УДК 578.834:616.988.7-036.21/.22:616.327.2-008.8-072:57.085

DOI: <https://doi.org/10.22141/2306-2436.10.6.2021.280>

Обертинська О. В.

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ, Україна

ДІАГНОСТИЧНИЙ ІНСТРУМЕНТ ДЛЯ БОРОТЬБИ З ПАНДЕМІЄЮ ТА ТОЧНІСТЬ БІОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ SARS-COV-2

Резюме. Актуальність. Пандемія спричинена новим коронавірусом SARS-CoV-2 продовжує справляти безпрецедентний вплив на соціальні аспекти суспільства та економіку всього світу. Для запобігання та контролю передачі COVID-19, моніторингу інфекції залишається постійна потреба у високоефективних технологіях для ідентифікації збудника чи його маркерів. Важливим інструментом і золотим стандартом ідентифікації коронавірусної хвороби (COVID-19) є молекулярно-генетичні технології, а саме метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (RT-PCR) для виявлення маркерів рибонуклеїнових кислот (РНК) гострого респіраторного синдрому коронавірусу - 2 (SARS-CoV-2) у зразках різного типу біологічного матеріалу, з визначених найбільш імовірних за локалізацією збудника місць організму людини доступних для відбору. Досліджували біологічний матеріал мазків з носу (NS), слину (SS), хоча достовірні дані про їх точність використання обмежені. Для цього ми провели вивчення діагностичної цінності та точності зібраних зразків різного біологічного матеріалу: носоглотки/носу/слини (NPS/NS/SS). **Матеріали та методи.** Тридцять пацієнтів були включені після позитивного тесту на SARS-CoV 2 RT-PCR у зразках NPS відповідно до чинного наказу № 662 МОЗ України «Методичні рекомендації "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції", рекомендацій ВООЗ щодо збору, обробки та тестування клінічних зразків на COVID-19. У порівнянні з цим рекомендованим методом дослідження, зразки NPS/NS/SS були протестовані за допомогою автоматизованої портативної системи виявлення HK ExiStation 48 (Bioneer Corporation, Південна Корея). Щоб дослідити доцільність та корисність методу системи ExiStation 48 та різницю між типами вибірок біологічних зразків, було розраховано специфічність та чутливість. Від кожного пацієнта було відібрано три – п'ять зразків за загальний період досліджень 6 – 9 днів. **Результати.** Було відібрано 171 комплект зразків NPS/NS/SS, з яких 122 дали позитивний результат на COVID-19 методом RT-PCR з біологічного матеріалу NPS. У цілому, коефіцієнт конкордантності щодо типів біологічного матеріалу були 82,0 %/68,2 %/50,4 % для зразків NPS/NS/SS (системи ExiStation 48); однак для зразків, зібраних на 9-й день після початку захворювання (66 негативних і три позитивні зразки), відповідні показники були 91,7 %/80,0 %/65,2 %. Загальні оцінки чутливості були 100,0 %/67,5 %/37,5 % для зразків NPS/NS/SS (системи ExiStation 48). Для зразків до 7 днів після початку захворювання значення були 98,0 %/84,4 %/64,6 %. **Висновки.** Біологічний матеріал зразків відібраних із нижнього носового ходу (вводимо кінчик тампона в ніздру на 2-3 см від носового отвору, торкаючись передньої носової раковини і слизової оболонки перетинки) NS є більш надійними, ніж зразки SS, і можуть бути альтернативою біологічним зразкам NPS зібраними і доставленими у транспортному середовищі для вірусів з лізуючим компонентом. Отже, біологічний матеріал зразків відібраний з передньої носової раковини в спеціальне транспортне середовище з лізуючим компонентом можуть бути рекомендованими для досліджень методом RT-PCR для діагностики COVID-19 під час епідемії чи підйому захворюваності щодо ГРВІ з метою диференційної діагностики.

Ключові слова: діагностичний інструмент; біологічний матеріал; типи біологічного матеріалу; мазок з носоглотки; мазок з носу; слина; RT-PCR; SARS-CoV-2; COVID-19

© «Здоров'я суспільства» / «Health of Society» («Zdorov'a suspil'stva»), 2021

© Видавці Міжнародна громадська організація «Міжнародна асоціація «Здоров'я суспільства», Заславський О.Ю. / Publishers International Public Organization "International Association "Health of Society", Zaslavsky O.Yu., 2021

Для кореспонденції: Обертинська О. В., Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожичська, 9, м. Київ, 04112, Україна; e-mail: oksana.obertynska@gmail.com

For correspondence: Obertynska O. V., Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Dorogozhytska str., 9, Kyiv, 04112, Ukraine; e-mail: oksana.obertynska@gmail.com

Вступ

Наприкінці 2019 року коронавірусна хвороба (COVID-19) поширилася по всьому світу і створила загрозу для громадського здоров'я суспільства. COVID-19, що спричинив не аби-які занепокоєння в світі і був ідентифікований як важкий гострий респіраторний синдром коронавірусу 2 (SARS-CoV-2) і має філогенетичну схожість з SARS-CoV [1].

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оголосила спалах COVID-19 надзвичайною ситуацією в галузі охорони здоров'я 30 січня 2020 року [2]. Більшість пацієнтів, інфікованих SARS-CoV-2, мали гострий початок лихоманки, кашель, задуху та рентгенологічні ознаки матового помутніння легень, сумісного з атиповою пневмонією [3]. Точність результату застосованих лабораторних технологій насамперед залежить від того, наскільки правильно відібраний біологічний матеріал для дослідження в імовірно правильно обраному місці локалізації даного збудника. Водночас з'являється нагальна потреба в ефективних, швидких діагностичних інструментах, завдяки яким вдасться контролювати і попереджувати інфекцію, проводити моніторинг та ефективно запобігати їй.

Сьогодні золотим стандартом підтвердження та виявлення COVID-19 є молекулярно-генетичні технології: метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотньою транскрипцією у реальному часі різний за конструюванням (RT-PCR) для виявлення нового вірусу SARS-CoV-2 зі зразків мазка носоглотки (NPS). ВООЗ рекомендувала зразки NPS для виявлення SARS-CoV-2 [4].

Отримання біологічного матеріалу від хворого викликає дискомфорт у пацієнта та спричинює ризики передачі інфекції медичному персоналу. Отже маємо підібрати той біологічний матеріал, який би відбирався легко, швидко, був інформативним щодо обраних діагностичних технологій ідентифікації і значно зменшував час контакту інфікованого пацієнта з медичним персоналом — таким біологічним матеріалом можуть бути мазки із носу (NS) та слина (SS) (включаючи самозабір) [5, 6].

Центри контролю та профілактики інфекційних захворювань (ЦКПХ), МОЗ України та Асоціація інфекційних захворювань США рекомендували відбирати для діагностичного тестування на SARS-CoV-2 біологічні зразки NPS, NS та SS або об'єднані до одного спільного зразку з імовірною локалізацією збудника та проводити ідентифікацію збудника за допомогою RT-PCR [7, 8, 9].

Діагностична чутливість різних типів біологічного матеріалу ще до сьогодні обговорюється і вивчається науковцями різних країн та різних наукових спільнот. Результати попередніх досліджень вказують на те, що зразки NS і SS можуть забезпечити подібну чутливість до NPS, однак досі не було з'ясовано на скільки вони є сприйнятливими та результативними в застосуванні на практиці [10].

Проведені порівняльні дослідження з виявлення РНК-вірусу SARS-CoV-2 в біологічному матеріалі маз-

ків NS та SS з отриманими результатами досліджень у біологічному матеріалі зразків NPS можуть допомогти вирішити проблеми, що пов'язані з недостатнім забезпеченням засобами індивідуального захисту медперсоналу для збору зразків, одночасно допомагаючи збільшити кількість проведених тестів на COVID-19. Для порівняння показників виявлення між зразками були зібрані зразки NPS, NS і SS у пацієнтів з діагнозом COVID-19 і проаналізовані за допомогою RT-PCR. Послідовні зразки також були зібрані у тих же пацієнтів, щоб з'ясувати часові зміни вірусного навантаження SARS-CoV-2 і дослідити їх вплив на достовірність результатів випробувань, отриманих на основі зразків NPS, NS і SS.

Матеріали та методи

Дослідження було проведене серед осіб з діагнозом COVID-19 серед пацієнтів України у період з вересня 2020 року по листопад 2021 року. Виявлений випадок COVID-19 був визначений як позитивний за допомогою RT-PCR з біологічного зразка NPS відповідно до Наказу МОЗ України №772 від 20 березня 2020 року з наступними змінами відповідно до часу перебігу епідемії в Україні [8, 9].

Біологічний матеріал типів зразків NPS, NS і SS були зібрані одночасно у пацієнтів у цілому 4-5 разів через встановлені проміжки часу. Перші три зразки збиралися через день, починаючи з дня вперше виявленого збудника у пацієнта, а п'ятий був зібраний у день одужання; якщо п'ятий зразок був негативним, на наступний день був узятий шостий зразок для верифікації попереднього результату дослідження; в іншому випадку зразки бралися з інтервалом 5 днів і більше. Пацієнти, у яких виявили COVID-19 вперше після контакту з імовірно хворим через 8 годин, і особи у віці до 20 років були виключені з досліджень. Були зібрані дані про характеристики анамнезу пацієнта, симптомів на початку і під час госпіталізації та оцінено відповідно до національної класифікації тяжкості здоров'я.

Крім того при зборі анамнезу захворювання пацієнтів у кожній з вищеназваних точок збору зразків запитували, чи є у них виділення з носа і втрата відчуття смаку або нюху. У пацієнтів уточнювали чи вживали вони їжу протягом останніх 2 годин або використовували будь-яку антибактеріальну терапію, зубну пасту або полоскали рота протягом останніх 6 годин перед відбором біологічного матеріалу для досліджень, з метою відслідкувати вплив цих факторів на стабільність зразків SS та NS.

Біологічні матеріали у вигляді NPS були зібрані за допомогою комплекту стерильної пробірки з 1 мл універсального транспортного засобу з лізуючим компонентом та тампоном з велюру/дакрону (UTM, COPAN Diagnostics Inc., Італія) або за допомогою комплекту для забору: стерильна пробірка 1 мл з транспортним вірусним середовищем (VLM) з лізуючим компонентом гуанідин та тампонами з дакрону/віскози (ТОВ «ЛП Діагностик, Україна»). Зразки NS були зібрані за допомогою сухих велюру/дакрон/віскоза-тампонів у вірус-

не транспортне середовище з лізуючим компонентом. Для збору зразку сваб на пластиковій основі з одним із перелічених видів тампонів було вставлено приблизно на 1-2 см у кожну ніздрю та здійснено декілька кругових обертань впродовж 5 с з кожного боку і переміщено до транспортного середовища UTM, COPAN чи VLM, ЛП Діагностик для збереження та доставки в лабораторію дотримуючись правил преаналітичного етапу. Зразки слини (SS), були зібрані за допомогою набору для забору слини Saliva Collection Kit (Bioneer, Південна Корея). Зразки SS були зібрані спочатку самим пацієнтом (без нагляду лікаря, якщо пацієнт не в змозі зібрати власний зразок, попередньо масуючи м'яз щелепи для покращення слинного потоку) за допомогою комплексу Saliva Collection Kit: воронки та пробірки з транспортним середовищем у кількості 2 мл. Потім медичний працівник відбирав зразки послідовно NS, а потім зразок NPS. Зразки збиралися 4-5 разів від кожного пацієнта в різні дні, причому перші три набори зразків збирали протягом 2 тижнів після початку захворювання.

Обробка зразків

Усі зразки були протестовані у відповідні дні збору біологічного матеріалу, використовуючи систему Accupower® SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR на пристрої ExiStation 48 (Bioneer, Південна Корея). Зразки відібрані в транспортні середовища UTM/VLM, що містить NPS, зберігалися при температурі нижче -70°C до тестування SARS-CoV-2 RT-PCR у режимі реального часу ПЛР-системи за допомогою термоциклерів QuantStudio-5 (Thermo Fisher Scientific, США) чи CFX-96 (Bio Rad, США). Результати тесту вважалися позитивними, коли підйом кривої посилення спостерігається циклом 38-40 у будь-якому або обох наборах зразків N2. Наступні результати RT-PLR зразка NPS, зразка NS та зразка SS з використанням ExiStation 48 відповідно.

Статистичний аналіз

Показники конкордантності визначалися як відсоток узгодження результатів RT-PCR. Порівнюючи зразок NPS (національний протокол надання медичної допомоги) із зразком NPS/NS/SS QuantStudio-5 (Thermo Fisher Scientific, США) чи CFX-96 (Bio Rad, США) та шляхом прямого порівняння зразка NPS із зразком NS/SS ExiStation 48 (Bioneer Corporation, Південна Корея), метод ExiStation 48 не поступається звичайним ручним методам екстракції та ампліфікації, провели оцінку діагностичної корисності кожного біологічного зразка. Чутливість, специфічність та коефіцієнти конкордантності для результатів RT-PCR, а також їх 95% довірчих інтервали (ДІ) були розраховані за допомогою коефіцієнту Каппа Коена (угода між двома оцінювачами, кожен із яких класифікує N предметів на C взаємовиключних категорій). Дисперсійна оцінка надійності між оцінювачами за номінальною шкалою з випадковим вибором оцінювачів Гвета була також розрахована, так як вважається більш надійним,

ніж коефіцієнт Каппа Коена, які можуть варіюватися в залежності від оцінки поширеності [11, 12].

Щоб оцінити, чи відображають біологічні зразки NS і SS вірусне навантаження, отримане з використанням зразків NPS, значення порогу циклу (Ct) та кількість копій були оцінені та повідомлені як медіана та міжквартильний діапазон, порівняні за допомогою тесту суми рангів Вільксона, скільки ці змінні слідували за ненормальними розподілами. Однофакторний аналіз проводили за допомогою точного критерію Фішера або критерію Хі-квадрат. Ці статистичні аналізи були проведені з використанням програмного забезпечення (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), де значення $p < 0,5$ вважалися статистично значущими. Для того, щоб оцінити залежну від часу зміну значення Ct для кожного зразка, тест Джонккір-Терпстра проводили з EZR [13], яка є модифікованою версією R Commander, розробленою для включення статистичних функцій, які часто використовуються в біостатистиці.

Результати

У цьому дослідженні взяли участь тридцять пацієнтів з діагнозом COVID-19. Усі пацієнти були українцями. Їх середній вік становив 49 років (діапазон, 30-80 років). 24 з них були чоловіками, а 6 — жінками (три з яких були вагітні). Відповідно до національної класифікації тяжкості здоров'я 21 пацієнт мав легкий ступінь, 6 — помірний ступінь тяжкості захворювання, і три пацієнти мали важкі та критичні стани захворювання (Табл.1).

Конкордантність, чутливість і специфічність

Усього було зібрано 171 комплект зразків NPS, NS та SS. У цілому, 124 зразки були позитивними в зразках NPS (Національний стандарт (НС)), і, в цілому, 144 зразки були позитивними для зразків NPS ExiStation 48 (Bioneer Corporation, Південна Корея). Швидкість відповідності, чутливість і специфічність для кожного зразка, у порівнянні зі зразками NPS (НС), показані в таблиці 2, а ті, що порівнюються зі зразками QuantStudio-5, (Thermo Fisher Scientific, США) чи CFX-96 (Bio Rad, США), показані в таблиці 3.

Коефіцієнти відповідності для всіх зразків (124 позитивних і 47 негативних у зразках NPS (НС)) були 82,0 % (κ 0,612, AC_1 0,783), 68,2% (κ 0,382, AC_1 0,437) та 50,4% (κ 0,285, змінного струму μ 0,158) для зразків NPS, NS і QuantStudio-5 (Thermo Fisher Scientific, США) чи CFX-96 (Bio Rad, США) відповідно. При оцінці зразків, зібраних до 9-го дня після початку захворювання (66 позитивних і 3 негативних у зразках NPS (НС)), показники відповідності для зразків NPS, NS і SS ExiStation 48 (Bioneer Corporation, Південна Корея) були 91,7 % (κ 0,0, C_1 0,955), 80,0 % (κ 0,355, AC_1 0,838) та 65,2 % (κ 0,132, AC_1 0,473), відповідно.

Значення Ct для зразків з послідовними результатами

Для 40 зразків NPS, які дали позитивний результат аналізу TaqMan, результати відповідних зразків NS і SS,

як правило, були більш послідовними, коли кількість копій була вищою, а значення Ct було нижчим (рис.1).

Ми дослідили відмінності між значенням Ct і кількістю копій мазка з носоглотки (NPS) і чи були узгоджені результати NPS і відповідного мазка з носа (NS)/проби слини (SS). Порівняння проводили за допомогою тесту Вільсона на суму рангів

Медіані значення Ct зразків NPS (HC) у поєднанні з позитивними зразками NPS/NS/SS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) відповідно, були розраховані як 33,65 (23,16-38,54) для NPS, 34,12 (22,79-38,78)

для NS і 35,34 (29,89-38,01) для SS, при цьому значення Кт збільшується в порядку від NPS через NS до зразків SS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)). Крім того, серед зразків позитивного тестування, отриманих зі зразків NPS і NS, відповідні значення Ct з часом збільшувалися (рис. 2).

Спостерігалось значне «час залежне» збільшення Ct-значень зразків NPS та NS, але для зразків SS (NPS, $p < .001$ не спостерігалось такого значного збільшення; NS, $p = .003$; SS, $p = .585$, тест Джонкхір-Терпстра).

Таблиця 1. Клінічні характеристики госпіталізованих пацієнтів з COVID-19 (n = 30)

Вік, роки, медіана (діапазон)	49 (30–80)	
Стать (n)		
Жіноча	6	
Чоловіча	24	
Поява симптомів	Термін появи симптомів (день)	Під час госпіталізації
Лихоманка (≥ 37,5 °C)	18	5
Кашель	18	8
мокротиння	9	6
Кровохаркання	0	0
Біль у горлі	3	3
Слиз з носа	0	1
Хрипи	0	1
Задишка	9	5
Біль у грудях	3	1
Біль у м'язах	9	0
Болі в суглобах	12	2
головний біль	6	4
Втома	18	7
Болить живіт	0	0
Блювота/нудота	3	1
Діарея	6	2
Історія хвороби в минулому		
Немає	9	
Гіпертонія	6	
Гепатит С	6	
Цукровий діабет	3	
Астма	3	
ВІЛ-інфекція	3	
Тяжкість захворювання		
Помірна	18	
Помірна	6	
Тяжка	3	
Критична	3	
Прийом протівірусних засобів		
Приймали	9	
Не приймали	21	
Прийом системних стероїдів		
Приймали	12	
Не приймали	18	

Обговорення

У нашому дослідженні парних зразків NPS/NS/SS від пацієнтів з COVID-19 було виявлено високу позитивну узгодженість між зразками NPS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) та NPS між зразками NS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) та NPS (ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) протягом 9 днів. Для більшості зразків з непослідовними результатами було помічено початкове зростання кривої росту, але значення Ct сягло ≥ 40 , що призвело до негативної

оцінки, і вказує на те, що вірус був виявлений нижче значення відсікання. Цей висновок свідчить про те, що RT-PCR з використанням обладнання ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) є більш чутливим тестом, ніж звичайний ручний метод, заснований на керівних принципах національного стандарту. Так зразки з високими значеннями Ct можуть бути отримані від досимптомних або безсимптомних пацієнтів [14], висока чутливість ПЛР може допомогти виявити таких пацієнтів на ранній стадії. Тим не менш, слід зазначи-

Таблиця 2. Чутливість, специфічність та швидкість відповідності (коефіцієнт κ , AC1 Гвета) для зразків NPS/NS/SS (ExiStation 48 (Bioneer Corporation, Південна Корея), порівняно зі зразками NPS (HC) ПЛР

День збору зразків			Довідковий NPS (TaqMan)		Чутливість % (95% ДІ)	Специфічність % (95% ДІ)	Каппа Коена (95% ДІ)	Стат-ка Gwet AC1
			Позит.	Негатив.				
Всього	NPS	Позитив	40	8	100 (91,2–100,0)	52,9 (31,0–73,8)	0,612 (0,383–0,842)	0,783
		Негатив	0	9				
	NS	Позитив	27	4	67,5 (52,0–79,9)	76,5 (52,7–90,4)	0,382 (0,151–0,612)	0,437
		Негатив	13	13				
	CC	Позитив	15	1	37,5 (24,2–53,0)	94,1 (73,0–99,0)	0,225 (0,067–0,383)	0,088
		Негатив	25	16				
9 днів після початку хвороби	NPS	Позитив	22	1	100,0 (85,1–100,0)	NA	0,0 (0,0–0,0)	0,955
		Негатив	0	0				
	NS	Позитив	19	0	86,4 (66,7–95,3)	NA	0,355 (-0,165 до 0,875)	0,838
		Негатив	3	1				
	CC	Позитив	14	0	63,6 (43,0–80,3)	NA	0,132 (-0,109 до 0,373)	0,473
		Негатив	8	1				
Перші зібрані екземпляри	NPS	Позитив	30	0	100,0 (72,2–100,0)	NA	NA	1,0
		Негатив	0	0				
	NS	Позитив	30	0	100,0 (72,2–100,0)	NA	NA	1,0
		Негатив	0	0				
	CC	Позитив	18	0	60,0 (31,3–83,2)	NA	NA	0,412
		Негатив	12	0				

Таблиця 3. Чутливість, специфічність і швидкість відповідності (коефіцієнт κ , AC1 Гвета) для зразків NS /SS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)), у порівнянні зі зразками NPS (QuantStudio 5 чи CFX-96)

День збору зразків			Довідковий NPS (TaqMan)		Чутливість % (95% ДІ)	Специфічність % (95% ДІ)	Каппа Коена (95% ДІ)	Стат-ка Gwet AC1
			Позит	Негатив				
Загалом	NS	Позитив	30	1	62,5 (48,4–74,8)	88,9 (56,5–98,0)	0,291 (0,091–0,490)	0,420
		Негатив	18	8				
	SS	Позитив	16	0	33,3 (21,7–47,5)	100,0 (70,1–100,0)	0,136 (0,036–0,236)	–0,106
		Негатив	32	9				
Протягом 9 днів після початку	NS	Позитив	19	0	82,6 (62,9–93,0)	NA	NA	0,793
		Негатив	4	0				
	SS	Позитив	14	0	60,9 (40,8–77,8)	NA	NA	0,429
		Негатив	9	0				
Перші зібрані екземпляри	NS	Позитив	10	0	100,0 (72,2–100,0)	NA	NA	1,0
		Негатив	0	0				
	SS	Позитив	6	0	60,0 (31,3–83,2)	NA	NA	0,412
		Негатив	4	0				

ти, що навіть, якщо використовувати обладнання для автоматичної екстракції та ампліфікації ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) RT-PCR для виявлення позитивних знахідок, зразки NPS, зібрані на пізніх стадіях захворювання, можуть виявляти лише неінфекційний стан з життєздатним вірусом і високим його навантаженням. Позитивні результати RT-PCR, отримані від пацієнтів, протестованих більш ніж через 10 днів після початку захворювання, які рідше заражають інших, були зареєстровані [15,16].

У випадках з позитивним результатом тесту в такому випадку ізоляція пацієнта та його відповідне лікування не вимагаються. Отримані результати свідчать про важливість інтерпретації результатів RT-PCR зразків NPS у ширшому контексті з врахуванням клінічних характеристик пацієнтів, включаючи симптоматику захворювання та термін за кількістю днів від початку захворювання. Крім того, загальні оцінки специфічності для зразків NS і SS у випадку використання атоматизації роботи ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) були високими, але їх швидкість і оцінки чутливості були низькими.

Оскільки збір діагностичних зразків зазвичай відбувається протягом 9 днів після початку захворювання, ми порівняли зразки, зібрані протягом цього періоду

Рисунок 2. Зміни значень порогового циклу (Кт) зразків мазка носової тампона/слини (NPS/NS/SS), показаних на графіку медіанного значення Кт за добу. Часова точка вибірки була класифікована як 1 в межах 7 d, 2 в межах 8-1 d, 3 в межах 12-16 d і 4 після 17 d. NPS, $p<.001$; NS, $p=.003$; SS, $p=.585$

Рисунок 1. Кореляція між значеннями порогів циклу (Ct) тяжкого гострого респіраторного синдрому коронавірусу 2 (SARS-CoV-2) і результатами RT-PCR кожного зразка

часу, встановивши, що оцінка чутливості були вищою для зразків NS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)), ніж для зразків SS QuantStudio-5 (Thermo Fisher Scientific, США) чи CFX-96 (Bio Rad, США) ручним методом виділення). Тільки один зразок NPS (НП), зібраний протягом 9 доби після появи симптомів, показав негативний результат; коли видима поширеність висока, але їхні коефіцієнти конкордантності та оцінки чутливості були низькими.

Таким чином, конкордантність результату порівнювали за допомогою статистики AC1, яка становила 0,838 для зразків NS, зібраних протягом 9 днів після початку захворювання, що вказує на високу конкордантність. Швидкість конкордантності та чутливість між зразками NPS (QuantStudio 5 чи CFX-9) та зразками NS/SS також були подібними, при цьому зразки NS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) були вищими, ніж зразки SS ((ExiStation 48) (Bioneer, Південна Корея)) для зразків, зібраних протягом 9 діб від початку захворювання. Більше того, для першого набору зібраних зразків (десять зразків) чутливість зразків NS становила 100 %, що підкреслює її значення як початковий тест для пацієнтів із симптомами. Провели порівнювальну діагностичну ефективність відбору зразків NPS і NS та оцінили чутливість отриманих результатів RT-PCR з використанням зразків NS на рівні 82,5-95,8 % у початковому тесті, проведеному для пацієнтів з підозрою на інфекцію SARS-CoV-2 [17, 18] відповідні значення в цьому дослідженні були значно вищими, ніж повідомлялося раніше у дослідженнях. Ця розбіжність, можливо, була пов'язана між відмінностями в умовах проаналізованих досліджень різних популяцій пацієнтів, типом аналізу ПЛР або використовуваними засобами збору біологічного матеріалу.

Крім того, в цьому дослідженні, чим вище кількість копій зразків NPS і чим нижче значення Ct, тим більш позитивними були парні зразки NS і SS. Зниження вірусного навантаження як зразків NPS, так і NS корелювало з часом, що минув з моменту початку хвороби. Ці результати свідчать про те, що вірусне навантаження зразків NS, ймовірно, відображає вірусне навантаження зразків NPS. Pinninti та ін. досліджували вірусне навантаження в парах NPS і NS і відзначили, що особливо, коли значення Ct було ≤ 30 для зразка NPS, відповідний результат дослідження для зразка NS майже завжди був позитивним, а коефіцієнт конкордантності для зразків NS зменшувався зі збільшенням кількості днів від початку захворювання [19] результат, подібний до результату цього дослідження. Ці факти підтверджують ідею про те, що зразки NS є можливими та доречними для заміни біологічних зразків NPS, особливо на ранніх стадіях захворювання. Тести на основі NS у даний час не рекомендуються для застосування безсимптомним пацієнтам [20]. Подібність показників конкордантності між тестами на основі NPS і NS незалежно від наявності виділень з носа може свідчити про те, що ці тести виявляють вірусне навантаження на слизовій, а не в носовому слизі. Біологічні зразки NS безсимптомних пацієнтів та пацієнтів із слабкою симптома-

тикою виявляли подібну, повторювану чутливість до NPS, біологічні матеріали зразків NPS та NS були однаково чутливими незалежно від наявності симптомів.

Висновки

Отже, результати молекулярно-генетичної технології RT-PCR з використанням біологічного матеріалу зразків NS, зібраних у пацієнтів протягом 9 діб з моменту появи респіраторних симптомів захворювання, показали високий коефіцієнт узгодженості з результатами на основі біологічного матеріалу зразків NPS, що дозволяє обрати для використання на практиці біологічні зразки NS як альтернативу зразкам NPS. Крім того, ці результати показали вищу надійність, ніж результати, отримані з біологічних зразків SS. Особливу увагу слід звернути на низьку чутливість самостійно зібраних зразків SS. Використання вибірки біологічних зразків типу NS як альтернативи відбору проб типу NPS може зменшити фізичне навантаження на пацієнтів та ризик передачі інфекції серед медичних працівників, і може бути рекомендованим для використання в рутинній практиці.

Біологічний матеріал зразків відібраних із нижнього носового ходу NS є більш надійними, ніж зразки SS, і можуть бути альтернативою біологічним зразкам NPS зібраними і доставленими у транспортному середовищі для вірусів з лізуючим компонентом. Отже, біологічний матеріал зразків відібраний з передньої носової раковини в спеціальне транспортне середовище з лізуючим компонентом можуть бути рекомендованим для досліджень методом RT-PCR для діагностики COVID-19 під час епідемії чи підйому захворюваності щодо ГРВІ з метою диференційної діагностики.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Chen N, Zhou M, Dong X and others. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of new coronavirus pneumonia in 2019 in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 507-513. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
2. Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, and others. The World Health Organization has declared a state of emergency in the world: a review of the new coronavirus (COVID-19) in 2019. *Int J Surg*. 2020; 76: 71-76. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
3. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, etc.; Chinese Expert Group on Covid-19 Treatment. Clinical characteristics of coronavirus disease in 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382 (18): 1708-1720. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
4. Zou L, Ruan F, Huang M, etc. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory tract samples from infected patients. *N Engl J Med*. 2020; 382 (12): 1177-1179. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
5. Wehrhahn MC, Robson J, Brown S and others. Self-collection: an appropriate alternative during a SARS-CoV-2 pandemic. *Jay Wedge Virol*. 2020; 128: 104417. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].

6. To KKW, Tsang Oty, Leung WS and others. Temporary viral load profiles in posterior oropharyngeal samples and serum antibody responses to SARS-CoV-2 infection: a cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (5): 565-574. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
7. Centers for disease control and prevention. Interim guidelines for the collection, handling and testing of human clinical specimens for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 2019. [Google Scholar].
8. Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 28.03.2020 № 722 "Organization of medical care for patients with coronavirus disease (COVID-19)" / https://moz.gov.ua/uploads/3/19711-dn_20200328_722.pdf.
9. Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 02.04.2020 № 762 poOn approval of the protocol - Provision of medical care for the treatment of coronavirus disease (COVID-19) || <https://moz.gov.ua/uploads/3/19829-protokol.pdf>.
10. Butler-Laporte G, Lawandi A, Schiller I, and others. Comparison of nucleic acid amplification test in nasopharyngeal smear for SARS-CoV-2 detection: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2021; 181 (3): 353-358. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
11. Gwet KL. Internal rating reliability. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials.* Hoboken (NJ): Wiley; 2008 [Google Scholar].
12. Nishiura H. Reliable statistical AC to assess agreement between observers in reliability studies. *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi.* 2010; 66 (11): 1485 - 1491. [Crossref], [PubMed], [Google Scholar].
13. Kanda Yu. Research of freely available easy-to-use software "EZR 'for medical statistics". *Bone marrow transplant.* 2013; 48 (3): 452-458. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
14. Long QX, Tang XJ, Shi QL and others. Clinical and immunological evaluation of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020; 26 (8): 1200 - 1204. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
15. Ferretti L, Wymant C, Kendall M, and others. Quantitative assessment of SARS-CoV-2 transmission involves controlling the epidemic through digital contact tracking. *Science.* 2020; 368 (6491): eabb6936. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
16. Chen Yu, Chen L, Deng K and others. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2020; 92 (7): 833-840. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
17. Tu Yu.P., Jennings R., Hart B. and others. Smears collected by patients or healthcare professionals for testing for SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020; 383 (5): 494-496. [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar].
18. Péré H, Podglajen I, Wack M, et al. SARS-CoV-2 nasal swab: a convenient alternative for nasopharyngeal swab deficiency. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (6): 2 - 3. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar].
19. Pinninti S, Trieu C, Pati SK and others. Comparison of nasopharyngeal and middle nasal smear analysis to detect severe acute coronavirus syndrome 2. *Clin Infect Dis.* 2020; ciaa882. [Crossref], [PubMed], [Google Scholar].
20. Ministry of Health of Japan L and W. Guidelines for testing new coronavirus pathogens (covid-19) (version 1). Available at: <https://www.mhlw.go.jp/content/000678571.pdf>. [Google Scholar].

Отримано / Received 18.10.2021

Рецензовано / Revised 28.10.2021

Прийнято до друку / Accepted 06.11.2021 ■

O. V. Obertynska

Shupik National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PANDEMIC DIAGNOSTIC TOOL AND ACCURACY OF BIOMATERIALS FOR SARS-COV-2 DETECTION

Abstract. Background. The new SARS-CoV-2 coronavirus pandemic continues to have an unprecedented impact on the social aspects of society and the world economy. To prevent and control the transmission of COVID-19, infection monitoring, there is a constant need for high-performance technologies to identify the pathogen or its markers. An important tool and the gold standard of today in the diagnosis of coronavirus disease (COVID-19) are molecular genetic technologies, namely the method of polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) to detect markers of ribonucleic acid (RNA) SARS-CoV-2) in samples of different types of biological material, from the most probable sites of the human body available for selection. The biological material of nasal smears (NS), saliva (SS) was studied, although reliable data on their accuracy of use are limited. To do this, we studied the diagnostic value and accuracy of the collected samples of different biological material: nasopharynx/nose /saliva (NPS/NS/SS). **Materials and methods.** Thirty patients were included after a positive test for SARS-CoV 2 RT-PCR in NPS samples in accordance with the current order № 662 of the Ministry of Health of Ukraine "Guidelines" Procedure for collection, transportation and storage of material for polymerase chain reaction", WHO guidelines for collection, processing and testing of clinical specimens on COVID-19. In comparison with this recommended test method, NPS/NS/SS samples were tested using an automated portable ExiStation 48 detection system (Bioneer Corporation, South Korea) to investigate the feasibility and usefulness of the ExiStation method. 48 and the difference be-

tween the types of biological sample samples, specificity and sensitivity were calculated, and three to five samples were taken from each patient over a total study period of 6 to 9 days. **Results.** 171 sets of NPS/NS/SS samples were selected, of which 122 tested positive for COVID-19 by RT-PCR from NPS biological material. In general, the concordance ratio for biological material types was 82.0%/68.2%/50.4% for NPS/NS/SS samples (ExiStation 48 system); however, for samples collected on the 9th day after the onset of the disease (66 negative and three positive samples), the corresponding figures were 91.7%/80.0%/65.2%. Overall sensitivity estimates were 100.0%/67.5%/37.5% for NPS/NS/SS samples (ExiStation 48 system). For samples up to 7 days after the onset of the disease, the values were 98.0%/84.4%/64.6%. **Conclusions.** Biological material of samples taken from the lower nasal passage (insert the tip of the tampon into the nostril 2-3 cm from the nostril, touching the anterior nasal cavity and mucous membrane) NS are more reliable than SS samples, and can be an alternative to biological samples NPS collected and delivered in the transport medium for viruses with a lysing component. Therefore, the biological material of the samples taken from the anterior nasal cavity in a special transport medium with a lysing component may be recommended for RT-PCR studies for the diagnosis of COVID-19 during an epidemic or rise in SARS for differential diagnosis.

Keywords: diagnostic tool; biological material; types of biological material; nasopharyngeal smear; nasal smear; saliva; RT-PCR; SARS-CoV-2; COVID-19