

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-141-143

УДК 616.98:578.2(575.2)

С.В. Хегай^{1,3}, А.К. Джапарова², Э.М. Дуйшеналиева², Б. Калмырзаев⁴, К.Т. Касымбекова⁴,
Т.Э. Кучук³, Н.Т. Усенбаев⁴, А.Т. Жунушов¹

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика;

²Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций МЗ Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика;

³Научно-производственное объединение «Профилактическая медицина» МЗ Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Министерство здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика

Цель исследования – разработка эффективного метода пулирования проб для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью ПЦР, а также оценка данного подхода с различными тест-системами. **Материалы и методы.** Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводилось в пробах, содержащих образцы мазков из носа людей, помещенных в транспортную среду. Пять образцов объединяли в один пул для выполнения анализа. Оценку эффективности метода пулирования «в одной пробирке» для выполнения массовых исследований на COVID-19 проводили с помощью тест-систем «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG-19» (Россия), «АртТест COVID-19» (Республика Беларусь) и «BioSpeedy» (Турция). **Результаты и обсуждение.** Всего исследовано 587 пулов образцов, составленных из 2935 исследуемых проб, в которых обнаружено и подтверждено методом ПЦР 56 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2. Результаты применения метода пулирования коррелировали с данными, полученными без пулирования образцов. Среднее значение отклонения цикла составляло в среднем 2 C_t, кривая флуоресценции положительных образцов соответствовала «S» форме.

Ключевые слова: COVID-19, РНК SARS-CoV-2, ПЦР-диагностика, пулирование.

Корреспондирующий автор: Хегай Сергей Валерьевич, e-mail: hegay@inbox.ru.

Для цитирования: Хегай С.В., Джапарова А.К., Дуйшеналиева Э.М., Калмырзаев Б., Касымбекова К.Т., Кучук Т.Э., Усенбаев Н.Т., Жунушов А.Т. Молекулярная диагностика коронавирусной инфекции в Кыргызской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:141–143. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-141-143

Поступила 22.05.20. Принята к публ. 28.05.20.

S.V. Kheday^{1,3}, A.K. Dzhaparova², E.M. Dushenalieva², B. Kalmyrzaev⁴, K.T. Kasymbekova⁴,
T.E. Kuchuk³, N.T. Usenbaev⁴, A.T. Zhunushov¹

Molecular Diagnostics of Coronavirus Infection in the Kyrgyz Republic

¹Institute of Biotechnology, National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

²Republican Center for Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

³Scientific and Production Association «Preventive Medicine» of the Ministry of Health, Bishkek, Kyrgyz Republic;

⁴Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic

Abstract. Objective of the study was to develop an effective method of sample pooling for the detection of SARS-CoV-2 coronavirus RNA using PCR and evaluate that approach with various test systems. **Materials and methods.** SARS-CoV-2 coronavirus RNA was detected in samples containing nasal swabs placed in a transport medium. 5 samples were combined into one pool to perform the analysis. The effectiveness of the “in single test tube” pooling method for performing mass studies for COVID-19 was evaluated using the Vector-PCRrv-2019-nCoV-RG-19 test systems, Russia; “ArtTest COVID-19”, Belarus; “BioSpeedy”, Turkey. **Results and discussion.** A total of 587 pools were studied, consisting of 2935 test samples, in which 56 samples containing SARS-CoV-2 RNA were detected and confirmed by PCR. When studying the method of pooling samples, its specificity and optimal sensitivity for detecting SARS-CoV-2 RNA using the Vector-PCRrv-2019-nCoV-RG, ArtTest COVID-19, and BioSpeedy test systems were shown. The results of applying the pooling method correlated with the data obtained without pooling samples. The average deviation of the cycle amounted to 2 C_t; the fluorescence curve of positive samples corresponded to the «S» form.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2 RNA, PCR diagnostics, pooling.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Sergey V. Kheday, e-mail: hegay@inbox.ru.

Citation: Kheday S.V., Dzhaparova A.K., Dushenalieva E.M., Kalmyrzaev B., Kasymbekova K.T., Kuchuk T.E., Usenbaev N.T., Zhunushov A.T. Molecular Diagnostics of Coronavirus Infection in the Kyrgyz Republic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 2:141–143. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-141-143

Received 22.05.20. Accepted 28.05.20.

В декабре 2019 г. в Китайской Народной Республике произошла вспышка атипичной пневмонии, вызванной новым коронавирусом, который позже получил обозначение SARS-CoV-2 [1]. Болезнь бы-

стро распространилась по всему миру и 11 марта 2020 г. ВОЗ заявила о пандемии вирусной пневмонии COVID-19, вызванной новым коронавирусом [2]. Сложившаяся ситуация по распространению

коронавирусной инфекции в мире остается напряженной. На сегодняшний день число заболевших по всему миру превысило 4 млн человек. В Кыргызской Республике на 28 апреля 2020 г. всего выявлено 708 случаев. Важную роль в недопущении распространения инфекции играет повышение эффективности и увеличение объема проводимых лабораторных исследований, обеспечивающих быстрое выявление заболевших [3, 4].

Цель исследования – разработка эффективного метода пулирования проб для выявления коронавируса SARS-CoV-2 с помощью ПЦР и оценка характеристик данного подхода с различными тест-системами.

Материалы и методы

С 5 по 27 апреля 2020 г. на базе лаборатории вирусологии и редких инфекций Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций Кыргызской Республики проведены исследования по внедрению метода пулирования нативных проб от лиц, тестируемых на наличие коронавирусной инфекции. Оценка эффективности разработанного метода на способность выявлять РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью ПЦР проводили на образцах проб, объединенных в один пул. В качестве проб использовали мазки из носа пациентов, помещенные в транспортную среду. Исследовано 2935 образцов, полученных на территории всей республики.

В работе принимали участие специалисты-эксперты по лабораторной диагностике COVID-19 из РЦКиООИ, РНПЦККЛДИБ НПО «ПМ», ИБ НАН КР и МЗ КР.

Для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в пулированных пробах использовались тест-системы: «Вектор-ПЦРv-2019-nCoV-RG» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), «АртТест COVID-19» производства «АртБиотех» (Республика Беларусь) и «BioSpeedy COVID-19 RT-qPCR TespitKiti» производства BioSpeedy (Турция).

Результаты и обсуждение

По данным Республиканского штаба по борьбе с коронавирусом Кыргызской Республики, в период с 13 по 16 марта 2020 г. количество реагентов для выявления коронавируса SARS-CoV-2 в стране было ограничено, в связи с чем образцы от прибывших в Кыргызстан людей в марте консервировали с помощью замораживания. На 05.04.2020 г. было уже 8439 замороженных проб. Использование метода пулирования проб предложено в целях расширения контингента тестируемых на коронавирусную инфекцию COVID-19 при проведении массовых исследований образцов мазков из носа обследуемых и сокращения затрат на лабораторные процедуры. Внедрение в лабораторную диагностику метода пулирования нативных проб и объединение методов RT-PCR / qPCR «в

одной пробирке» для выявления РНК SARS-CoV-2 оказало существенный эффект в раннем, быстром тестировании образцов.

Всего исследовано 2935 образцов, объединенных в 587 пулов, из них для 40 пулов получен положительный результат, что составило 6,8 % от числа обследованных. В дальнейшем для 40 пулов, содержащих значение $C_t < 32$ по каналу накопления продукта к вирусу, составляющие их пробы (всего 200), исследовали индивидуально. В результате проведенного анализа среди 200 проб из положительных пулов обнаружены 56 проб, содержащих РНК коронавируса, что составило 1,9 % положительных результатов от общего числа исследованных проб. Таким образом, количество проведенных ПЦР для исследования 2935 образцов при использовании метода пулирования равнялось 787 (без учета контролей), что составило на 2000 реакций меньше по сравнению с индивидуальным анализом каждого образца и обеспечило существенную экономию реактивов.

После внедрения метода пулирования проб с 5 по 12 апреля 2020 г. усилиями девяти лабораторий республики в кратчайший срок проанализированы все замороженные пробы и пробы от новых случаев. В настоящее время метод успешно применяется в специализированных лабораториях г. Бишкек (РЦКиООИ, ДПЗиГСЭН, ЦГСЭН г. Бишкек, РЦ «СПИД», НЦФ) и в мобильных лабораториях экспресс-диагностики, базирующихся в РЦКиООИ, которые направлены в Ошскую, Джалал-Абадскую и Нарынскую области. Согласно статистическим данным Республиканского штаба, на период с 5 по 20 апреля 2020 г. приходится наибольшее количество случаев в день и общее количество случаев. В течение двух недель после внедрения в лабораторную диагностику COVID-19 метода пулирования наблюдалось увеличение в 5 раз полученных положительных результатов на коронавирусную инфекцию (с 114 до 568). Благодаря ускоренному тестированию и проведению соответствующих противоэпидемических мероприятий пик заболеваемости пройден 20 апреля 2020 г., в настоящее время заболеваемость среди населения идет на спад.

В результате проведенных исследований установлено преимущество метода пулирования по сравнению с индивидуальным тестированием. Сэкономлено значительное количество реактивов для исследования образцов, что существенно снижает стоимость каждого анализа с учетом относительно высокой стоимости наборов для тестирования. Кардинально уменьшена нагрузка на оборудование и сокращена занятость лабораторных специалистов.

Положительный результат применения разработанного способа заключается в проведении быстрого тестирования с охватом большего количества лиц. Разработанная методика внедрена и используется повсеместно лабораторными специалистами в соответствии с приказом МЗ КР № 218 от 05.04.2020 г. «Об определении вирусологических лабораторий и

создании мобильных бригад по оказанию практической помощи по предупреждению распространения коронавирусной инфекции COVID-19».

Таким образом, применение стратегии пулирования уменьшило число требуемых тестов почти на 65 % и позволило значительно сократить расходы на скрининг COVID-19 в условиях, когда эпидемия COVID-19 находится на начальном этапе. Разработанный метод позволил за короткое время провести исследование образцов на коронавирусную инфекцию без дополнительной закупки дорогостоящих тест-наборов, оборудования и обучения специалистов. Данный метод прост в использовании и доступен для специалистов, проводящих лабораторную диагностику на COVID-19.

Все проведенные стадии исследования образцов, полученных от людей, соответствовали законодательству Кыргызской Республики. От всех людей, ставших объектами исследований, получено информированное согласие.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / Список литературы

1. Novel Coronavirus – China. Disease outbreak news. (Cited 01 Apr 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>.
2. World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). (Cited 01 Apr 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>.
3. World Health Organization. Critical preparedness, readiness and response actions for COVID-19: interim guidance. (Cited 27 Mar 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/critical-preparedness-readiness-and-response-actions-for-covid-19>.

ations-detail/critical-preparedness-readiness-and-response-actions-for-covid-19.

4. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance. (Cited 10 Apr 2020). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>.

Authors:

Khagay S.V. Institute of Biotechnology, National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic; 265, Avenue Chuy, Bishkek, 720071, Kyrgyz Republic, e-mail: hegay@inbox.ru. Scientific and Production Association «Preventive Medicine» of the Ministry of Health; 8, Logvinenko St., Bishkek, 720040, Kyrgyz Republic.

Zhumushov A.T. Institute of Biotechnology, National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic. 265, Avenue Chuy, Bishkek, 720071, Kyrgyz Republic. E-mail: hegay@inbox.ru.

Dzhaparova A.K., Dushenalieva E.M. Republican Center for Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 92, Skryabina St., Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic.

Kuchuk T.E. Scientific and Production Association «Preventive Medicine» of the Ministry of Health. 8, Logvinenko St., Bishkek, 720040, Kyrgyz Republic.

Kalmyrzaev B., Kasymbekova K.T., Usenbaev N.T. Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 148, Moskovskaya St., Bishkek, 720040, Kyrgyz Republic.

Об авторах:

Хегай С.В. Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики; Кыргызская Республика, 720071, Бишкек, проспект Чуй, 265; e-mail: hegay@inbox.ru. Научно-производственное объединение «Профилактическая медицина»; Кыргызская Республика, 720040, Бишкек, ул. Логвиненко, 8.

Жунушов А.Т. Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720071, Бишкек, проспект Чуй, 265. E-mail: hegay@inbox.ru.

Джапарова А.К., Дүйшеналиева Э.М. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720005, Бишкек, ул. Скрябина, 92.

Кучук Т.Э. Научно-производственное объединение «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения. Кыргызская Республика, 720040, Бишкек, ул. Логвиненко, 8.

Калмыrzaев Б., Касымбекова К.Т., Усенбаев Н.Т. Министерство здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720040, Бишкек, ул. Московская, 148.