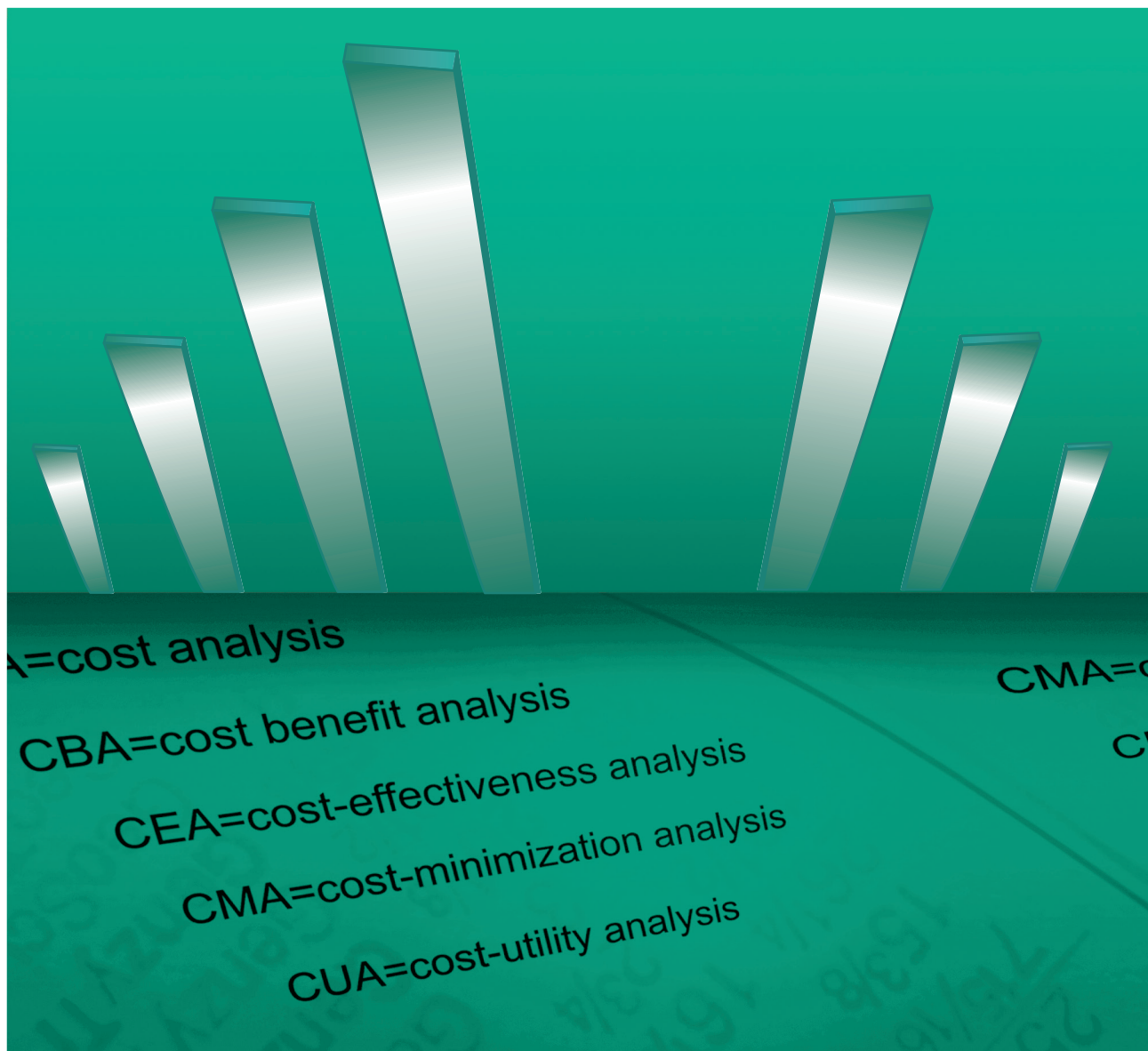


Фармакоэкономика

Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология



FARMAKOEKONOMIKA

Modern Pharmacoeconomic and Pharmacoepidemiology

2020 Vol. 13 No1

www.pharmacoeconomics.ru

- Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени
- Фармакоэкономическая эффективность химиотерапии злокачественных новообразований бронхов и легкого
- Лекарственное обеспечение и оценка технологий здравоохранения во Франции

№1
Том 13
Информационно-репринтные
2020



DOI: 10.17749/2070-4909.2020.13.1.52-63

ISSN 2070-4909 (print)

ISSN 2070-4933 (online)

Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени

Гончарова Е.В.¹, Донников А.Е.², Кадочникова В.В.¹,
Морозова С.А.³, Болдырева М.Н.³, Галкина И.С.³, Блинов Д.В.^{4,5}

¹ ООО «НПФ ДНК-Технология» (ул. Гурьянова, д. 83, стр. 1, Москва 109388, Россия)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ (ул. академика Опарина, д. 4, Москва 117198, Россия)

³ ООО «ДНК-Технология» (Варшавское шоссе, д. 125Ж, корп. 6, Москва 117587, Россия)

⁴ Институт Превентивной и Социальной Медицины

(ул. Садовая-Триумфальная, д. 4-10, Москва 127006, Россия)

⁵ Клинический госпиталь Лапино, ГК «Мать и Дитя»

(1-е Успенское шоссе, д. 111, Московская область, Одинцовский район, Лапино, Россия)

Для контактов: Галкина Ирина Сергеевна, e-mail: Galkina@dna-technology.ru

РЕЗЮМЕ

Цель – разработка набора реагентов для диагностики вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы. В качестве мишеней были выбраны три участка генома SARS-CoV-2. Тестирование выполнено на 220 образцах – 48 положительных образцах, искусственно созданных из биоматериала пациентов, и 172 клинических образцах (соскобы из полости носа и зева, бронхоальвеолярный лаваж, мокрота, эндотрахеальный/назофарингеальный аспират, фекалии, аутопсийный материал) из двух медицинских центров. Предварительно биоматериал был проанализирован с использованием набора сравнения. Оценка проводилась с доверительным интервалом 95%. Расчет доверительных интервалов для чувствительности и специфичности осуществлялся на основании распределения χ^2 .

Результаты. Для использования в практическом здравоохранении разработана технология диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) методом ПЦР в реальном времени, предложены конкретные варианты проведения всех этапов тестирования – преаналитического, аналитического и постаналитического, включая автоматизированную обработку результата. Исследуемый набор реагентов соответствует рекомендациям ВОЗ и МЗ РФ. Испытания продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность: чувствительность составила 100% (95%-й доверительный интервал) 95,6–100%; специфичность составила 100% (95%-й доверительный интервал) 96,7–100%.

Заключение. Набор реагентов зарегистрирован в РФ как медицинское изделие, регистрационное удостоверение № РЗН 2020/9948 от 01.04.2020. Использование его сетевыми лабораториями позволит обеспечить массовый доступ пациентов к тестированию на вирус, вызывающий COVID-19, способствуя быстрому получению результата дифференциальной диагностики, улучшению контроля над пандемией, получению корректной статистики распространения вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Коронавирус, 2019-nCoV, SARS-CoV-2, COVID-19, полимеразная цепная реакция, ПЦР, тест-системы.

Статья поступила: 23.03.2020 г.; в доработанном виде: 02.04.2020 г.; принята к печати: 03.04.2020 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Гончарова Е.В., Донников А.Е., Кадочникова В.В., Морозова С.А., Болдырева М.Н., Галкина И.С., Блинов Д.В. Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология.* 2020; 13 (1): 52-63. DOI: 10.17749/2070-4909.2020.13.1.52-63.

Real-time RT-PCR diagnostics of virus causing COVID-19Goncharova E.V.¹, Donnikov A.E.², Kadochnikova V.V.¹, Morozova S.A.³, Boldyreva M.N.³, Galkina I.S.³, Blinov D.V.^{4,5}¹ LLC "NPF DNA-Technology" (83-1 Guryanova Str., Moscow 109388, Russia)² FSBI "National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology n.a. Academician V.I. Kulakov" Ministry of Healthcare of the Russian Federation (4 Akademika Oparina Str., Moscow 117198, Russia)³ LLC "DNA Technology" (125Zh-6 Varshavskoye Sh., Moscow 117587, Russia)⁴ Institute for Preventive and Social Medicine (4-10 Sadovaya-Triumfalnaya Str., Moscow 127006, Russia)⁵ Lapino Clinic Hospital, MD Medical Group (1st Uspenskoye Highway, 111, Moscow Region, Odintsovo District, Lapino, Russia)**Corresponding author:** Irina S. Galkina, e-mail: Galkina@dna-technology.ru**SUMMARY****Aim:** the study was aimed to develop a reagent kit for the real-time RT-PCR diagnostics of virus causing COVID-19.**Materials and Methods.** Three target sites were chosen in the genome SARS-CoV-2. The testing included 220 samples, 48 artificially created positive samples (made from patients' biomaterial) and 172 clinical samples (scrapes from nasal and pharyngeal cavities, bronchoalveolar lavage, expectoration, endotracheal/nasopharyngeal aspirate, feces, post-mortem material), obtained from two medical centers. Preliminary, the obtained biomaterial was analyzed with a reagent kit of comparison. The evaluation was performed with a confidential interval CI 95%. The calculation of CI for the sensitivity and specificity was made based on the distribution of χ^2 .**Results.** The authors developed a technology of novel coronavirus infection (COVID-19) real-time RT-PCR diagnostics for the application in practical healthcare and proposed the variants of testing at all the stages (preanalytical, analytical, and post-analytical, including automated results processing). The proposed reagent kit meets the requirements of the World Health Organization and the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. The study results demonstrated high sensitivity and specificity. The sensitivity was 100% (95% CI) 95.6–100%; the specificity was 100% (95% CI) 96.7–100%.**Conclusion.** The proposed reagent kit was registered in the RF as a medical product; the registration certificate No. RZN 2020/9948 dated 01.04.2020. The application of the reagent kit in network laboratories will provide patients with access to testing for the virus causing COVID-19 and contribute to quick differential diagnostics, improvement of pandemic control, and accurate statistics on the spread of the virus.**KEY WORDS**

Coronavirus, 2019-nCoV, SARS-CoV-2, COVID-19, polymerase chain reaction, PCR, test systems.

Received: 23.03.2020; **in the revised form:** 02.04.2020; **accepted:** 03.04.2020.**Conflict of interests**

The authors declare they have nothing to disclosure regarding conflict of interests with respect to this manuscript.

The authors contributed equally to this article.

For citationGoncharova E.V., Donnikov A.E., Kadochnikova V.V., Morozova S.A., Boldyreva M.N., Galkina I.S., Blinov D.V. 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.). DOI: 10.17749/2070-4909.2020.13.1.52-63.**ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION**

В декабре 2019 г. новый коронавирус, первоначально названный 2019-nCoV (англ. – 2019 novel coronavirus – новый коронавирус 2019 г.) вызвал вспышку острой респираторной инфекции в г. Ухань (Китай), в короткие сроки распространившейся по миру.

Терминология / Terminology

11 февраля 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) присвоила вирусу и вызываемому им заболеванию официальные названия. От международного комитета по таксономии вирусов новый вирус получил название SARS-CoV-2 (англ. – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – коронавирус второго типа, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром). Данное название было выбрано, потому что по результатам филогенетического анализа вирусного генома этот бета-коронавирус схож с другим коронавирусом – возбудителем вспышки тяжелого острого респираторного синдрома

(ТОРС) в 2002-2003 гг. [1-3]. На сегодняшний день выделяют два типа SARS-CoV-2: тип L (70% всех штаммов), преобладавший в Китае, и тип S (30% штаммов) [4,5]. ВОЗ приняла решение в публичной сфере называть новое заболевание COVID-19 (Coronavirus infection disease – 2019), а новый вирус – «вирусом, вызывающим COVID-19», поскольку использование в названии аббревиатур SARS/ТОРС, ассоциирующихся с тяжелейшим заболеванием, могло бы повлечь эскалацию тревожных настроений в некоторых группах населения. Ни одно из этих наименований не заменяет официального названия вируса, присвоенного Международным комитетом по таксономии вирусов [1-3].

25 марта 2020 г. ВОЗ присвоила COVID-19 коды Международной Классификации Болезней 10 (МКБ-10): код U07.1 – диагнозу заболевания, подтвержденному лабораторными исследованиями; код U07.2 – клиническому или эпидемиологическому диагнозу, когда лабораторное подтверждение не является окончательным или отсутствует [6].

Эпидемиология / Epidemiology

Вирус, вызывающий COVID-19, быстро распространился из Китая на все континенты (за исключением Антарктиды). По состоянию на 25 марта во всем мире было подтверждено 529,6 тыс. случаев [7]. 11 марта 2020 г. ВОЗ признала инфекцию COVID-19 пандемией [8]. Устойчивый рост количества новых случаев заболевания отмечается преимущественно в Италии, Испании и США, а также в Иране [7]. В январе 2020 г. в России COVID-19 была добавлена в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих, наряду с ООИ (чума, холера, оспа) [9].

Заболеванию подвержены все возрастные группы, при этом у детей инфекция обычно протекает в менее тяжелой форме [10]. Основным путем передачи вируса от человека к человеку является воздушно-капельный. Вероятность заражения от пациента с симптомами COVID-19 различается в странах мира и во многом зависит от противоэпидемических мер. Так, в Китае она составляла 1-5%, в США – 0,45%. Также описаны случаи заражения от бессимптомных вирусоносителей, однако вероятность заражения от них пока не определена [11-13]. Длительность выделения вируса у вирусоносителя, по доступным на сегодняшний день данным, составляет от 10 до 37 дней после появления симптомов [14,15]. Все известные на сегодняшний день данные требуют дальнейшего уточнения, для чего необходимы высокочувствительные тесты.

Клиника / Clinical Picture

Клиническая картина заболевания продолжает уточняться. На сегодняшний день считается, что инкубационный период в среднем составляет около 5 суток и может достигать 14 дней [16].

В большинстве случаев COVID-19 имеет бессимптомное или легкое течение с симптомами инфекции верхних дыхательных путей, которые постепенно снижаются до выздоровления в течение

Основные моменты**Что уже известно об этой теме?**

- ▶ Пандемия COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, представляет собой угрозу глобального масштаба
- ▶ Для подтверждения случаев инфицирования COVID-19 ВОЗ рекомендует использовать метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией вирусной РНК
- ▶ Отсутствие высокочувствительных тест-систем с набором трех диагностических мишеней приводит к неполному выявлению инфицированных, особенно среди бессимптомных носителей с малой концентрацией вируса

Что нового дает статья?

- ▶ Разработан и апробирован набор реагентов с определением трех участков генома SARS-CoV-2 и SARS-CoV методом ПЦР в реальном времени
- ▶ Впервые в мире представлены результаты этапов разработки и клинической апробации тест-системы на положительных образцах биоматериала пациентов с COVID-19
- ▶ Продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность тест-системы. Предел обнаружения составил 10^1 копий нуклеиновой кислоты (НК) на амплификационную пробирку

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- ▶ 01.04.2020 получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора, уже в апреле 2020 г. тестирование станет доступным в сетевых лабораториях
- ▶ Доступ к экономически эффективному высокочувствительному и высокоспецифичному методу диагностики COVID-19 будет способствовать лучшему контролю пандемии
- ▶ Увеличение выявляемости носителей SARS-CoV-2 может оказать помощь в принятии управленческих решений и планировании мероприятий организаторами здравоохранения

Highlights**What is already known about this subject?**

- ▶ A pandemic of COVID-19 caused by SARS-CoV-2 virus is a global threat
- ▶ The WHO recommends real-time RT-PCR for the verification of cases of COVID-19
- ▶ The lack of highly-sensitive test systems with a three-target diagnostic kit leads to an incomplete identification of infected population, especially among carriers with a low concentration of virus that do not manifest symptoms

What are the new findings?

- ▶ The authors developed and approbated a real-time RT-PCR diagnostic reagent kit for the identification of three sites in the genomes SARS-CoV-2 and SARS-CoV
- ▶ Novel and original results were presented on the stages of the development and clinical approbation of the test system on biomaterial samples from patients with COVID-19
- ▶ A high sensitivity and specificity of the test system was demonstrated in the study. The threshold of detection was 10^1 copies of the nucleic acid (NA) per the amplification test-tube

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

- ▶ On 01.04.2020, the Roszdravnadzor (Federal Service for the Supervision of Public Health and Social Development) registration certificate was received. In April 2020, the test system will be available in network laboratories
- ▶ The availability of economically efficient, highly sensitive, and highly specific method of COVID-19 diagnostics will contribute to better pandemic control
- ▶ An increase in the detectability of SARS-CoV-2 carriers can help in executive decision-making by the healthcare authorities

недели после заражения. Основными симптомами являются лихорадка, кашель, повышенная утомляемость, одышка, боли в мышцах, боль в горле, головная боль. Может наблюдаться пневмония без угрозы для жизни. Менее чем у трети больных развивается тяжелая пневмония с острым респираторным дистресс-синдромом [17-19]. При этом возможно развитие острой дыхательной недостаточности, острой почечной недостаточности, сепсиса и септического шока, синдрома диссеминированного свертывания крови (ДВС-синдром) [17,18,20-22]. В тяжелой форме заболевание протекает у 15% пациентов, смертность, по разным данным, составляет 0,4-15,0%. Точность оценки определяется различием подходов: в одних странах всех умерших, имевших положительные результаты тестирования и симптомы COVID-19, учитывают, как умерших от коронавирусной инфекции, в других – из статистики исключают больных COVID-19, погибших от обострений других хронических заболеваний. Также на показатель летальности (англ. – Case Fatality Rate, CFR) влияет невозможность точно определить количество людей, зараженных вирусом, вызывающим COVID-19, что отмечается специалистами как серьезная проблема [23]. Очевидно, что при занижении инфицированности населения показатель летальности выше, нежели на самом деле.

Диагностика / Diagnostics

При COVID-19 как у части бессимптомных носителей, так и у лиц, имеющих симптомы, в т.ч. пневмонию, отмечаются затемнения по типу матового стекла при компьютерной томографии (КТ) грудной клетки. Изменения на КТ соответствуют картине вирусной пневмонии, чаще бывают двусторонними, с захватом нижних долей легких [24,25]. На разных этапах находится разработка

серологических тестов и поиск биомаркеров заболевания, но основным методом лабораторной диагностики COVID-19 является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [18,26,27].

В качестве образцов используется биоматериал, полученный из респираторного тракта: назофарингеальные мазки или мазки из ротоглотки, а также мокрота при продуктивной кашле. У пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), используют аспират из нижних дыхательных путей или бронхоальвеолярный лаваж [26,27].

Данные сравнительных исследований точности и диагностической ценности различных тестов на новый коронавирус к настоящему времени ограничены.

Вызовы для системы здравоохранения и экономики / Challenges for the System of Healthcare and Economics

Понятно, что пресечь распространение нового вируса SARS-CoV-2 и заболеваемость COVID-19 уже невозможно. В условиях пандемии COVID-19 особенно важно, чтобы количество инфицированных пациентов и тяжелых случаев заболевания не превысило возможности системы здравоохранения. Для этого необходимо сгладить пик заболеваемости и отсрочить инфицирование основной массы населения [28]. Если возможности системы здравоохранения окажутся недостаточными, из-за нехватки обученного персонала, койко-мест в реанимации и аппаратов ИВЛ, будет расти смертность, возможно, инвалидизация (поствоспалительный интерстициальный фиброз) больных COVID-19. Нехватка тех же ресурсов может ухудшить аналогичные показатели при других хронических заболеваниях и травмах. В связи с этим в срочном порядке происходит мобилизация ресурсов, включая переориентацию ряда ЛПУ на прием пациентов с подозрением на COVID-19 и пациентов с внебольничной пневмонией, увеличение количества коек в реанимациях, инспекция аппаратов ИВЛ и т.п. Также в регионах с высоким риском распространения COVID-19 объявляются все более жесткие меры карантина для всего населения, вплоть до ограничения передвижения по населенному пункту [29,30]. В перспективе это поможет решить главную задачу – сберечь человеческие жизни.

С другой стороны, длительный карантин определенно приведет к спаду в экономике, снижению потребления, разрыву логистических цепочек, банкротству мелкого и среднего бизнеса, увеличению безработицы и снижению качества жизни [31,32]. В среднесрочной перспективе это может повлечь увеличение смертности социально незащищенных слоев населения, сопоставимое по масштабам со смертностью при пандемии COVID-19. При планировании организационных мер необходимо найти правильный баланс между карантинными ограничениями и поддержкой экономики, что реально при наличии максимально точной статистики количества инфицированных и заболевших, получить которую невозможно без широкого доступа к тест-системам, позволяющим с высокой специфичностью и чувствительностью диагностировать заражение вирусом, вызывающим COVID-19.

Данные предпосылки обозначили социальную миссию – в короткие сроки разработать такую тест-систему и обеспечить ее доступность для пациентов.

Цель – разработка набора реагентов для диагностики вируса, вызывающего (COVID-19), методом ПЦР в реальном времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Подход к исследованиям и разработке / Approach for Research and Development

ВОЗ для подтверждения случаев инфицирования COVID-19 рекомендует использовать метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией вирусной РНК [33]. Согласно Временным методическим рекомендациям МЗ РФ «Профилактика, диагностика

и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версий 1-4, специфическая лабораторная диагностика коронавирусной инфекции также основывается на выявлении РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР [26]. На этапе разработки и апробации технологического решения, в т.ч. при определении целевых генов-мишеней, руководствовались рекомендациями ВОЗ и Минздрава РФ, а также иными применимыми руководствами международных и российских регуляторных органов.

Пациенты и образцы / Patients and Samples

С целью установления диагностических характеристик (диагностической чувствительности и специфичности) тест-системы были проведены исследования образцов биологического материала, полученных от пациентов.

Для лабораторной диагностики COVID-19 в соответствии с рекомендациями ВОЗ и российскими нормативными документами, рекомендуется использовать биоматериал, полученный из респираторного тракта: мазки из носо- и ротоглотки, мокроту, материал из легких, полученный при инструментальных манипуляциях (аспират, лаваж). Возможно также исследование крови, сыворотки, мочи, фекалий, биопсийного или аутопсийного материала легких [26,27].

Критерии включения биологического материала / Criteria of Inclusion of Biological Material

Биологический материал был собран от пациентов с симптомами инфекций верхних дыхательных путей – лихорадка, кашель, повышенная утомляемость, одышка, боли в мышцах, боль в горле, головная боль и условно-здоровых пациентов, обратившихся в лечебное учреждение с целью профилактического осмотра.

Критерии исключения клинических образцов материала / Criteria of Exclusion of Biological Material

Исключались из исследования образцы со следующими характеристиками:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку образцы;
- образцы, для которых не указаны дата и время получения материала;
- образцы, хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала;
- образцы с нарушенной целостностью и/или герметичностью пробирок.

Исследование образцов биоматериала / The Study of Biological Material

Исследование 220 образцов от пациентов был выполнено в двух учреждениях:

в ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Росздравнадзора РФ (ВНИИМТ) были исследованы 98 образцов (из них 48 искусственно созданных положительных образцов и 50 отрицательных) и в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ (НМИЦ АГП) – 122 образца от пациентов с симптомами и без симптомов респираторного заболевания (из них 10 положительных и 112 отрицательных).

Искусственные положительные образцы были созданы путем добавления в отрицательные образцы биоматериала, полученного от пациентов, разных количеств охарактеризованного обезвреженного образца РНК вируса SARS-CoV-2 в суммарном препарате нуклеиновых кислот, выделенных из клеточной культуры Vero E6, зараженной вирусом SARS-CoV-2 (изолят В, биологическая активность 6,8 Ig БОЕ, фракция, обогащенная РНК, 0,1 Ig БОЕ соответствует 10³ копий).

Таблица 1. Общее количество биоматериала.

Table 1. Total amount of biological material.

Вид биоматериала	Количество образцов	
	ВНИИМТ	НМИЦ АГП
Соскоб из носоглотки/ротоглотки	57	113
Бронхоальвеолярный лаваж	13	3
Аутопсийный материал (фрагмент легкого)	0	2
Мокрота	20	0
Эндотрахеальный/назофарингеальный аспират	8	0
Фекалии	0	4
Итого	98	122
	220	

Примечание. Здесь и в других иллюстрациях: ВНИИМТ – ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Росздравнадзора РФ; НМИЦ АГП – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ.

Notes: ВНИИМТ – All-Russian Scientific and Research Institute of Medical Technologies; НМИЦ АГП – Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V. I. Kulakov of the Ministry of Health of Russian Federation.

Таблица 2. Перечень рекомендуемых к определению генов-мишеней SARS-CoV-2 [33,34].

Table 2. The list of the gene targets recommended for the identification of SARS-CoV-2 [33-34].

Страна	Организация	Рекомендуемые к определению гены-мишени
Китай	China CDC (Управление по контролю и профилактике заболеваний, Китай)	N (nucleocapsid phosphoprotein), ORF1ab
Германия	Charité (клиника Шарите)	N, E (envelope protein), RdRP (ORF1ab)
Гонконг	Hong-Cong University (Гонконгский университет)	N, ORF1b-nsp14
Япония	National Institute of Infectious Diseases (Национальный институт инфекционных заболеваний)	S (surface glycoprotein), ORF1a, ORF10
Таиланд	National Institute of Health (Национальный институт здравоохранения)	N
США	US CDC, Atlanta (Управление по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США)	N (три варианта набора олигонуклеотидов для выявления последовательности гена N)

Данные о количестве и видах исследованного биологического материала приведены в **таблице 1**.

Предварительно весь биоматериал был проанализирован с использованием набора сравнения – «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРv-2019-nCoV-RG» по ТУ 21.20.23-088-05664012-2020» производства ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, РУ № РЗН 2020/9677 от 11.02.2020.

При проведении клинических испытаний были выполнены все необходимые манипуляции с образцами клинического материала согласно инструкции по применению медицинского изделия «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС)» в комплектации ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08695.

Формулы и статистический анализ / Formulas and Statistical Analysis

Диагностическая чувствительность (ДЧ) / Diagnostic sensitivity (DS)

Оценка диагностической чувствительности выполнялась по следующей формуле:

$$ДЧ = ИП / (ИП + ЛО) \times 100\%$$

с 95%-м доверительным интервалом, где ИП – истинно положительные результаты, полученные на испытуемом наборе и наборами сравнения; ЛО – ложноотрицательные результаты в случае отрицательного результата, полученного на испытуемом наборе, и положительного результата, полученного набором сравнения.

Диагностическая специфичность (ДС) / Diagnostic specificity (DS)

Оценка диагностической специфичности выполнялась по следующей формуле:

$$ДС = ИО / (ИО + ЛП) \times 100\%$$

с 95%-м доверительным интервалом, где ИО – истинно отрицательные результаты, полученные на испытуемом наборе и наборами сравнения, ЛП – ложноположительные результаты в случае положительного результата, полученного на испытуемом наборе и отрицательного результата, набором сравнения.

Расчет доверительных интервалов для чувствительности и специфичности рассчитывались на основании распределения χ^2 .

Этические аспекты / Ethical Considerations

Все процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Весь биоматериал был получен в ходе рутинного лечебно-диагностического процесса и представляет собой обезличенный остаточный биоматериал, сохраняемый в лаборатории, после проведения клинически значимых исследований. Информированное согласие пациентов на проведение клинических испытаний не требуется ввиду особенностей получения клинического материала.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Выбор целевых мишеней / The Choice of Targets

В качестве целевых мишеней для повышения надежности тестирования рекомендуется использовать несколько генов: нуклео-

Таблица 3. Результаты анализа серийных разведений лабораторного контрольного образца с использованием набора SARS-CoV-2/SARS-CoV.

Table 3. Results of the analysis of serial dilutions of the laboratory control samples with a SARS-CoV-2/SARS-CoV kit.

№ п/п	Копий ЛКО / на амплификационную пробирку	Стрипы				Пробирки	
		набор №1		набор №2		набор №1	
		ЛКО, сер. 1	ЛКО, сер. 2	ЛКО, сер. 1	ЛКО, сер. 2	ЛКО, сер. 1	ЛКО, сер. 2
		Количество сработавших образцов из 24 повторов					
1	20	24	24	24	24	24	24
2	10	24	23	24	24	24	23
3	5	19	18	19	20	20	17
4	0	–	–	–	–	–	–

Примечание. ЛКО – лабораторный контрольный образец.

Note: LCS – laboratory control sample.

Таблица 4. Предел обнаружения выявляемых вирусов в наборе реагентов SARS-CoV-2/ SARS-CoV.

Table 4. Detection threshold for the identification of the viruses in a SARS-CoV-2/ SARS-CoV kit.

№	Выявляемый вирус	ПРОБА-НК (объем элюции – 50 мкл)
1	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N	500 копий/мл образца
2	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	500 копий/мл образца
3	Коронавирусы подобные SARS-CoV	500 копий/мл образца

капсида (N), мелкой мембраны (E), «протеиновых шипов» (S) и специфической РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) [33,34]. Поскольку нельзя исключить возникновение новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2, большинство международных и локальных государственных организаций здравоохранения рекомендует к определению в качестве мишени ген нуклеокапсида (N) и один из дополнительных генов (табл. 2).

Руководствуясь этими рекомендациями, при разработке собственного оригинального набора реагентов для диагностики COVID-19 в качестве мишеней были выбраны три участка генома SARS-CoV-2: специфичные для коронавируса SARS-CoV-2 участки гена N и гена E, а также консервативный участок гена E, общий для группы коронавирусов подобных SARS-CoV (включая SARS-CoV и SARS-CoV-2).

Аналитические характеристики / Analytical Characteristics

Аналитическими характеристиками любой тест-системы являются ее аналитическая чувствительность / предел обнаружения, аналитическая специфичность и устойчивость к действию интерферирующих веществ.

Предел обнаружения устанавливали путем анализа серийных разведений двух серий лабораторного контрольного образца (ЛКО) (табл. 3).

Предел обнаружения составил 10 копий нуклеиновой кислоты (НК) на амплификационную пробирку. Данный предел обнаружения соответствует значениям концентрации РНК в образце, приведенным в таблице 4.

Предел обнаружения НК в образце биоматериала зависит от метода пробоподготовки образца и конечного объема выделенной НК (объема элюции). Предел обнаружения 10 копий НК на амплификационную пробирку соответствует 500 копиям нуклеиновой кислоты/мл исходного образца для коронавирусов SARS-CoV-2, ген N; коронавирусов SARS-CoV-2, ген E; коронавирусов, подобных SARS-CoV (объем элюции 50 мкл).

При исследовании аналитической специфичности установлено отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, *Human coronavirus HKU-1*, *Human coronavirus NL-63*, *Human rhinovirus*; ДНК *Mycoplasma pneumonia*, *Streptococcus pneumonia*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella*

parapertussis, а также ДНК человека в концентрации до 10⁸ копий/мл образца.

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределенных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец нуклеиновой кислоты, по результатам анализа рисков отнесены следующие вещества: гемоглобин, присутствующий в образце РНК в результате неполного удаления в ходе выделения РНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце РНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки. При проведении исследования были определены максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца кДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца кДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца кДНК.

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты, в т.ч. содержащиеся в назальных спреях и др. удаляются в ходе выделения НК с использованием комплектов/наборов для пробоподготовки.

Диагностические характеристики / Diagnostic Characteristics

Диагностические характеристики были определены сравнением положительных и отрицательных результатов, полученных новой тест-системой для диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и зарегистрированной референтной тест-системой. Результаты представлены в таблице 5.

Образцы, полученные от пациентов из НМИЦ АГП, были дополнительно протестированы на наличие других вирусов, вызывающих симптомы респираторного заболевания. Результаты идентификации других вирусов приведены в таблице 6.

По результатам проведенного анализа полученных данных установлено, что диагностическая чувствительность нового набора составляет 100% (95%-й доверительный интервал) 95,6–100%; диагностическая специфичность составляет 100% (95%-й доверительный интервал) 96,7–100%.

Таблица 5. Результат определения диагностических характеристик.

Table 5. Results of the identification of diagnostic characteristics.

Результат	Количество
Истинно положительный	58
Ложноположительный	0
Истинно отрицательный	162
Ложноотрицательный	0
Всего	220

Таблица 6. Результаты тестирования образцов от пациентов из НМИЦ АГП на возбудители респираторных инфекций.

Table 6. Results of testing of samples obtained from patients from RCOGP for respiratory infection agents.

Возбудитель	Количество положительных образцов
Аденовирусы (<i>Human adenovirus</i>)	1
Вирус парагриппа тип 2 (<i>Human parainfluenza virus type 2</i>)	1
Вирус парагриппа тип 3 (<i>Human parainfluenza virus type 3</i>)	1
Вирус парагриппа тип 4 (<i>Human parainfluenza virus type 4</i>)	1
Грипп А	2
Грипп В	1
Коронавирус (<i>Human coronavirus</i>) 229Е	1
Коронавирус (<i>Human coronavirus</i>) 229Е 4	2
Коронавирус (<i>Human coronavirus</i>) HKU 1	1
Коронавирус (<i>Human coronavirus</i>) NL63	3
Коронавирус (<i>Human coronavirus</i>) OC43	2
Метапневмовирус (<i>Human metapneumovirus, MPV</i>)	1
Респираторно-синцитиальный вирус (<i>Human respiratory syncytial virus, RSV</i>)	1
Риновирусы (<i>Human rhinovirus, HRV</i>)	3
Не выявлено	91
Итого	112

ОБСУЖДЕНИЕ / DISCUSSION

В основе диагностики COVID-19 лежит обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Исследование выполняется по принципу качественного анализа (идентификации). Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой. Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК проводят в одной пробирке. Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина или использования Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

С целью минимизации риска получения неадекватных результатов диагностики в состав набора включен внутренний контрольный образец (РНК-ВК), который предназначен для оценки этапа выделения РНК и качества прохождения полимеразной цепной реакции.

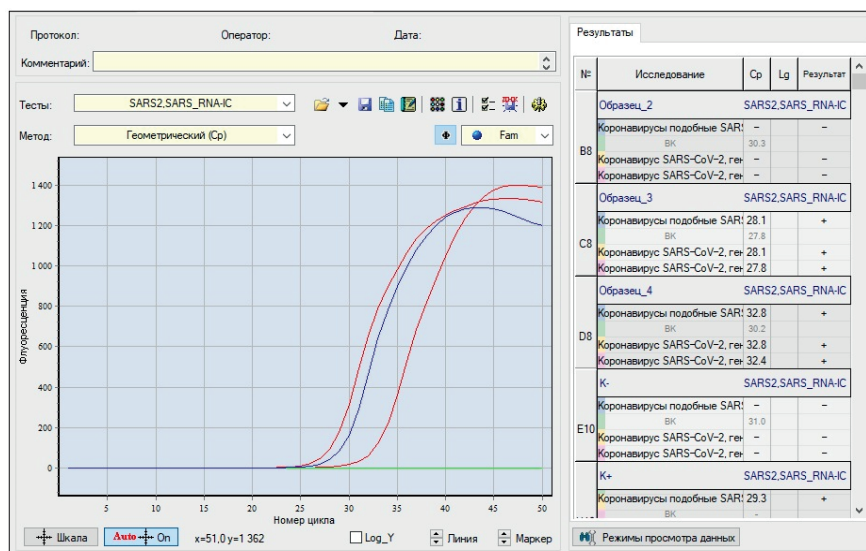
Удобство использования амплификаторов серии ДТ состоит в автоматическом анализе результатов реакции с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором (рис. 1).

При выполнении анализа возможны следующие варианты лабораторных заключений:

- обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2¹;
- обнаружена РНК коронавирусов подобных SARS-CoV, РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена;
- РНК коронавирусов подобных SARS-CoV не обнаружена, РНК SARS-CoV-2 не обнаружена;
- требуются дополнительные исследования, возможна мутация в одном из генов SARS-CoV-2;
- вероятно низкая концентрация РНК SARS-CoV-2. Требуется повторное выделение препарата нуклеиновых кислот или повторное взятие клинического материала;
- результат исследования недостоверный.

Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из клинического материала; ошибками преаналитического этапа, ошибочным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, либо повторное выделение препарата

¹ Не исключено одновременное присутствие в образце РНК коронавируса SARS-CoV-2 и других коронавирусов, подобных SARS-CoV.



А



Б

Рисунок 1. Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени (приборы серии «ДТ») с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV»: А – отрицательный результат; Б – положительный результат.

Figure 1. RT-PCR results (“DT” series amplifier) obtained with a reagent kit “SARS-CoV-2/SARS-CoV”: A – negative results; Б – positive results.

нуклеиновых кислот, либо повторное взятие клинического материала.

Показаниями к проведению тестирования являются: диагностика пациентов с симптомами ОРВИ и контактировавших с заболевшим COVID-19, независимо от их возраста; обследование лиц всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции / в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

В условиях эпидемии важно обеспечить достаточное количество тестов. В настоящее время в России доступны несколько наборов реагентов для выявления вируса, вызывающего COVID-19. Первая, ставшая доступной, тест-система была разработана Государственным научным центром «Вектор» и зарегистрирована Росздравнадзором 11 февраля 2020 г. [35]. Набор реагентов обычно содержит три компонента: реагенты для экстракции РНК, реагенты для обратной транскрипции и реагенты для ПЦР (ферменты, буфер и праймеры – олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям генома вируса), положительный, отрицательный и внутренний контрольный образцы. Однако данный набор содержит только праймеры, для выделения РНК и обратной транскрипции предполагается, что будут использоваться наборы

сторонних производителей. Внутренний контрольный образец также в наборе не содержится. Такой подход, по-видимому, помог обеспечить скорейший доступ к тестированию, но осложнил выполнение ПЦР лабораториями. Заявленная чувствительность тест-системы ГНЦ «Вектор» составляет 10^5 копий плазмид на 1 мл. Таким образом, весьма вероятно, что пациенты с легким или бессимптомным течением COVID-19, но которые, тем не менее, представляют опасность для окружающих, имея концентрацию вируса меньше предела чувствительности метода, будут показывать ложноотрицательные результаты тестирования. Это способствует занижению статистики инфицирования COVID-19 и распространению инфекции, поскольку условия карантина таких пациентов будут не строже, чем здоровых лиц. Разработанный набор реагентов лишен этих недостатков. Также преимуществом является возможность идентифицировать два участка генов SARS-CoV-2 и еще один участок, общий с SARS-CoV 2002 г. Это определяет высокую специфичность данного теста – возможность получить ложноположительные результаты сведена к минимуму.

Оригинальных публикаций в рецензируемых журналах, описывающих разработку и валидацию наборов реагентов для ПЦР-диагностики вируса, вызывающего COVID-19, в базах данных научной литературы Pubmed/MEDLINE и eLIBRARY.ru на момент подготовки статьи не содержалось. Несколько зарубежных публикаций было

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

посвящено клинической апробации коммерческих и некоммерческих наборов реагентов. Наибольший интерес представляет публикация Conrad R. с соавт., в которой описан опыт Баварского управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. – Bavarian Health and Food Safety Authority, Германия) по сравнительной оценке трех наборов реагентов [36]. Наилучшие результаты показал коммерческий набор с оптимизированными областями-мишенями и последовательностями праймеров (в гене E и SARS-CoV-2-специфическом гене S), показавший 100%-ю специфичность. Нами применялся аналогичный подход к выбору мишеней, а представленные зарубежные результаты сопоставимы с нашими данными, что подтверждает их правильность.

Также интересна публикация Pfeifferle S. с соавт. (Германия), которые выполнили оценку образцов биоматериала с использованием высокопроизводительной системы количественного анализа на основе ПЦР в реальном времени [37]. Система показала высокие аналитические характеристики, однако одним из важных ограничений исследования являлось то, что авторы не могли подтвердить эффективность анализа с использованием клинических SARS-CoV-2-положительных образцов. В нашем исследовании мы выполнили несколько этапов испытаний с оценкой клинических SARS-CoV-2-положительных образцов, что повышает ценность работы.

Wong с соавт. предложили протокол анализа на основе обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени, который подразумевает самостоятельное получение образца пациентом (мазок ротоглотки), очищения РНК тризолом и выполнение количественной ПРЦ. Протокол продемонстрировал хорошие характеристики в отношении предела чувствительности. При этом стоимость анализа оценивается менее чем в 15 долларов США [38]. Использование разработанного нами набора реагентов при сопоставимых характеристиках чувствительности и специфичности является значительно более экономически эффективным – по предварительной оценке, реагентная стоимость анализа, включая стоимость транспортной среды для взятия и транспортировки образцов, составит около 300 рублей, или 4 долларов США.

Таким образом, по аналитическим характеристикам разработанный набор реагентов превосходит ряд отечественных решений

Политика раскрытия данных клинических исследований

Принципы анализа и данные, лежащие в основе результатов (текст, таблицы, рисунки), после деидентификации будут доступны по запросу исследователей, которые предоставят методологически обоснованное предложение, сразу после публикации и до 1 года после публикации. Предложения должны быть направлены на почтовый ящик Boldyreva@dna-technology.ru. Чтобы получить доступ, лица, запрашивающие данные, должны будут подписать соглашение о доступе к данным.

Финансирование

Исследования и разработка финансировались ООО «НПО ДНК-Технология» и ООО «ДНК-Технология»

Написание и публикация статьи выполнены без финансовой поддержки

Происхождение статьи и рецензирование

Журнал не заказывал статью; внешнее рецензирование (в ускоренном порядке вследствие важности проблемы)

Согласие пациентов на публикацию

Не требуется

Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант рукописи

ЛИТЕРАТУРА:

- ВОЗ. Наименование заболевания, вызванного коронавирусом (COVID-19), и вирусного возбудителя. [Электронный ресурс] URL: [https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Published 2020 г. Дата обращения: 10.03.2020.
- WHO. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report-7. *WHO Bull.* 2020; 27 JANUARY 2020: 1–7.

и сопоставим с зарубежными разработками. Существенно, что диагностика вируса, вызывающего COVID-19, с использованием разработанного набора реагентов является экономически эффективной и может быть рекомендована как для выявления SARS-CoV-2 у больных коронавирусной инфекцией, так и для обследования бессимптомных носителей вируса с целью дальнейшей профилактики его передачи и раннего начала терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

Разработано и апробировано технологическое решение, которое позволяет проводить выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, и дополнительно – идентифицировать возбудитель атипичной пневмонии 2002 г. SARS-CoV.

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, соответствует требованиям ВОЗ и российских документов МЗ РФ по диагностике коронавируса.

Клиническая достоверность результата тестирования обусловлена технологическими особенностями разработанного набора:

- высокая специфичность в результате тестирования трех мишеней вирусных генов;
- высокая чувствительность в результате гарантированного «горячего» старта;
- контроль адекватности клинического материала;
- возможность тестирования всех рекомендованных видов биоматериала.

Тест-системы показали высокую чувствительность и специфичность. Результаты клинических испытаний позволили провести процедуру регистрации в регуляторных органах в ускоренном порядке, принимая во внимание высокую социальную значимость обеспечения доступа пациентов к лабораторному тестированию на вирус, вызывающий COVID-19. 01.04.2020 г. получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора [39]. Начиная с апреля 2020 г. сетевые лаборатории обеспечат доступ пациентов к высокочувствительному и высокоспецифичному методу диагностики вируса, вызывающего COVID-19, что будет способствовать лучшему контролю пандемии.

The Policy of Clinical Data Disclosure

Analytic code and data that underlie the results reported in this article (text, tables, figures), after deidentification will be available with researchers who provide a methodologically sound proposal Immediately following article publication and ending 1 years after the publication. Proposals should be directed to Boldyreva@dna-technology.ru. To gain access, data requestors will need to sign a data access agreement.

Funding

Research and development were funded by DNA-Technology

The article was written and published without funding

Provenance and peer review

Not commissioned; externally peer reviewed (fast track due to significance of the issue)

Patient consent for publication

Not required

All the authors have read and approved the final version of the manuscript

- WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Published 2020 г. Дата обращения: 10.03.2020.
- Tang X., Wu C., Li X. и др. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Nat Sci Rev.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
- Maclean O.A., Orton R., Singer J.B., Robertson D.L. Response to “On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2”. [Электронный

ресурс] URL: <http://virological.org/t/response-to-on-the-origin-and-continuing-evolution-of-sars-cov-2/418>. Дата обращения: 10.03.2020.

6. WHO. COVID-19 coding in ICD-10. [Электронный ресурс] URL: <http://www9.who.int/classifications/icd/COVID-19-coding-icd10.pdf>. Дата обращения: 26.03.2020.

7. John Hopkins University. Coronavirus Resource Center. [Электронный ресурс] URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Дата обращения: 26.03.2020.

8. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Дата обращения: 23.03.2020.

9. Постановление Правительства РФ от 31.01.2020 г. № 66 «О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих».

10. Dong Y., Mo X., Hu Y. и др. Epidemiological Characteristics of 2143 Pediatric Patients With 2019 Coronavirus Disease in China. *Pediatrics*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702>.

11. Aylward B., Liang W. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *WHO-China Jt Mission Coronavirus Dis 2019*. 2020; 16–24. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>. Дата обращения: 23.03.2020.

12. Burke R.M., Midgley C.M., Dratch A. и др. Active Monitoring of Persons Exposed to Patients with Confirmed COVID-19 - United States, January-February 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (9): 245–246. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6909e1>.

13. Bai Y., Yao L., Wei T. и др. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2565>.

14. Liu Y., Yan L.-M., Wan L. и др. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020; DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2).

15. Zhou F., Yu T., Du R. и др. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395 (10229): 1054–1062. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).

16. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q. и др. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.7326/M20-0504>.

17. Adhikari S.P., Meng S., Wu Y.-J. и др. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect Dis Poverty*. 2020; 9 (1): 29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00646-x>.

18. Dhama K., Sharun K., Tiwari R., Sircar S., Bhat S. Coronavirus Disease 2019 – COVID-19. 2020; [Электронный ресурс] URL: <https://www.preprints.org/manuscript/202003.0001>. Дата обращения: 23.03.2020.

19. Guan W., Ni Z., Hu Y. и др. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.

20. Lai C.C., Shih T.P., Ko W.C., Tang H.J., Hsueh P.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 55 (3): 105924. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>.

21. Sun J., He W.T., Wang L. и др. COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. *Trends Mol Med*. 2020; 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.02.008>.

22. Wang L., Wang Y., Ye D., Liu Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 105948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105948>.

23. Rajgor D.D., Lee M.H., Archuleta S., Bagdasarian N., Quek S.C. The many estimates of the COVID-19 case fatality rate. *Lancet Infect Dis*. 2020; DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30244-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30244-9).

24. Wang Y., Liu Y., Liu L., Wang X., Luo N., Ling L. Clinical outcome of 55 asymptomatic cases at the time of hospital admission infected with SARS-Coronavirus-2 in Shenzhen, China. *J Infect Dis*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa119>.

25. Hu Z., Song C., Xu C. и др. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci China Life Sci*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1661-4>.

26. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 4. Минздрав РФ. Москва; 2020.

27. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Surveillance and case definitions. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>. Дата обращения: 12.03.2020.

28. Wang C.J., Ng C.Y., Brook R.H. Response to COVID-19 in Taiwan. *JAMA*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3151>.

29. Указ Президента Российской Федерации от 25 марта 2020 года № 206 «Об объявлении в Российской Федерации нерабочих дней». *Российская Газета – федеральный выпуск*. 2020; 66 (8120).

30. Tellis G.J., Sood A., Sood N. How Long Should Social Distancing Last? Predicting Time to Moderation, Control, and Containment of COVID-19. *SSRN Electron J*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3562996>.

31. Гуриев С. ВВП или жизни людей. *Ведомости*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.vedomosti.ru/opinion/articles/2020/03/27/826385-vvp-lyudei?fbclid=IwAR1ftEZN050VJd3cU9mnPtx8RC3lwDNIADJVFv5D9AxaNZEIqme2a0ApU4Y>. Дата обращения: 26.03.2020.

32. Коронавирус и FMCG-тренды в России: новая реальность и новые возможности. *Nielsen*. 2020.

33. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Дата обращения: 23.03.2020.

34. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Дата обращения: 12.02.2020.

35. Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG» по ТУ 21.20.23-088-05664012-2020. [Электронный ресурс] URL: <https://nevacert.ru/reestr/med-reestr/rzn-2020-9677-41240>. Дата обращения: 11.03.2020.

36. Konrad R., Eberle U., Dangel A. и др. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Eurosurveillance*. 2020; 25 (9). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173>.

37. Pfefflerle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Eurosurveillance*. 2020; 25 (9). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152>.

38. Won J., Lee S., Park M. и др. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*. March 2020. DOI: <https://doi.org/10.5607/en20009>.

39. Регистрационное удостоверение №ПЗН 2020/9948 на медицинское изделие «Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV)». 2020.

REFERENCES:

1. The name of the disease caused by coronavirus (COVID-19), and the viral pathogen. [Electronic resource] URL: [https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Published 2020 g. Accessed: 10.03.2020.
2. WHO. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report-7. *WHO Bull.* 2020; 27 JANUARY 2020: 1–7.
3. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Published 2020 g. Accessed: 10.03.2020.
4. Tang X., Wu C., Li X. et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
5. Maclean O.A., Orton R., Singer J.B., Robertson D.L. Response to “On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2”. [Electronic resource] URL: <http://virological.org/t/response-to-on-the-origin-and-continuing-evolution-of-sars-cov-2/418>. Published 2020 g. Accessed: 10.03.2020.
6. WHO. COVID-19 coding in ICD-10. [Electronic resource] URL: <http://www9.who.int/classifications/icd/COVID-19-coding-icd10.pdf>. Published 2020 g. Accessed: 26.03.2020.
7. John Hopkins University. Coronavirus Resource Center. [Electronic resource] URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Published 2020 g. Accessed: 26.03.2020.
8. WHO. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Accessed: 23.03.2020.
9. Decree of the Government of the Russian Federation of January 31, 2020 No. 66 “On Amending the List of Diseases of Danger to Others”. 2020. (In Russ).
10. Dong Y., Mo X., Hu Y. et al. Epidemiological Characteristics of 2143 Pediatric Patients With 2019 Coronavirus Disease in China. *Pediatrics.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702>.
11. Aylward B., Liang W. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). WHO-China Jt Mission Coronavirus Dis 2019. 2020; February 2019; 16–24. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>. Accessed: 23.03.2020.
12. Burke R.M., Midgley C.M., Dratch A. et al. Active Monitoring of Persons Exposed to Patients with Confirmed COVID-19 – United States, January–February 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020; 69 (9): 245–246. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6909e1>.
13. Bai Y., Yao L., Wei T. et al. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2565>.
14. Liu Y., Yan L.-M., Wan L. et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020; DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2).
15. Zhou F., Yu T., Du R. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395 (10229): 1054–1062. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
16. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.7326/M20-0504>.
17. Adhikari S.P., Meng S., Wu Y.-J. et al. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect Dis Poverty.* 2020; 9 (1): 29. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00646-x>.
18. Dhama K., Sharun K., Tiwari R., Sircar S., Bhat S. Coronavirus Disease 2019 – COVID-19. 2020; [Electronic resource] URL: <https://www.preprints.org/manuscript/202003.0001>. Accessed: 23.03.2020.
19. Guan W., Ni Z., Hu Y. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.
20. Lai C.C., Shih T.P., Ko W.C., Tang H.J., Hsueh P.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55 (3): 105924. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>.
21. Sun J., He W.T., Wang L. et al. COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. *Trends Mol Med.* 2020; 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.02.008>.
22. Wang L., Wang Y., Ye D., Liu Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;105948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105948>.
23. Rajgor D.D., Lee M.H., Archuleta S., Bagdasarian N., Quek S.C. The many estimates of the COVID-19 case fatality rate. *Lancet Infect Dis.* 2020; DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30244-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30244-9).
24. Wang Y., Liu Y., Liu L., Wang X., Luo N., Ling L. Clinical outcome of 55 asymptomatic cases at the time of hospital admission infected with SARS-Coronavirus-2 in Shenzhen, China. *J Infect Dis.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa119>.
25. Hu Z., Song C., Xu C. et al. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci China Life Sci.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1661-4>.
26. Temporary guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 4. Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow; 2020 (In Russ).
27. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Surveillance and case definitions. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>. Accessed: 12.03.2020.
28. Wang C.J., Ng C.Y., Brook R.H. Response to COVID-19 in Taiwan. *JAMA.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3151>.
29. Decree of the President of the Russian Federation of March 25, 2020 No. 206 “On the announcement of non-working days in the Russian Federation” *Russian Newspaper – Federal Issue.* 2020; 66 (8120) (In Russ).
30. Tellis G.J., Sood A., Sood N. How Long Should Social Distancing Last? Predicting Time to Moderation, Control, and Containment of COVID-19. *SSRN Electron J.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3562996>.
31. Guriev S. GDP or people’s lives. *Vedomosti* (In Russ). [Electronic resource] URL: <https://www.vedomosti.ru/opinion/articles/2020/03/27/826385-vvp-lyudei?fbclid=IwAR1ftEZN050VJd3cU9mNptx8RC3lWdNIADJVFv5D9AxaNZElqme2a0ApU4Y>. Accessed: 26.03.2020.
32. Coronavirus and FMCG trends in Russia: new reality and new opportunities. *Nielsen* 2020. (In Russ).
33. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. [Electronic resource]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Accessed: 23.03.2020
34. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Accessed: 12.02.2020.
35. Reagent kit for detecting 2019-nCoV coronavirus RNA by PCR with hybridization-fluorescence detection “Vektor-PTsRrv-2019-nCoV-RG” po TU 21.20.23-088-05664012-2020. [Electronic resource] URL: <https://nevacert.ru/reestr/med-reestr/rzn-2020-9677-41240>. Accessed: 11.03.2020. (In Russ).
36. Konrad R., Eberle U., Dangel A. et al. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in

Bavaria, Germany, February 2020. *Eurosurveillance*. 2020; 25 (9). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173>.

37. Pfeifferle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Eurosurveillance*. 2020; 25 (9). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152>.

38. Won J., Lee S., Park M. et al. Development of a Laboratory-safe

and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*. March 2020. DOI: <https://doi.org/10.5607/en20009>.

39. Registration certificate No. RZN 2020/9948 for a medical device "Reagent kit for detecting RNA of SARS-CoV coronaviruses and similar SARS-CoV by real-time reverse transcription and polymerase chain reaction (SARS-CoV-2/SARS-CoV)". 2020. (In Russ).

Сведения об авторах:

Гончарова Елена Васильевна – к.б.н., в.н.с. ООО «НПФ ДНК-Технология».

Донников Андрей Евгеньевич – к.м.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Кадочникова Владислава Викторовна – к.б.н., с.н.с. ООО «НПФ ДНК-Технология».

Морозова Светлана Андреевна – руководитель отдела регистрации ООО «ДНК-Технология».

Болдырева Маргарита Николаевна – д.м.н., медицинский директор ООО «ДНК-Технология». ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>.

Галкина Ирина Сергеевна – к.х.н., директор по маркетингу ООО «ДНК-Технология». ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7279-4362>. E-mail: Galkina@dna-technology.ru.

Блинов Дмитрий Владиславович – к.м.н., руководитель по медицинским и научным вопросам, Институт Превентивной и Социальной Медицины; врач-невролог, Клинический Госпиталь Лапино, ГК «Мать и Дитя». ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3367-9844>. Researcher ID: E-8906-2017. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3367-9844>. RSCI: 9779-8290.

About the authors:

Elena V. Goncharova – PhD, Senior Researcher, LLC "NPF DNA-Technology".

Andrei E. Donnikov – MD, PhD, Head of the Laboratory of Molecular Genetic Methods, FSBI "National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology n.a. Academician V.I. Kulakov" Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Vladislava V. Kadochnikova – PhD, Senior Researcher, LLC "NPF DNA-Technology".

Svetlana A. Morozova – Head of Registration, LLC "DNA Technology".

Margarita N. Boldyreva – MD, Dr Sci Med, Medical Director, LLC "DNA Technology". ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>.

Irina S. Galkina – PhD, Marketing Director, LLC "DNA Technology". ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7279-4362>.

Dmitry V. Blinov – MD, PhD, MBA, Head of Medical and Scientific Affairs, Institute for Preventive and Social Medicine; Neurologist, Lapino Clinic Hospital, MD Medical Group. Researcher ID: E-8906-2017; ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3367-9844>. RSCI: 9779-8290.