

К.В. Жданов, К.В. Козлов, Ю.И. Буланьков,
С.М. Захаренко, И.М. Улюкин, Г.Г. Загородников,
С.Г. Григорьев, Е.С. Орлова, А.А. Шуклина,
А.М. Иванов, О.В. Мальцев, В.С. Сукачев,
К.В. Касьяненко, Н.Е. Гринченко

Оптимизация диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с использованием полимеразной цепной реакции в крупном многопрофильном стационаре

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Рассматривается возможность оптимизации диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с использованием полимеразной цепной реакции в многопрофильном стационаре, перепрофилированном для лечения больных COVID-19, на примере Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Проведен анализ научных публикаций, подобранных в соответствии с целью исследования, классифицированы данные 218 проб полимеразной цепной реакции у больных COVID-19, находившихся в клиниках Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, установлены временные интервалы в зависимости от клинических форм и степени тяжести инфекционного процесса, в которых вероятность положительного и отрицательного результата полимеразной цепной реакции на РНК SARS-CoV-2 была максимальной и минимальной. Показано, что в процессе обследования и лечения молекулярно-биологическая диагностика проводилась избыточно (4 раза более чем у 50% больных) и у 97,3% пациентов неоправданно рано ($8,5 \pm 0,4$ дня). Кроме того, наибольшая частота отрицательных результатов полимеразной цепной реакции на РНК SARS-CoV-2 отмечалась с 9-х по 10-е и с 12-е по 14-е сутки, при этом она зависела от клинической формы и степени тяжести инфекционного процесса. В этой связи объем диагностики с помощью полимеразной цепной реакции целесообразно сократить и проводить исследование при поступлении в стационар, на 9–10-й день (у больных инapparантными формами и острыми респираторными заболеваниями легкого течения), а также на 12–14-е сутки перед выпиской у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекционного процесса.

Ключевые слова: коронавирус, острые респираторные заболевания, генетический материал вируса, молекулярно-биологическая диагностика, мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, многопрофильный стационар Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Введение. В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике произошла вспышка новой коронавирусной инфекции (НКВИ) с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. присвоила официальное название этой инфекции – Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. официально определил наименование возбудителя заболевания – SARS-CoV-2 [1]. Заболевание быстро распространилось по планете с активным заносом возбудителя заболевания на территорию Российской Федерации (РФ). При этом летальность среди госпитализированных за рубежом больных, по разным данным, варьировала от 4 до 11% [11, 12].

В настоящее время основным этиологическим способом диагностики НКВИ является полимеразно-цепная реакция (ПЦР), позволяющая выявить генетический материал вируса в отделяемом со слизистой оболочки рото- и носоглотки. Работа китайских вирусологов обеспечила изоляцию возбудителя и его молекулярно-генетическую характеристику после секве-

нирования полного генома, что позволило разработать диагностические тест-системы на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Подобные тест-системы разработаны отечественными производителями и широко используются в многопрофильных стационарах РФ, более того, в нашей стране на начало июня 2020 г. выполнено более 11,1 млн ПЦР-тестов на COVID-19 [6]. Такой объем молекулярно-биологической диагностики, безусловно, оказывает существенное влияние на работу всей системы лабораторной диагностики в многопрофильном стационаре, перепрофилированном для лечения пациентов, инфицированных НКВИ, вызывая ее крайнее перенапряжение, особенно в условиях дефицита кадров и в ряде случаев недостаточного количества материально-технических ресурсов. При этом следует учитывать, что выписка пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 разрешается при отсутствии клинических проявлений болезни и получении двукратного отрицательного результата лабораторного исследования путем ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2 с интервалом не менее одного дня [3].

Цель исследования. Изучение объемов и результатов ПЦР-диагностики SARS-CoV-2 в многопрофильном стационаре на примере Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (ВМА) с последующим формулированием рекомендаций по оптимизации клинического ведения пациентов, инфицированных НКВИ.

Материалы и методы. В ходе исследования были проанализированы пробы отделяемого со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, взятые у 218 больных НКВИ (средний возраст $21,3 \pm 0,8$ года, все мужского пола). Образцы поступали в единую лабораторию центра клинической и лабораторной диагностики ВМА для проведения ПЦР на РНК SARS-CoV-2 в течение апреля – мая 2020 г.

Госпитализация и лечение всех пациентов осуществлялись по клинико-эпидемиологическим критериям в соответствии с действующими национальными и ведомственными клиническими рекомендациями [2–5].

Клинические формы НКВИ [7] распределились следующим образом: инapparантная – 91 (41,74%); острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) – 80 (36,7%); пневмонии – 47 (21,56%). При этом у 147 (67,43%) больных было отмечено легкое течение заболевания, у 62 (28,44%) – среднетяжелое и у 9 (4,13%) – тяжелое.

Средняя длительность заболевания на момент госпитализации в клиники ВМА для пациентов, инфицированных НКВИ (ОРВИ), составляла $3,1 \pm 0,4$ дня, а для больных с поражением нижних отделов дыхательных путей – $8,3 \pm 0,9$ дня.

Значимых сопутствующих заболеваний у пациентов с легким течением инфекции не отмечено. У среднетяжелых больных НКВИ в 51,5% случаев диагностировались хронические болезни дыхательной и эндокринной систем, а также системы кровообращения. При тяжелом течении COVID-19 сопутствующая хроническая патология выявлялась у всех госпитализированных лиц.

Исследование включено в план научно-исследовательской работы ВМА, этическая экспертиза пройдена 06.05.2020 г., протокол № 235. Исследование осуществлялось в соответствии с принципами доказа-

тельной медицины [9], было пилотным, проверяющим гипотезу, нерандомизированным, открытым. Работа выполнена в соответствии с положениями «Конвенции о защите личности в связи с автоматической обработкой персональных данных» [8].

Статистическая обработка материалов исследования проведена с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 10 [10]. Полученные количественные признаки представлялись в виде $M \pm m$, где M – среднее значение признака, m – стандартная ошибка средней величины. При сравнении полученных данных использовался t-критерий Стьюдента, методы непараметрической статистики (χ^2). В качестве статистически значимых принимались результаты со степенью достоверности не ниже 95% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. В общей сложности у 218 пациентов, инфицированных НКВИ, было выполнено 769 ПЦР-тестов. При этом более чем у 50% больных биоматериал отбирался более 4 раз, а средние сутки повторного забора биоматериала составили $8,5 \pm 0,4$ дней. Для третьего анализа отделяемое со слизистой оболочки носо- и ротоглотки отбиралось в среднем на $13,1 \pm 0,3$ сутки, для четвертого – на $16,6 \pm 0,5$ сутки и для пятого – на $19,7 \pm 0,9$ сутки (табл. 1).

Частота и сроки выполнения ПЦР-исследования в зависимости от клинических форм и тяжести заболевания представлены в таблице 2.

Как видно из представленных в таблицах 1 и 2 данных, повторный отбор диагностического материала у

Таблица 1
Частота, объемы и сроки выполнения ПЦР на РНК SARS-CoV-2

№ пробы	Объем тестирования		Сутки проведения ПЦР, $M \pm m$
	n	%	
1	218	100	1–3 сутки
2	214	98,2	$8,5 \pm 0,4$
3	195	91,3	$13,1 \pm 0,3$
4	110	50,5	$16,6 \pm 0,5$
5	34	15,6	$19,7 \pm 0,9$

Таблица 2
Частота и сроки выполнения ПЦР на РНК SARS-CoV-2 в зависимости от клинической формы и степени тяжести НКВИ

№ пробы	Сутки проведения ПЦР, $M \pm m$					
	Клиническая форма			Степень тяжести		
	ОРВИ	пневмония	инаппарантная	легкая	средняя	тяжелая
1	1–3	1	1–4	1–4	1–3	1
2	$9,8 \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,6$	$8,9 \pm 0,6$	$8,3 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,7$	$10,3 \pm 2,5$
3	$14,2 \pm 0,8$	$14,1 \pm 0,5$	$11,4 \pm 0,6$	$14,4 \pm 0,7$	$13,6 \pm 0,5$	$17,1 \pm 3,4$
4	$17,7 \pm 1,7$	$17,4 \pm 0,6$	$14,1 \pm 0,8$	$18,7 \pm 0,8$	$15,3 \pm 0,7$	$23,5 \pm 6,5$
5	$19 \pm 2,4$	$22 \pm 1,2$	$16,8 \pm 1,4$	$22,2 \pm 1,2$	$19 \pm 1,9$	–



Рис. Частота вероятности положительных и отрицательных результатов отделяемого со слизистой верхних дыхательных путей в ПЦР на РНК SARS-CoV-2 в зависимости от сроков их получения

больных НКВИ проводился в период разгара инфекционного процесса при всех клинических формах и независимо от степени тяжести, что, безусловно, необоснованно рано.

В последующем сутки получения отделяемого из верхних дыхательных путей соответствовали клиническому течению НКВИ, при этом средний день отбора материала в целом закономерно увеличивался у пациентов, страдающих ОРВИ, пневмониями легкого, среднетяжелого и тяжелого течения.

Установлено, что наибольшая вероятность отрицательных результатов ПЦР на РНК SARS-CoV-2 приходилась на 9–10-е и 12–15-е сутки пребывания в стационаре, то есть, как правило, с учетом дней болезни до госпитализации в периоде ранней реконвалесценции (рисунок).

В то же время отмечалась зависимость результатов ПЦР от клинической формы и степени тяжести НКВИ. Так, например, при повторном исследовании отделяемого со слизистой оболочки рото- и носоглотки у пациентов, страдающих ОРВИ и инapparантным течением НКВИ, достоверно чаще результат ПЦР был отрицательным, а у больных, страдающих пневмониями, – положительным (табл. 3). На остальных

сроках получения материала для исследования на РНК SARS-CoV-2 достоверных различий в зависимости от клинической формы НКВИ не получено.

В то же время более чем у половины больных НКВИ с легким и среднетяжелым течением результат повторного исследования ПЦР на РНК SARS-CoV-2 оставался положительным, однако к третьему исследованию у большинства пациентов независимо от степени тяжести НКВИ РНК SARS-CoV-2 в ПЦР достоверно не обнаруживалась (табл. 4).

Заключение. Установлено, что количество ПЦР-тестов на РНК SARS-CoV-2, выполненных в многопрофильном стационаре, перепрофилированном для лечения больных НКВИ, необоснованно большое. При этом средние сроки повторного исследования на РНК SARS-CoV-2 с использованием ПЦР составили $8,5 \pm 0,4$ дня, а это означает, что отбор материала со слизистых верхних дыхательных путей выполнялся в период разгара заболевания (как правило, в фазы ранней и поздней легочной инфекции), что в большинстве случаев неизбежно приводит к положительному результату. Кроме того, раньше всех повторное молекулярно-биологическое исследование проводилось у пациентов, страдающих пневмониями и среднетяжелой формой НКВИ ($7,2 \pm 0,6$ и $7,8 \pm 0,7$ сутки соответственно). В то же время отбор материала для исследования с использованием ПЦР на РНК SARS-CoV-2 к 9–10-м и 12–15-м суткам пребывания в стационаре ассоциируется с наибольшей вероятностью получения отрицательного результата.

Таким образом, объем диагностики с использованием ПЦР целесообразно сократить и проводить при поступлении в стационар, а также на 9–10-й день (у больных инapparантными формами НКВИ и ОРВИ легкого течения) и на 12–15-е сутки перед выпиской

Таблица 3

Результаты повторного исследования отделяемого со слизистой оболочки рото- и носоглотки в зависимости от клинической формы НКВИ, абс. (%)

Клиническая форма	SARS-CoV-2 «-»	SARS-CoV-2 «+»
ОРВИ	31 (65,96)	16 (34,04)
Пневмония	30 (39,47)	46 (60,53)
Инаппарантная	64 (70,33)	27 (29,67)

Примечание: $\chi^2=17,6$; $p<0,0001$.

Таблица 4

**Результаты исследований РНК SARS-CoV-2 отделяемого со слизистой рото- и носоглотки
в зависимости от степени тяжести НКВИ, абс. (%)**

Степень тяжести	Повторное исследование, $\chi^2=10$; $p<0,015$		Третье исследование, $\chi^2=12,7$; $p<0,0055$	
	SARS-CoV-2 «-»	SARS-CoV-2 «+»	SARS-CoV-2 «-»	SARS-CoV-2 «+»
Легкая	25 (47,17)	28 (52,83)	36 (69,23)	16 (30,77)
Средняя	30 (49,18)	31 (50,82)	55 (93,22)	4 (6,78)
Тяжелая	6 (66,67)	3 (33,33)	8 (100)	0

у всех пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекционного процесса.

Литература

1. Беляков, Н.А. Коронавирусная инфекция COVID-19. Природа вируса, патогенез, клинические проявления: сообщение 1 / Н.А. Беляков, В.В. Рассохин, Е.Б. Ястребова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 7-21.
2. Временные алгоритмы по ведению пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в перепрофилированных клиниках академии. Версия 2.0 (29.04.2020 г.). – СПб.: ВМА, 2020. – 26 с.
3. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 6 (24.04.2020). – М., 2020. – 142 с.
4. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 7 (03.06.2020). – М., 2020. – 166 с.
5. Диагностика, лечение и профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19): методические рекомендации, утв. нач. ГВМУ МО РФ 26.03.2020 г. – М., 2020. – 54 с.
6. Львов, Д.К. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-CoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus): уроки эпидемии SARS-CoV / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусологии. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 6–15.
7. Методические рекомендации по кодированию и выбору основного состояния в статистике заболеваемости и первоначальной причины в статистике смертности, связанные с COVID-19, утв. зам. МЗ РФ 27.05.2020 г. – М., 2020. – 24 с.
8. Совет Европы. Конвенция о защите личности в связи с автоматической обработкой персональных данных. – 2-е изд., доп. – СПб.: Гражданский контроль, 2002. – 36 с.
9. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины // Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М.: Медиа Сфера, 1998. – 352 с.
10. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев. – СПб.: ВМА, 2011. – 318 с.
11. Sifuentes-Rodríguez, E. COVID-19: The outbreak caused by a new coronavirus / E. Sifuentes-Rodríguez, D. Palacios-Reyes // Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. – 2020. – Vol. 77, № 2. – P. 47–53.
12. Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) / T. Singhal // Indian J. Pediatr. – 2020. – Vol. 87, № 4. – P. 281–286.

K.V. Zhdanov, K.V. Kozlov, Yu.I. Bulankov, S.M. Zakharenko, I.M. Uliukin, G.G. Zagorodnikov, S.G. Grigoriev, E.S. Orlova, A.A. Shuklina, A.M. Ivanov, O.V. Maltsev, V.S. Sukachev, K.V. Kasyanenko, N.E. Grinchenko

Optimization of diagnosis of SARS-CoV-2 infection using polymerase chain reaction in a large multi-specialty hospital

Abstract. We consider the possibility of optimizing the diagnosis of infection caused by SARS-CoV-2 using polymerase chain reaction in a multi-specialty hospital, repurposed for the treatment of COVID-19 patients, using the example Of the military medical Academy named after S.M. Kirov. The analysis of scientific publications selected in accordance with the purpose of the study, analyzed data from 218 samples of polymerase chain reaction in patients with COVID-19, who were in the clinics Of the military medical Academy named after Sm. Time intervals were established depending on the clinical forms and severity of the infectious process, in which the probability of a positive and negative result of a polymerase chain reaction to SARS-CoV-2 RNA was maximum and minimum. It was shown that during the examination and treatment, molecular biological diagnostics were performed excessively (4 times in more than 50% of patients) and in 97,3% of patients unreasonably early ($8,5 \pm 0,4$ days). At the same time, the highest frequency of negative results of polymerase chain reaction to SARS-CoV-2 RNA was observed in the period from 9 to 10 and from 12 to 14 days, while it depended on the clinical form and severity of the infectious process. In this regard, the volume diagnosis using polymerase chain reaction should be reduced and to conduct research when entering the hospital, on the 9th-10th day (in patients inapparently forms and acute respiratory diseases, lung flow) and 12–14 days before discharge in patients with moderate and severe course of the infectious process.

Key words: coronavirus, acute respiratory diseases, virus genetic material, molecular and biological diagnostics, multiplex polymerase chain reaction in real time, multidisciplinary hospital of the Kirov Military medical Academy.

Контактный телефон: +7-921-657-27-49; e-mail: vmeda-nio@mail.ru