

К ВОПРОСУ О ТОЧНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-2019

Куличенко А.Н., Саркисян Н.С.

Своевременная и качественная диагностика – один из ключевых факторов в борьбе с COVID-19. Сегодня метод полимеразная цепная реакция (ПЦР) является своего рода «золотым стандартом» при диагностике вирусных и ряда других инфекций. Поэтому, вполне очевидно, что именно ПЦР стала основой лабораторного диагноза при COVID-19.

Значительно реже для диагностики COVID-19 применяли другой молекулярно-генетический тест - петлевую изотермическую амплификацию (LAMP). Аналитическая чувствительность метода LAMP при диагностике новой коронавирусной инфекции определена как ~ 10 г.-э./мл [4] диагностическая чувствительность метода, описанная в публикациях специалистов из Китая, составляла в среднем 98 %, специфичность - 99 % [11, 44, 45]. К преимуществам LAMP относят изотермичность реакции, быстроту постановки, возможность работы с нативным образцом и визуального учета результатов. В то же время сложности эксплуатации наборов, возникновение неспецифичной флуоресценции, проблемы с созданием мультиплексных вариантов – причины, сдерживающие внедрение метода, так и не получившего широкого распространения.

Многие страны, в том числе Китай, США, в начале вспышки COVID-19 сталкивались с проблемой точности диагностики [2].

О диагностической точности применяемых тест-систем (методов) судят, в первую очередь, на основании оценки их чувствительности и специфичности.

Принятая для тест-систем аналитическая чувствительность метода ОТ-ПЦР составляет величину порядка 1×10^3 г.-э./мл. Широко используемый в Российской Федерации диагностический набор производства ФБУН ГНЦ ВБ

«Вектор» Роспотребнадзора («Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG») детектирует 1×10^5 копий/мл (инструкция по применению набора «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG», [14]), наборы «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «COVID-2019 Amp» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) - 1×10^3 г.-э./мл (инструкции к наборам реагентов). Повышение аналитической чувствительности может достигаться путем увеличения количества РНК-мишеней до двух и более.

На 1 ноября 2020 г. методом ПЦР в мире проведено более 750 млн. исследований по выявлению вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР, при этом диагностическая чувствительность существующих тест-систем составляла по данным различных авторов – 60-98 % [3, 12, 27, 43].

На точность диагностики оказывает влияние целый ряд факторов. Причинами ложноотрицательных результатов молекулярных тестов могут быть недостаточное количество генетического материала вируса в пробе, сроки и погрешности при отборе биологических образцов.

Также существует возможность получения при постановке ПЦР ложноположительных ответов. Несмотря на уменьшение рисков ДНК (РНК)-контаминации при выполнении ПЦР в реальном времени, по сравнению с электрофорезным форматом учета результатов, эта проблема сохраняет свою значимость и требует высокого уровня организации лабораторных исследований, особенно при их значительных объемах. При этом следует иметь в виду, что положительные ответы ПЦР не означают присутствие в образце живого вируса, так как метод выявляет только фрагменты РНК - маркеры SARA-CoV-2.

Вопросы точности лабораторного исследования неразрывно связаны с особенностями выполнения преаналитического и аналитического этапов диагностики. Можно выделить следующие факторы, во многом определяющие точность диагностического анализа, которые необходимо учитывать при планировании и выполнении преаналитического этапа работ.

1. Обследуемая группа (выборка) и сроки забора материала.

В зависимости от времени, прошедшего после начала заболевания и клинических проявлений (тяжести течения) вероятность нахождения вируса в исследуемых биологических образцах может меняться [35]. Это напрямую влияет на точность лабораторного диагноза. При оценке диагностической чувствительности тест-систем на новую коронавирусную инфекцию обычно выделяют следующие группы пациентов (больных COVID-19):

1) больные с выраженными клиническими проявлениями (повышение температуры $> 38^{\circ}\text{C}$, кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты), одышка, миалгия, чувство «стеснения» в грудной клетке, полиорганная недостаточность, изменения при КТ легких значительные или субтотальные, развитие острого респираторного дистресс синдрома;

2) больные с незначительными клиническими проявлениями (повышение температуры до 38°C , боль в горле, насморк, отсутствие обоняния и вкуса, одышка, утомляемость, признаки конъюнктивита, изменения при КТ легких - типичные для вирусного поражения, объем поражения минимальный или средний) [1];

3) пациенты с бессимптомным течением.

В течение 5-6 дней от начала появления симптомов определяется наиболее высокая вирусная нагрузка в верхних дыхательных путях и, в меньшей степени, в нижних [32, 50]. На второй неделе болезни отмечается увеличение частоты детекции вирусной РНК в бронхо-легочном материале [38].

Представляет интерес вопрос возможности детекции РНК вируса в инкубационный период, который составляет от 1 до 14 дней, в среднем 5 дней [13]. Установлено, что РНК вируса SARS-CoV-2 выявляется у пациентов за 1–3 дня до появления симптомов [7, 17, 26, 30, 32, 36, 38, 41, 46, 47, 49, 50]. Приводятся данные, что высокая концентрация вируса SARS-CoV-2 в верхних дыхательных путях в этот период и в начале появления симптомов (5 дней) сочетается с наивысшим риском передачи инфекции [30, 49]. Также имеются результаты наблюдений, свидетельствующие, что вирусная нагрузка в верхних

дыхательных путях может быть одинаковой у людей как с симптоматикой, так и при бессимптомном течении болезни [15].

Приводятся данные, что при взятии материала у больных группы наблюдения в первый день проявления симптомов положительный ответ имел место с частотой в среднем - 94 %, к 10-му дню - 67 % [39].

Сведения о диагностической чувствительности ПЦР в различные сроки после появления симптомов заболевания приведены в таблице 1. У некоторых пациентов вирусная РНК может определяться на протяжении всего нескольких дней, тогда как у других лиц она определяется в течение нескольких недель и, возможно, месяцев [6, 19, 24, 48]. Тяжелые больные остаются ПЦР-положительными дольше, чем пациенты с легким течением заболевания [5, 35].

Таблица 1. Диагностическая чувствительность метода ПЦР при исследовании материала в различные сроки болезни

Table 1. Diagnostic sensitivity of the PCR method in the study of the material at different times of the disease

Диагностическая чувствительность (%) Diagnostic sensitivity (%)	Сроки заболевания Terms of the disease	Ссылка на источник Link to source
> 90 %	В течение 1-3 дней после появления симптомов и до 5 дня болезни Within 1-3 days after the onset of symptoms and up to 5 days of illness	[5,35]
до 80 % up to 80 %	На 6-й день on the 6th day	[5]
до 70-71 % up to 70-71 %	На 9-11 дни for 9-11 days	[35]
< 50 %	На 14-й день on the 14th day	[5]
< 30 %	На 21 день for 21 days	[35]

2. *Исследуемый биоматериал.* Приводятся данные, что клинический биоматериал из нижних дыхательных путей (мокрота, эндотрахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж) имеет больший процент выявления (детекции) РНК SARS-Cov-2, чем образцы из верхних дыхательных путей (ротоглотки и носоглотки) [34].

Частота выявления РНК SARS-Cov-2 на первой неделе заболевания в мазках из носоглотки составляла – 63 %, из ротоглотки – 32 %, из бронхоальвеолярного лаваж - 93% [34], из мокроты – 95 % и из слюны – 95 % [5]. Представляют интерес данные об эффективности исследования методом ПЦР воды после полоскания ротовой полости в течение 10 сек [31].

Низкий показатель обнаружения РНК SARS-Cov-2 имеет место при исследовании буккальных соскобов, мочи, крови и фекалий [18]. Отмечено, что детекция с помощью ПЦР вируса в кале не является специфическим признаком острого периода инфицирования. Генетический материал вируса может сохраняться в фекалиях до 1 месяца [5].

Показано, что чувствительность ПЦР при исследовании образцов из верхних дыхательных путей при первичном тестировании составила - 82,2 %, а после двух последовательных тестов - 90,6 % [40].

Таким образом, очевидна важность учета вида исследуемого материала и сроков его забора для понимания точности ПЦР-анализа при обследовании на COVID-19.

3. Порядок отбора и хранение проб - включает соблюдение правил преаналитического этапа исследований: взятия клинического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки), условий хранения и транспортировки. Основные негативные факторы – недостаточное количество биологического материала на зонде, высыхание зондов (тампонов) после забора пробы, длительное хранение при положительных температурах.

Аналитический этап при выполнении ПЦР (методов амплификации нуклеиновых кислот) во многом определяется «эффективностью» праймеров и зондов («запас прочности» тест-системы). За рубежом для детекции используют различные специфичные для SARS-Cov-2 участки генома вируса: N, E, S, RdRp, ORF (1AB) RdRp/Не1 [8, 9, 20, 22, 35]. В Российской Федерации к 3 сентября 2020 г. было зарегистрировано 34 препарата, выявляющих N, E, S, ORF1ab, ORF8 и другие фрагменты РНК вируса.

Заслуживает внимания опыт применения для снижения частоты сомнительных результатов мультилокусных (на две и более мишени) ПЦР тест-систем. Например, CDC (США) предложен диагностический набор – «2019-nCoV» с праймерами-зондами для двух областей гена нуклеокапсида N, а также гена РНКазы Р [16]. В рекомендациях ВОЗ приводится другой набор праймеров: фрагмент гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) и гена

оболочки (E). При этом было показано, что обе тест-системы имеют одинаковую высокую чувствительность и специфичность [8, 9, 43]. Оценивая аналитическую чувствительность ПЦР тест-систем, следует учитывать влияние дизайна праймеров и зондов на эффективность специфической амплификации.

Сравнительная точность ПЦР-анализа и компьютерной томографии при диагностике COVID-19.

Важный вопрос – сравнительная точность двух основных методов диагностики COVID-19: ОТ-ПЦР и компьютерной томографии (КТ). Текущие исследования в Китае показывают, что КТ более чувствительный метод диагностического тестирования новой коронавирусной инфекции, позволяющий установить точный диагноз быстрее, в среднем на 3 дня [25, 45]. Однако КТ не дает возможности отличить пневмонию, вызванную SARS-CoV-2 от других вирусных пневмоний, а ложноотрицательные результаты составляют более 12 % [2]. Также данные КТ не всегда коррелируют с тяжестью заболевания.

В Китае провели ретроспективное исследование для оценки диагностической точности применяемых методов, в которое включили всех пациентов с подозрением на пневмонию, вызванную COVID-19. В первые дни болезни им проводили КТ и ПЦР. Чувствительность КТ составила 97,2%, тогда как чувствительность ПЦР в этот период составила 83,3% [28].

Национальная комиссия здравоохранения Китая пересмотрела диагностические критерии в апреле 2020 года, согласно которым клинический диагноз COVID-19 устанавливается по наличию пневмонии на КТ грудной клетки, независимо от результатов ОТ-ПЦР.

Безусловно, молекулярные методы более специфичны, так как нацелены на идентификацию конкретного патогена. Сравнительный анализ показателей диагностической точности этих двух методов представлен в таблице 2. Оптимально для постановки диагноза COVID-19 проведение и КТ, и лабораторного теста (ПЦР). На практике имеют место случаи несовпадения

положительных результатов этих методов [23]. В таблице 3 приведены примерные алгоритмы действий при возникновении таких ситуаций.

Таблица 2. Сравнительная характеристика инструментального (КТ) и лабораторного (ПЦР) методов диагностики COVID-19

Table 2. Comparative characteristics of instrumental and laboratory methods diagnostics of COVID-19

Показатели Parameter	Лабораторный метод исследования (ПЦР) Laboratory method research (PCR)	Инструментальный метод исследования (компьютерная томография легких) Instrumental method research (computed tomography of the lungs)
Диагностическая чувствительность Diagnostic sensitivity	82,2-90,6 % [40] 83,3 % [28]	96 % [42] 97 % [2] 97,2 % [28] 98 % [10]
Диагностическая специфичность Diagnostic specificity	>99 % [29] 99,9-100 % [40]	Частота ложноположительных ответов - 25% [2] The frequency of false positive responses - 25% [2]
Сроки заболевания и максимальная чувствительность метода Duration of the disease and maximum sensitivity of the	Через 5-6 дней от начала появления симптомов [32, 50] 5-6 days after the onset of symptoms [32, 50]	2-4 день болезни, достигая максимума на 9-13 день [21, 25, 45] 2-4 days of illness, peaking at 9-13 days [21, 25, 45]

method		
<p>Недостаток метода Lack of method</p>	<p>1.Невозможно отличить «жизнеспособный» вирус от фрагмента его РНК (возможность ложноположительного результата). 1. It is impossible to distinguish a "viable" virus from a fragment of its RNA (possibility of a false positive result). 2. Время выполнения - 4-5 ч, при массовых обследованиях - до 12 ч. 2. Execution time - 4-5 hours, for mass examinations - up to 12 hours</p>	<p>1. Невозможно отличить пневмонию, вызванную SARS-CoV-2 от пневмоний другой природы (низкая специфичность). 1. It is not possible to distinguish between SARS-CoV-2 pneumonia and other pneumonia (low specificity). 2. Ограничен в доступе ввиду необеспеченности КТ учреждений здравоохранения. 2. Limited in access due to the lack of CT in health care institutions. 3. Противопоказан беременным, лицам с рядом заболеваний. 3. Contraindicated in pregnant women, persons with a number of acute and chronic diseases. 4. Развитие аллергической реакции на контрастное вещество. 4. Development of an allergic reaction to a contrast agent. 5. Воздействие</p>

		радиоактивного облучения. 5. Exposure to radiation exposure.
Достоинства метода Advantages of the method	1.Метод высокоспецифичен, нацелен на выявление конкретного патогена. 1. The method is highly specific, aimed at identifying a specific pathogen . 2.Возможность массового тестирования, доступность. 2. Mass testing capability, availability. 3.Себестоимость исследования ниже в сравнении с КТ. 3.The cost of the study is lower in comparison with CT.	1. Быстрый и легко выполнимый метод исследования 1. Fast and easy to carry out research method

Таблица 3. Алгоритм действий при отличающихся результатах ПЦР и КТ при диагностике COVID-19
[1, 2, 21, 28, 33, 37]

Table 3. Algorithm of actions for different PCR and CT results in the diagnosis of COVID-19
[1, 2, 21, 28, 33, 37]

Результаты диагностики	
ПЦР (-) PCR (-)	КТ (+) СТ (+)
<p>При наличии эпидситуации пациентов изолируют. ПЦР должна быть проведена повторно в связи с тем, что положительные результаты КТ могут быть в среднем на 3 дня раньше, чем ПЦР.</p> <p>Patients in the presence of an epidemiological situation are isolated. RT-PCR should be repeated as CT positive results can occur on average 3 days earlier than RT-PCR.</p>	
ПЦР (+) PCR (+)	КТ (+) СТ (+)
<p>Клинически и лабораторно подтвержденный диагноз. Принимается весь комплекс противоэпидемических и лечебных мероприятий.</p> <p>Clinically and laboratory confirmed diagnosis. The whole complex of anti-epidemic and therapeutic measures is taken.</p>	
ПЦР (+) PCR (+)	КТ (-) СТ (-)
<p>Положительный диагноз при наличии клинической картины и соответствующей эпидситуации (эпиданамнеза). Повторная КТ через 6 дней.</p> <p>Positive diagnosis in the presence of a clinical picture and an appropriate epidemiological situation (epidemiological anamnesis). Repeated CT scan in 6 days.</p>	

Заклучение:

В настоящее время в основе лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции – молекулярно-генетический тест – полимеразная цепная реакция, позволяющая с высокой чувствительностью детектировать нуклеиновые кислоты вируса в любом материале. Как и для других методов прямого обнаружения маркеров патогенного микроорганизма (вируса) при ПЦР-анализе важное значение имеет вероятность нахождения возбудителя инфекции в исследуемом материале. Именно этот фактор следует учитывать

при планировании обследований и интерпретации получаемых с помощью ПЦР результатов.

Данные научных публикаций позволяют достаточно полно охарактеризовать показатели диагностической точности ПЦР-анализа при выявлении вируса SARS-CoV-2 и факторы, оказывающие на них влияние. Это сроки забора материала, с максимальной чувствительностью теста на 5-6 день после появления первых симптомов, тяжесть течения болезни, коррелирующая с продолжительностью детекции маркеров вируса, вид исследуемого материала – большая вероятность нахождения вируса в бронхоальвеолярном лаваже и мокроте (при отделении), по сравнению с материалом из носоглотки и ротоглотки и низкая выявляемость в крови и моче. При этом даже по самым оптимистичным данным диагностическая чувствительность ПЦР не превышает 90 %.

На сегодняшний день алгоритм диагностики новой коронавирусной инфекции включает инструментальный (радиологический) и лабораторный методы исследования. С клинической точки зрения результаты КТ, в сочетании с соответствующим эпидемиологическим анамнезом, могут быть использованы в качестве первого и непосредственного ориентира для врачей с целью начала лечения и принятия необходимых противоэпидемических мер, в то время как ПЦР служит инструментом подтверждения, результаты которого могут быть использованы позже для принятия решения о последующих действиях (изоляция, лечение). Но в то же время необходимо отметить, что здравоохранение многих стран столкнулось с нехваткой компьютерных томографов и квалифицированных специалистов, что делает данный метод недоступным для полномасштабных исследований, в отличие от лабораторного молекулярно-генетического теста. ПЦР-анализ незаменим для обследований контактных лиц, мониторинга заболеваемости.

Таким образом, именно комплексный подход с использованием ПЦР и КТ, с учетом факторов, влияющих на точность диагностики, позволяет обеспечить получение достоверных результатов, правильно интерпретировать

их, что необходимо как для постановки верного диагноза конкретному больному, так и для получения объективных данных о заболеваемости населения, своевременного принятия решений о проведении необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий.