

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

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

Таблица 2. Повторяемость и воспроизводимость полученных результатов

Table 2. Repeatability and reproducibility of the results

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

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

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

Таблица 3. Диагностическая чувствительность и специфичность набора реагентов «АмплиПрим SARS-CoV-2 DUO» (ООО «НекстБио», Россия)

Table 3. Diagnostic sensitivity and specificity of the AmpliPrime SARS-CoV-2 DUO reagent kit (NextBio LLC, Russia)

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

**Примечание.** ДИ – доверительный интервал.

**Note.** CI – confidence interval.

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

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

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

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

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

В ходе исследования был разработан и апробирован набор реагентов «АмплиПрим SARS-CoV-2 DUO» (ООО «НекстБио», Россия) для выявления коронавируса нового типа. Набор определяет SARS-CoV-2 по двум фрагментам генома, что позволяет повысить надежность анализа. Предел обнаружения составил 250 копий/мл, что достаточно для надежного анализа. Коэффициент вариации при тестировании 120 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 в концентрации 10<sup>4</sup> копий/мл, не превышает 5%.

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

## ЛИТЕРАТУРА:

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

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

## REFERENCES:

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

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

**Сведения об авторах**

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

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

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

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

**About the authors**

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

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

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

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