DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.4.029>
УДК 616.3

Анисько Л.А.¹, Волощик А.А.²

¹ Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

² ООО «АртБиоТех», Минск, Беларусь

Anisko L.¹, Voloschik A.²

¹ City Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

² LLC "ArtBioTech", Minsk, Belarus

Поиск альтернативного биологического материала для ПЦР-исследования на коронавирусную инфекцию COVID-19

Search for Alternative Biological Material for PCR Research for Coronavirus Infection COVID-19

Резюме

Введение. В связи с появлением нового коронавируса SARS-CoV-2 в 2019 году и широким его распространением по всему земному шару возникла острая необходимость в массовом ПЦР-тестировании населения, что послужило толчком в развитии молекулярно-биологических методов диагностики данного направления. С появлением новых диагностических тест-систем возникла необходимость их адаптации в соответствии с уже устоявшимися протоколами забора биологического материала и критериями постановки диагноза. В связи с использованием довольно неприятной процедуры забора, зачастую сопровождающейся эпистаксисом, возникла необходимость в поиске альтернативных вариантов биологического материала. В данном исследовании мы провели оценку применения различного клинического материала для исследования и сравнили преимущества использования каждого. Также в данном исследовании было проведено сравнение стандартного метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени (с этапом экстракции нуклеиновых кислот) и новой тест-системы с применением технологии директ-ПЦР.

Цель. Оценить возможности использования слюны в качестве клинического материала для выявления инфекции SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с использованием реагентов «АртТест COVID-19» – комплект 2 и «АртТест COVID-19» – комплект 3 (ООО «АртБиоТех», Беларусь).

Результаты. Полученные в ходе исследований результаты показали, что в среднем значение Ct, отражающее количество генетического материала человека, в слюне было выше на 3 пункта, чем в образцах мазка. Однако содержание генетического материала вируса оказалось меньше. Среднее отклонение значения Ct составило 3,175 цикла. Так, эффективность выявления вируса в слюне оказалась на порядок хуже, что свидетельствует о более низкой чувствительности ПЦР с таким материалом, независимо от применяемого метода ПЦР.

Заключение. Полученные в ходе исследований данные свидетельствуют о более высокой чувствительности метода ПЦР при использовании в качестве биологического материала назофарингеальных мазков.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, директ-ПЦР, слюна.

Abstract

Introduction. In connection with the emergence of the new coronavirus SARS-CoV-2 in 2019 and its wide spread across the globe, there was an urgent need for mass PCR testing of the population, which triggered the development of molecular biological diagnostic methods in this area. With the advent of new diagnostic test systems, it became necessary to adapt them in accordance with the already established protocols for the collection of biological material and the criteria for making a diagnosis. In connection with the use of a rather unpleasant sampling procedure, often accompanied by epistaxis, it became necessary to search for alternative variants of biological material. In this study, we evaluated the use of different clinical study material and compared the benefits of using each. Also in this study, a comparison was made between the standard PCR method with real-time detection (with the stage of nucleic acid extraction) and the new test system using direct PCR technology.

Purpose. Evaluate the possibility of using saliva as a clinical material for detecting SARS-CoV-2 infection.

Materials and methods. The study was carried out on the basis of the health care institution "City Clinical Infectious Diseases Hospital" in Minsk using the reagents "ArtTest COVID-19" – set 2 and "ArtTest COVID-19" – set 3 (LLC "ArtBioTech", Belarus).

Results. The results obtained in the course of the research showed that, on average, the Ct value, which reflects the amount of human genetic material, in saliva was 3 points higher than in smear samples. However, the content of the genetic material of the virus turned out to be less. The average deviation of the Ct value was 3.175 cycles. Thus, the efficiency of detecting the virus in saliva turned out to be an order of magnitude worse, which indicates a lower sensitivity of PCR with such material, regardless of the PCR method used.

Conclusion. The data obtained during the research indicate a higher sensitivity of the PCR method when using nasopharyngeal smears as a biological material.

Keywords: coronavirus, COVID-19, direct-PCR, saliva.

■ ВВЕДЕНИЕ

До декабря 2019 г. человечеству было известно всего шесть геновариантов коронавируса, из которых два были разновидностью альфа-CoV, а именно: 229E и NL63; а четыре – бета-CoV, включающие: OC43, HKU1, ближневосточный респираторный синдром (MERS), тяжелый острый респираторный синдром (SARS) [1]. Новый – седьмой штамм коронавируса, контагиозный для людей, появился в Ухане (провинция Хубэй, Китай), на оптовом рынке морепродуктов 8 декабря 2019 г. [2, 3]. Международным комитетом по таксономии вирусов и Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) этот штамм был назван «коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома» (SARS-CoV-2), а коронавирусное заболевание COVID-19 в марте 2020 г. было объявлено пандемией.

Вирусологическая диагностика значительно продвинулась вперед благодаря появлению множества новых и более точных методов, начиная от лабораторных исследований и заканчивая передовым медицинским оборудованием. Среди различных методов диагностики SARS-CoV-2 наиболее надежным тестом является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) на назофарингеальных мазках

[4, 5]. Однако такой материал требует наличия квалифицированного персонала, вызывает значительный дискомфорт у пациентов во время забора пробы и связан с высоким риском инфицирования выполняющего забор медицинского работника [6, 7]. Дополнительные факторы, такие как страх перед забором и неправильная техника отбора проб, могут снизить качество образцов, тем самым негативно сказаться на чувствительности теста.

В связи с тем, что слюна может являться фактором передачи вируса от человека к человеку во время чихания и кашля, было предложено ее использование в качестве альтернативы для обнаружения SARS-CoV-2. Преимуществами использования слюны перед назо/орофарингеальными мазками, безусловно, являются возможность самостоятельного взятия пробы, решение проблем нехватки расходных материалов для взятия проб и средств защиты для задействованного медицинского персонала, а также снижение травматичности, особенно у пациентов, склонных к носовым кровотечениям [8, 9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ возможности использования слюны в качестве клинического материала для выявления инфекции SARS-CoV-2. Также проведена оценка возможности применения технологии директ-ПЦР (без этапа экстракции НК) с данным видом материала.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы биологического материала (слюна и назофарингеальные мазки) забирались от пациентов, поступивших в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с симптоматикой новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Исследованы параллельно отобранные образцы слюны, назофарингеальных мазков от 31 пациента. Мазки были помещены, согласно рекомендациям ВОЗ, в транспортную среду HiViral Transport Medium (HIMEDIA, Индия). Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли набор «АртНК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) в соответствии с инструкциями по применению. Молекулярно-генетическую диагностику проводили с использованием наборов «АртТест COVID-19» – комплект 2 и «АртТест COVID-19» – комплект 3 (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США).

Для обработки данных применялись методы анализа результатов и описательной статистики с использованием встроенных графических модулей программы Excel (Microsoft Corporation, США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам клинических исследований на базе УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска были получены данные, отражающие влияние выбора материала для исследования на результативность диагностики с применением ПЦР-метода. Исследования проводились в отношении двух видов биологического материала: слюны как наиболее простого для забора и самозабора материала и

Стандартное отклонение Ct в ПЦР мишеней для ВКО и SARS-CoV-2 в зависимости от используемого биологического материала

Мишень	Стандартное отклонение значения Ct		
	Насофарингеальный мазок	Слюна	Отношение среднего значения Ct
ВКО	0,757	0,644	3,547
SARS-CoV-2	0,559	3,190	-3,175

Standard deviation of Ct in PCR for IC and SARS-CoV-2 targets, depending from type of biological material

Target	Standard deviation of Ct		
	Nasopharyngeal swab	Saliva	Average Ct ratio
IC	0.757	0.644	3.547
SARS-CoV-2	0.559	3.190	-3.175

назофарингеального мазка как материала, рекомендованного ВОЗ для данного вида исследований. Полученные в ходе исследований результаты показали, что в среднем значение Ct, отражающее количество генетического материала человека, в слюне было выше на 3 пункта, чем в образцах мазка. Кроме того, из полученных данных установлено, что клеток эпителия в слюну попадает на порядок больше, чем при заборе зондом. Однако содержание генетического материала вируса оказалось меньше. Среднее отклонение значения Ct составило 3,175 цикла (см. таблицу). Так, эффективность выявления вируса в слюне оказалась на порядок хуже, что свидетельствует о более низкой чувствительности ПЦР с таким материалом, независимо от применяемого метода ПЦР.

При сравнении методов директ-ПЦР, при которой детекция в режиме реального времени проводится напрямую из образца, без стадии экстракции, и стандартной для клинической диагностики ПЦР с тотальными нуклеиновыми кислотами, полученными после экстракции на магнитных частицах, было отмечено, что для образцов назофарингеальных мазков отклонение значений Ct составило 0,5–0,8 пункта. Данный показатель выглядел несущественным и преимущественно наблюдался для образцов, полученных со стадией экстракции. В свою очередь для образцов слюны были получены достоверно различающиеся данные. При исследовании выявление генетического материала человека в слюне методом прямой ПЦР и после экстракции в среднем различалось на 0,644 Ct, тогда как выявление вирусного материала напрямую из пробы слюны в среднем было хуже на 3,190 пункта Ct.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе исследований данные свидетельствуют о более высокой чувствительности метода ПЦР при использовании в качестве биологического материала назофарингеальных мазков. Однако у пациентов, у которых забор данного мазка невозможен (острое травматическое повреждение носовых путей, психопатические отклонения и др.), считаем допустимым использование слюны в качестве альтернативного биологического материала для диагностики инфекции COVID-19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Naji H.S. (2020) The emerging of the 2019 novel coronavirus 2019-nCoV. *Eur. J. Med. Health Sci.* Available at: <https://doi.org/10.24018/ejmed.2020.2.1.169>.
2. Chen N. (2020) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 395, pp. 507–513.
3. Chowdhry A., Kapoor P., Popli D.B. (2020) Strengthening health care research and academics during and after COVID19 pandemic- an Indian perspective. *J. Oral. Biol. Craniofacial Res.*, 10, pp. 343–346.
4. Long C. (2020) Diagnosis of the coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *Eur. J. Radiol.*, 126, 108961.
5. Pang J. (2020) Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): a systematic review. *J. Clin. Med.*, 9, pp. 623–656.
6. Qian Y. (2020) Safety management of nasopharyngeal specimen collection from suspected cases of coronavirus disease 2019. *Int. J. Nurs. Sci.*, 7, pp. 153–156.
7. Kim Y.-G. (2017) Comparison between saliva and nasopharyngeal swab specimens for detection of respiratory viruses by multiplex reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 55, pp. 226–233.
8. Sabino-Silva R., Jardim A.C.G. & Siqueira W.L. (2020) Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. *Clin. Oral. Investig.*, 24, pp. 1619–1621.
9. Vinayachandran D., Saravanakarthiskeyan B. (2020) Salivary diagnostics in COVID-19: future research implications. *J. Dent. Sci.*, 15, pp. 364–366.

Подана/Submitted: 18.11.2021

Принята/Accepted: 15.12.2021

Контакты/Contacts: luidok@mail.ru