

МРНТИ 34.15.27

<https://doi.org/10.26577/bb202510327>

Б.С. Усербаев* , **К.Т. Султанкулова** , **Б. Н. Жұмаділ** ,
О.В. Червякова , **Г.О. Шыныбекова** , **Н.С. Кожаберженов** 

ТОО Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,

АО «Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Казахстан

*e-mail: b.usserbayev@biosafety.kz

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ, ЗОНДА И ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, подчеркнула необходимость быстрой и точной диагностики наличия вируса для эффективного контроля распространения заболевания. ОТ-ПЦР в реальном времени является одним из наиболее чувствительных и специфичных методов выявления РНК вируса. Однако качество и эффективность ОТ-ПЦР напрямую связаны с правильным выбором праймеров и зондов, а высокая точность и надежность связаны с использованием соответствующих контролей. Целью данной работы является разработка праймеров и зондов для диагностики COVID-19, а также создание положительного контрольного образца для тест-системы.

В данной работе применены современные подходы к выбору мишеней для амплификации, которые включают анализ консервативных участков вирусного генома. Также использовали биоинформатические инструменты для подбора праймеров и зондов для выявления вируса SARS-CoV-2. Для создания контрольного образца использовалась синтетическая конструкция, содержащая целевой участок генома вируса, который был успешно клонирован в плазмидный вектор.

В рамках исследования были разработаны праймеры и флуоресцентный зонд, специфичные к консервативным регионам генома вируса SARS-CoV-2, с учетом генетических вариаций вируса. Полученный положительный контроль успешно протестирован в анализе, подтвердив свою эффективность и воспроизводимость.

Разработанные праймеры и зонд для диагностики COVID-19 могут быть использованы для эпидемиологического мониторинга и контроля распространения SARS-CoV-2 с клиническими и диагностическими целями. Разработанный контрольный образец может быть использован для стандартизации диагностики COVID-19, повышая точности и надежности анализов в клинической практике.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, ОТ-ПЦР, праймеры, зонд, положительный контроль.

B.S. Usserbayev*, K.T. Sultankulova, B.N. Zhumadil,
O.V. Chervyakova, G.O. Shynybekova, N.S. Kozhabergenov
Research Institute of Biological Safety Problems LLP, «National Holding QazBioPharm»,
Gvardeisky, Kazakhstan
*e-mail: b.usserbayev@biosafety.kz

Development of primers, probes and positive controls for COVID-19 diagnostics

The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 coronavirus has emphasised the need for rapid and accurate diagnosis to effectively control the spread of the disease. RT-PCR of RT is one of the most sensitive and specific methods for detection of virus RNA. However, the quality and efficiency of RT-PCR are directly related to the proper choice of primers and probes, and high accuracy and reliability are related to the use of controls. The aim of this work is to develop primers and probes for the diagnosis of COVID-19 and to create a positive control sample for the test system.

This work applies modern approaches to the selection of targets for amplification, which include the analysis of conserved regions of the viral genome. Bioinformatics tools were also used to select primers and probes for detection of SARS-CoV-2 virus. A synthetic construct containing target regions of the virus genome was used to create a control sample, which was successfully cloned into a plasmid vector.

As part of the study, primers and a fluorescent probe specific to conserved regions of the SARS-CoV-2 virus genome were designed, taking into account genetic variations in the virus. The resulting positive control was successfully tested in the assay, confirming its efficacy and reproducibility.

The developed primers and probes for SOVID-19 diagnosis can be used for epidemiological monitoring and control of SARS-CoV-2 spread with clinical and diagnostic purposes. The developed control sample can be used to standardise the diagnosis of COVID-19, improving the accuracy and reliability of the assay in clinical practice.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, OT-PCR, primers, probe, positive control.

Б.С. Усербаев*, К.Т. Султанкулова, Б. Н. Жұмаділ,
О.В. Червякова, Г.О. Шыныбекова, Н.С. Кожабергенов

Биологиялық қауіпсіздік мәселелері ғылыми-зерттеу институты
ЖШС «QazBioPharm Ұлттық холдингі», Гвардейский, Қазақстан
*e-mail: b.usserbayev@biosafety.kz

COVID-19 диагностикасы үшін праймерлерді, зондты және оң бақылауды әзірлеу

SARS-CoV-2 коронавирусы тудырған COVID-19 пандемиясы аурудың таралуын тиімді бақылау үшін жылдам және дәл диагноз қою қажеттілігін көрсетті. КТ-ПТР НҰР вирустық РНҚ анықтаудың ең сезімтал және спецификалық әдістерінің бірі болып табылады. Дегенмен, ОТ-ПТР сапасы мен тиімділігі праймерлер мен зондтарды дұрыс таңдауға тікелей байланысты болса, ал жоғары дәлдік пен сенімділік оң бақылауларды пайдаланумен байланысты болады. Осылайша, бұл жұмыстың мақсаты – COVID-19 диагностикасы үшін праймерлер мен зондтарды жобалау, сондай-ақ дәлдік пен сенімділікті қамтамасыз ету үшін оң бақылау үлгісін жасау.

Бұл жұмыста вирустық геномның тұрақы аймақтарын талдауды қамтитын күшейту мақсаттарын таңдаудың заманауи тәсілдерін қолдандық. Сонымен қатар SARS-CoV-2 анықтауға арналған праймерлер мен зондтарды таңдау үшін биоинформатикалық құралдарды қолдандық. Бақылау үлгісін жасау үшін вирус геномының мақсатты аймақтарын қамтитын синтетикалық құрылым қолданылды, ол плазмидтік векторға сәтті клондалды.

Зерттеудің шеңберінде вирустың генетикалық өзгерістерін ескере отырып, SARS-CoV-2 геномының тұрақты аймақтарына тән праймерлер мен флуоресцентті зонд әзірленді. Алынған оң бақылау тиімділігі мен қайталану мүмкіндігін растай отырып, талдауда сәтті сынақтан өтті.

COVID-19 диагностикасы үшін әзірленген праймерлер мен зондтарды клиникалық және диагностикалық мақсаттарда SARS-CoV-2 таралуын эпидемиологиялық бақылау және бақылау үшін пайдалануға болады. Әзірленген бақылау үлгісі клиникалық тәжірибеде сынақтардың дәлдігі мен сенімділігін арттыра отырып, COVID-19 диагнозын стандарттау үшін пайдаланылуы мүмкін.

Түйін сөздер: COVID-19, SARS-CoV-2, КТ-ПЦР, праймер, зонд.

Введение

Острые респираторные заболевания (ОРЗ) представляют собой обширную группу острых инфекционных болезней, вызываемых различными патогенными агентами, такими как вирусы, бактерии, хламидии и микоплазмы [1]. ОРЗ представляет серьезную угрозу человечеству, включая прямое влияние на повседневную жизнь миллионов людей и негативное воздействие на мировую экономику [2, 3]. В настоящее время респираторные инфекции составляют до 90% всех инфекционных заболеваний [4]. Каждый год в мире фиксируется свыше 1 миллиарда случаев острых респираторных заболеваний, что значительно превышает количество пациентов с такими серьезными заболеваниями, как рак, ВИЧ, ишемическая болезнь сердца или малярия [1].

В последнее время возникновение и быстрое распространение нового вида коронавируса

(SARS-CoV-2), который стал значимым представителем ОРЗ, вызвало серьезные опасения в области глобального здравоохранения [5]. Ввиду таких особенностей в марте 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила COVID-19 глобальной пандемией [6, 7]. По данным ВОЗ на 16 февраля 2025 года, SARS-CoV-2 стремительно охватил более 230 стран, где зарегистрировано более 777 млн. подтвержденных случаев заражения, что привело к летальным исходам 7, 089,979 человек [8].

В связи с этим во время COVID-19 оценка распространения вируса среди населения подчеркивает острую необходимость в точном и быстром диагностическом тестировании для клинической практики и общественного здравоохранения [9]. Своевременная и точная диагностика позволяет диагностировать заболевание, следить за распространением вируса, изолировать заболевших и принимать эффективные меры против него, а также играет решающую

роль в борьбе с инфекцией. В основе большинства методов диагностики COVID-19 лежит метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ) [10, 11]. Анализ на основе ОТ-ПЦР для диагностики COVID-19 был впервые разработан в Институте вирусологии Charite в Германии и рекомендован ВОЗ в качестве тест-системы для выявления вируса [7].

Для эффективного проведения ОТ-ПЦР необходимо правильно конструировать праймеры и зонды, которые должны обладать высокой специфичностью и чувствительностью [12]. В последние годы было опубликовано множество исследований [9, 13-18], посвященных к разработкам и оптимизациям ОТ-ПЦР, однако подбор и разработка наиболее эффективных и специфических праймеров и зондов остается актуальной задачей.

Также параллельно с разработками праймеров и зондов ключевое внимание уделяется контрольным образцам, которые необходимы для подтверждения достоверности и воспроизводимости получаемых результатов. Yu B. и соавт. сообщают, что в большинстве исследований на основе ОТ-ПЦР либо отсутствуют контрольные образцы, либо используется ДНК в качестве внутреннего контроля, что не позволяет минимизировать ошибки ОТ-ПЦР, возникающие на этапе обратной транскрипции [19]. Таким образом, разработка праймеров и зондов тесно связано с использованием контрольных образцов, что способствует высокой точности и достоверности диагностики вирусных инфекций.

Целью данной работы является конструирование праймеров и зонда для диагностики COVID-19, а также разработка положительного контрольного образца для тест-системы.

Материалы и методы исследования

Биоматериал

В данной работе в качестве исследуемого объекта был выбран штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty04.2020, который хранится в республиканском депозитории коллекции микроорганизмов ТОО Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, АО «Национальный холдинг «КазБиоФарм»» [20].

Выделение РНК вирусов

РНК вирусов экстрагировали из материала в условиях лаборатории BSL-3 набором QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрацию полученных РНК вирусов проверяли на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) в соответствии с протоколом производителя.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК)

Обратную транскрипцию (ОТ) проводили с помощью набора SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) в термоциклере Mastercycler X50s при следующих температурных режимах: 25°C в течение 10 мин; 42°C в течение 60 мин; 85°C в течение 5 мин. Реакционный состав и температурно – временные режимы проводили согласно инструкции производителя.

Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Аmplification проводили на термоциклере Mastercycler X50s (Eppendorf, UK) с использованием набора Platinum SuperFi PCR Master Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Постановку ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, включая 12,5 мкл 2X Platinum SuperFi Green PCR Master Mix, по 1,25 мкл каждого из 10 мкМ прямого и обратного праймеров, 3 мкл кДНК-матрицы, 5 мкл 5X SuperFi GC Enhancer и воды для ПЦР, чтобы восполнить объем на 25 мкл. Амплификация ПЦР продуктов проведена по следующему температурному режиму: начальная денатурация 95°C-0,5 мин; с последующими 35 циклами амплификации при денатурации 95°C-0,1 мин, отжиге 57°C-0,5 мин, элонгация 72°C-0,5 мин; финальная элонгация 72°C-5 мин.

Конструирование рекомбинантной ДНК плазмиды

Для получения положительного контроля для тест-системы продукты амплификации вируса SARS-CoV-2 клонировали в плазмиду pGEM-T Easy Vector с использованием ферментов рестрикции NcoI и SpeI и T4 ДНК лигазы. Размер плазмидной ДНК без вставки составляет 2988 пар оснований. Полученные лигазные смеси использовали для последующей химической трансформации компетентных клеток Escherichia coli. Отбор колоний, содержащих целевой фрагмент, проведен методом сине-белой селекции. Отобранные клоны перенесены в жидкую среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) и инкубированы при 37°C в течение 16 часов. Из полученных культур выделены плазмиды с при-

менением метода щелочного лизиса. Конструкцию контрольного образца (ПКО) проверяли на наличие гена методом ПЦР с применением специфических праймеров, использованных при клонировании. Результаты амплификации ПЦР выявляли с помощью метода гель-электрофореза и гель документирующей системы iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Электрофорез проводили при силе тока 400 мА в 2% агарозном геле в буфере TAE (40 мМ трисгидроксиметиламинаметан, 20 мМ ледяная уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА), с добавлением SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК на 100 bp «DNA Ladder» фирмы Invitrogen.

Выравнивание последовательностей нуклеотидов

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей вирусных геномов было выполнено с использованием программного обеспечения Mega 11 по алгоритму ClustalW.

Подбор и анализ специфичности олигонуклеотидных праймеров и зондов

Поиск нуклеотидных последовательностей для подбора специфических праймеров, осуществляли в международной базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Проверку специфичности подобранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов, а также их вторичные структуры оценивались с помощью программы BLAST и CLC Genomics Workbench v.12 (QIAGEN).

Синтез праймеров и зондов

Синтез олигонуклеотидных праймеров проводили на автоматическом синтезаторе фирмы K&A Laborgeraete, модели DNA/RNA Synthesizer H-16 (производство Германии), амидофосфитным методом согласно инструкции производителя. В качестве флуорофоров для зондов применен Карбоксифлуоресцеин (FAM) в сочетании с гасителем флуоресценции BHQ1. Синтез зондов производился под заказ в фирме Синтол, Россия.

Постановка ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР в режиме реального времени (РВ) проводили на амплификаторе QuantStudio 5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems,

Thermo Fisher Scientific, USA. Результаты ОТ-ПЦР РВ выявляли и анализировали в программном обеспечении QuantStudio Design and Analysis Software v1.5.2.

Результаты амплификации ОТ-ПЦР РВ выявляли с помощью метода гель-электрофореза и гель документирующей системы iBright CL1500 Imaging System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Электрофорез проводили при силе тока 400 мА в 2% агарозном геле в буфере TAE (40 мМ трисгидроксиметиламинаметан, 20 мМ ледяная уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА), с добавлением SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA). Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК на 50 bp «DNA Ladder» фирмы Invitrogen.

Результаты исследования и их обсуждение

Подбор праймеров и зонда для диагностики COVID-19

Разработка высокочувствительных и специфичных праймеров и зондов для диагностики COVID-19 требует тщательного изучения структуры SARS-CoV-2 с учетом мутации и генетической изменчивости вируса [9, 21]. В связи с указанными особенностями, при разработке тест-системы важно применять глобальные базы данных (CovidShiny [22], GISAID [23], Pango Linage [24] и Nextrain [25]) касающиеся вируса SARS-CoV-2, а также биоинформатические инструменты (Primer-BLAST [26], Primer3 [27, 28] и CoVrimer [29]) для конструкции праймеров и зондов. Кроме того при разработке праймеров и зондов следует учитывать возможность перекрестной реактивности с другими коронавирусами, такими как SARS-CoV, MERS-CoV, чтобы не получать ложноотрицательные результаты [30, 31].

Для диагностики COVID-19 целевые последовательности для амплификации часто выбирают в консервативных областях генома SARS-CoV-2, таких как гены N (белок нуклеокапсида), E (белок оболочки), RdRp (РНК-зависимая РНК-полимераза) и S (спайковый белок) [7]. Эти гены были выбраны по причине наличия в их последовательностях уникальных фрагментов, что позволяет разработать специфические пары праймеров и зондов для диагностики COVID-19 [9, 32]. Кроме того, Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний, Университет Гонконга и Центры по контролю и профилактике

заболеваний США разработали дополнительные протоколы для исследований генов RdRp, E и N. Эти исследования направлены на усовершенствование процесса разработки ОТ-ПЦР РВ, что позволяет повысить точность и надежность диагностики COVID-19 [7]. Среди этих анализов наивысшую аналитическую чувствительность показал RdRp, который обеспечивал обнаружение с вероятностью 95% при наличии 3,8 копий РНК на реакцию [9]. Благодаря своей высокой аналитической чувствительности, ВОЗ рекомендует использовать RdRp в качестве подтверждающего гена для диагностики COVID-19 [33].

Поиск нуклеотидных последовательностей исследованного гена проводили в международной базе данных GenBank NCBI. Для анализа нуклеотидных последовательностей было отобрано 93 изолята коронавируса SARS-CoV-2, SARS-CoV и Bat coronavirus из генетической базы данных GenBank, которые были обнаружены в разных регионах планеты. Эти три вируса демонстрируют высокую степень сходства в своих нуклеотидных последовательностях, превышающую 80%. Номера регистрации изолятов, включённых в данное исследование, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Номера регистрации в базе данных GenBank изолятов коронавируса

Наименование вируса	Идентификационные номера изолятов в базе данных GenBank
SARS-CoV-2	MT192765.1, MT159721.2, MT159714.2, MT159713.2, MT159710.2, MT039873.1, MN996528.1, MN988668.1, MT192772.1, MT184912.1, MT159709.2, MT159707.2, MT118835.1, MT019533.1, MT159722.1, MT159718.1, MT121215.1, MT123290.1, MT066175.1, MN996530.1, MT066156.1, MT093631.2, LC529905.1, MT159720.1, MT027062.1, MN996529.1, MT123291.2, MT135041.1, MN996531.1, MT184908.1, LC528232.1, LR757996.1, MT039887.1, MT123293.2, LR757995.1, MN988713.1, MT163719.1, MT019530.1, MT192759.1, MT106054.1, MT072688.1, MT184911.1, LR757998.1, MT050493.1, MT012098.1, MN996527.1, MN938384.1, MT188340.1, MT188339.1, MT044258.1.
SARS-CoV	AY395003.1, AY394996.1, AY304488.1, AY304486.1, AY394985.1, EU371559.1, AY394994.1, JX163927.1, JX163923.1, JQ316196.1, AY559096.1, AY274119.3, AY394999.1, AY394987.1, AY282752.2, JX163925.1, JX163924.1, EU371560.1, AY395002.1, AY357076.1, GU553365.1, AY338175.1, FJ429166.1, AY461660.1, AY568539.1, HQ890541.1, AY772062.1, FJ882953.1, FJ882962.1.
Bat coronavirus	MN996532.1, MG772933.1, MG772934.1, KF367457.1, MK211378.1, MK211375.1, KY417151.1, JX993988.1, KJ473813.1, KJ473811.1, MK211376.1, KY417146.1, KY417145.1, KY417152.1.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы Mega версии 11. На основе результатов множественного выравнивания, были выявлены участки генов, характерные исключительно для вируса SARS-CoV-2 (Рисунок 1).

Праймеры подбирались таким образом, чтобы они были полностью комплементарны к сайту-мишени, имели температуру плавления в диапазоне 55-60°C, не имели внутренней гомологии более 3 нуклеотидных пар, содержали GC в пределах 45-55% и не образовывали вторичных структур с температурой плавления, равной или превышающей температуру плавления самого праймера [34].

Дизайн разработки праймеров и зондов осуществлялся в соответствии с учетом указанных выше условий. Для проверки использовался модуль CLC Genomic Workbench версии 12. Сконструированные праймеры и зонды были протестированы на специфичность с применением программы BLAST на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. На основании проведенных анализов были сконструированы праймеры и зонды для проведения ОТ-ПЦР РВ (Рисунок 2), параметры которых приведены в таблице 2. В качестве флуоресцентных красителей использовали FAM и гасители BHQ-1.



Рисунок 1 – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей генома Human coronavirus (SARS-CoV-2 и SARS-CoV) и Bat coronavirus

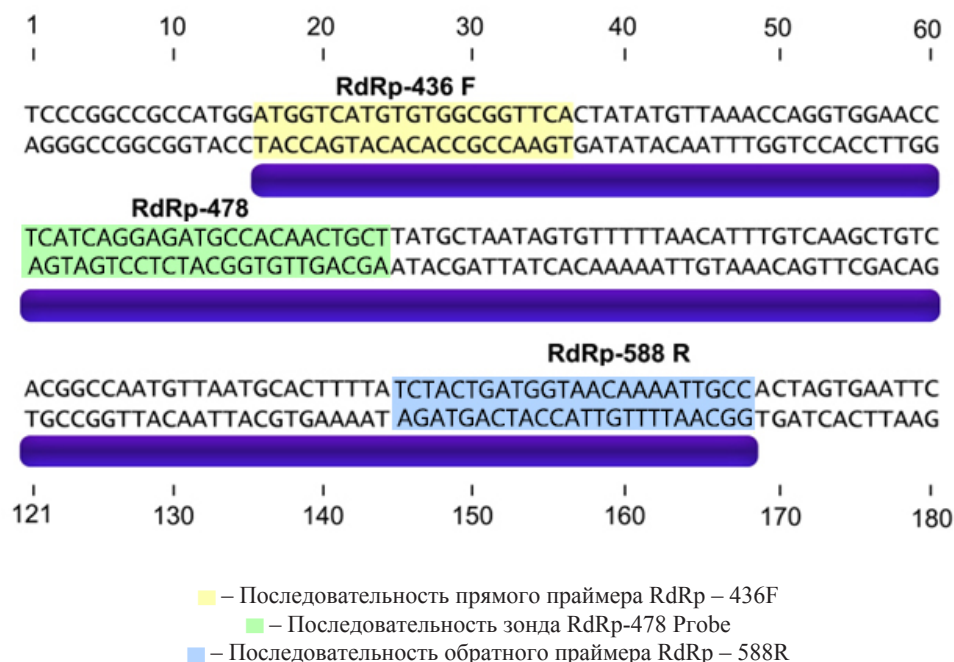


Рисунок 2 – Конструирование праймеров и зонда для диагностики COVID-19

Таблица 2 – Параметры праймеров и зондов

Наименование праймера и зонда	Последовательность 5' – 3'	Tm	GC, %	Размер продукта
RdRp-436 F	ATGGTCATGTGTGGCGGTTC	60	55	152 п.о.
RdRp-478 Probe	FAM-ACCTCATCAGGAGATGCCACAACCTGCT-BHQ-1	70	52	
RdRp-588 R	GGCAATTTTGTACCATCAGTAGA	60	40	

Таким образом, с применением инструмента для дизайна праймеров и зондов были разработаны специфические праймеры и зонд, нацеленные на ген RdRp SARS-CoV-2 (Таблица 2 и Рисунок 2), для амплификации 152 пар оснований (п.о) мишени на консервативный участок гена RdRp.

Получение рекомбинантной плазмиды, содержащий участок гена RdRp вируса SARS-CoV-2.

Система тестирования для массового применения должна соответствовать стандартам безопасности, поэтому применяли положительный контроль, а именно рекомбинантную плазмиду pGEM-T/SARS-CoV-2 tRdRp. Участок гена RdRp SARS-CoV-2 амплифицировали методом ПЦР с применением праймеров содержащих последовательности сайтов рестрикции NcoI и SpeI (Рисунок 3 и Таблица 3), используя кДНК гена полученного из РНК вирусов штаммов SARS-CoV-2/KZ Almaty/04.2020.

Полученные фрагменты ампликонов клонировали в плазмиду pGEM-T Easy Vector с использованием сайтов рестрикции NcoI и SpeI. Полученные лигазные смеси использовали для последующей химической трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Отбор колоний, содержащий фрагмент RdRp гена вируса SARS-CoV-2, проводили методом сине-белой селекции. Для каждого клона готовили ночную культуру, из которой выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса. В результате получили клоны, содержащие участок гена RdRp SARS-CoV-2. Наличие специфического участка ДНК в рекомбинантной плазмиде было проверено с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Размер плазмидной ДНК со специфической вставкой составил 3147 пар оснований для положительного контроля вируса SARS-CoV-2. Карта плазмид положительного контроля показаны на рисунке 4. Для отрицательного контроля использовали деионизированную воду.

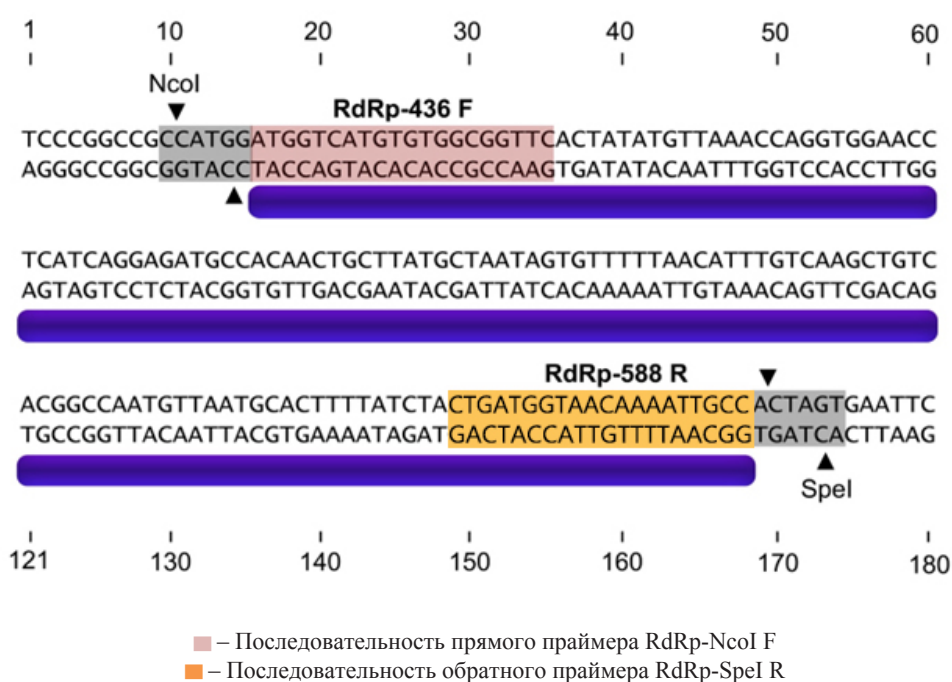
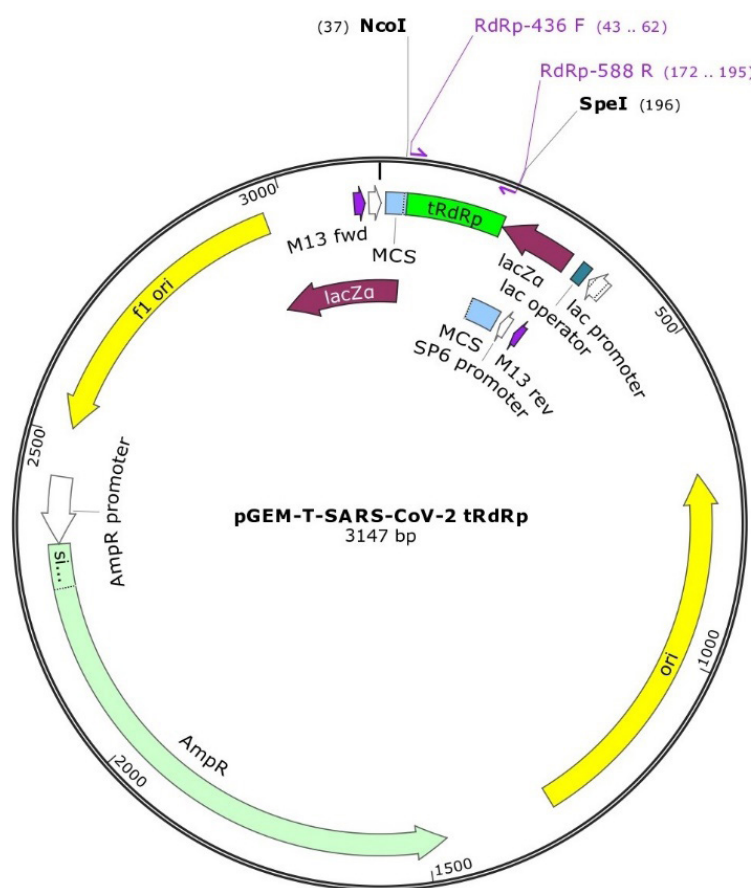


Рисунок 3 – Конструирование праймеров содержащих последовательности сайтов рестрикции NcoI и SpeI для амплификации нуклеотидной последовательности

Таблица 3 – Параметры праймеров содержащих последовательности сайтов рестрикции NcoI и SpeI

Наименование праймера	Последовательность 5' – 3'	Tm	GC, %	Размер продукта	Литература
RdRp-NcoI F	ATTTA CCATGG ATGGTCATGTGTGGCGGT	60	48	176 п.о.	Разработано в этом исследовании
RdRp-SpeI R	GCCGC ACTAGT GGCAATTTTGTACCATCAG	53	48		

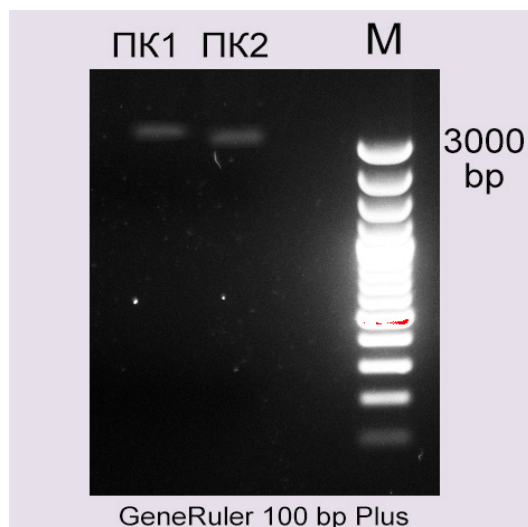


ori- сайт начала репликации, AmpR – ген устойчивости к ампициллину, lacZa-ген репрессора лактозного оперона, SP6 promoter – промотор, SARS-CoV-2 tRdRp – встроенный фрагмент генома SARS-CoV-2

Рисунок 4 – Карта плазмиды pGEM-T/SARS-CoV-2 tRdRp

Полученные конструкции исследовали в 1,5 % агарозном геле в TAE буфере с добавлением SYBR Safe DNA gel stain после линейаризации вектора по NcoI сайту рестрикции. Результаты

электрофоретического анализа показали, что разработанный положительный контроль для SARS-CoV-2 на основе плазмидных ДНК, соответствует своему размеру со вставкой (Рисунок 5)



М – ДНК маркер GeneRuler 100 bp Plus
 ПК1 – Плазменная ДНК со вставкой фрагмента вируса SARS-CoV-2;
 ПК2 – Плазменная ДНК со вставкой фрагмента вируса SARS-CoV-2;
Рисунок 5 – Электрофореграмма сконструированных плазмидных ДНК со специфическими вставками

Проверка работоспособности разработанных праймеров, зонда и положительного контрольного образца

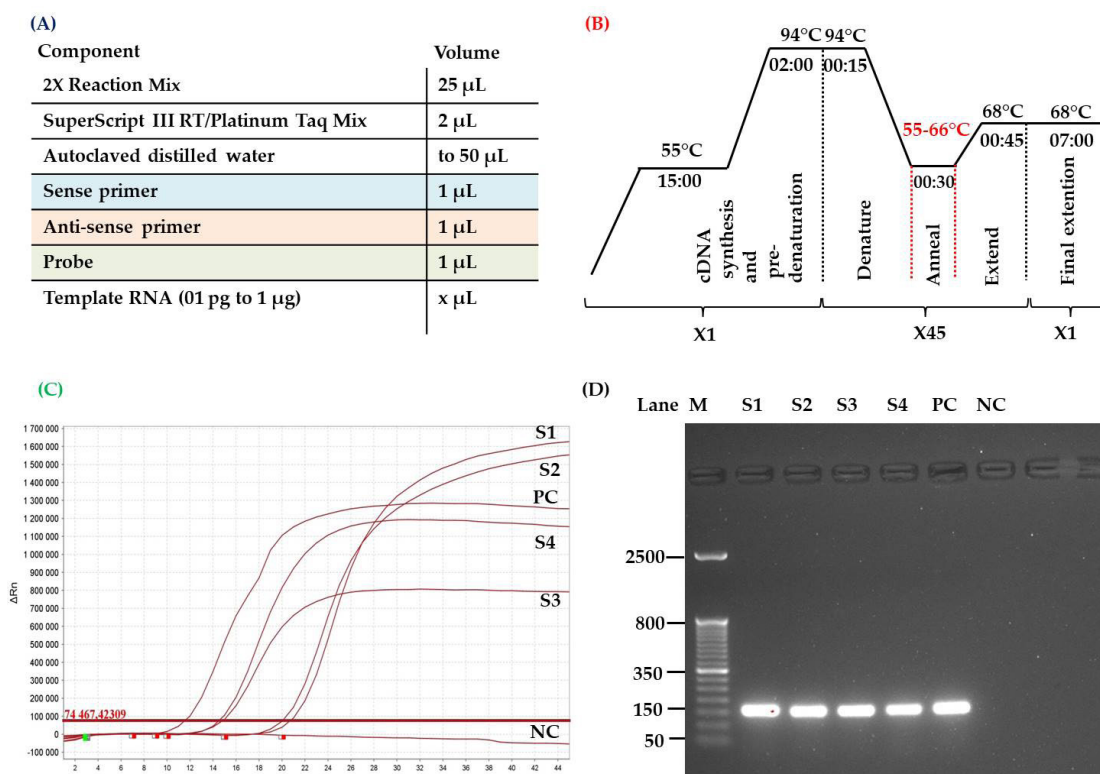
После этого был проведен анализ работоспособности разработанных праймеров, зонда и ПКО для проведения ОТ-ПЦР РВ с целью диагностики COVID-19. Для этого анализа были использованы следующие образцы: SARS-CoV-2/human/KAZ/AST-S396/2023, SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-399/2023, SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-401/2023, SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-406/2023, а также положительный контроль.

В нашей работе были использованы коммерческие наборы для проведения одношагового ОТ-ПЦР SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, США). Но согласно протоколу, общее число циклов составляет 40. Однако с целью повышения чувствительности и достоверности анализа в нашей исследовательской работе количество циклов было увеличено до 45. Это позволяет обнаружить вирус в низких концентрациях. При правильной настройке дополнительных циклов к указанному протоколу результаты могут быть более точными и достоверными, что особенно

важно при диагностических и научных исследованиях [35]. ОТ-ПЦР РВ выполнена в соответствии с протоколом производителя, который представлен на рисунке 6.

На основании результатов ОТ-ПЦР РВ, показанных на рисунке 6 (С), можно сделать вывод, что разработанные праймеры (RdRp-436F и RdRp-588R) и зонд (RdRp-478 Probe) демонстрируют высокую точность и надежность, а также готовы к использованию при создании тест-системы для диагностики COVID-19. Результаты ОТ-ПЦР РВ показали, что набор праймеров и флуоресцентный зонд успешно сработали для положительного контроля, при этом значение C_t (11.582) было самым низким по сравнению с другими исследованными образцами. Этот результат показал, что ПКО может быть использован для дальнейших исследований и создания тест-систем.

Рисунок 6 (D) демонстрирует, что в результате ОТ-ПЦР с использованием праймеров RdRp-436F и RdRp-588R были получены ПЦР продукты с ожидаемым размером 152 пар оснований. Полученные результаты показывают высокую точность и эффективность разработанных олигонуклеотидных праймеров для диагностики COVID-19.



А) Реакционный состав ОТ-ПЦР РВ; В) Температурно – временные режимы ОТ-ПЦР РВ; С) Определение работоспособности праймеров и зонда; D) – Электрофоретический анализ ПЦР амплификации с использованием праймеров RdRp-436F и RdRp-588R; № S1 – образец РНК вируса SARS-CoV-2/human/KAZ/AST-S396/2023; №2 – образец РНК вируса SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-399/2023; №3 – образец РНК вируса SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-401/2023; №4 – образец РНК вируса SARS-CoV-2/human/KAZ/Omicron-XBB.1.9.1-406/2023; PC – положительный контроль; NC – отрицательный контроль

Рисунок 6 – Протокол реакционный состав и температурно – временные режимы ОТ-ПЦР РВ, а также определения работоспособности праймеров и зонда для диагностики COVID-19

Заключение

Глобальная пандемия COVID-19 потребовала разработки надежных и чувствительных методов диагностики и тест-систем для оценки и выявления распространения вируса. При этом надежность и чувствительность предлагаемых тест-систем и анализов напрямую связаны с качеством разработанных праймеров и контрольных образцов. Если полученные праймеры не соответствуют общепринятым требованиям, а низкая чувствительность и специфичность могут привести к ложноотрицательным или ложноположительным результатам, отсутствие разработанного положительного контроля затрудняет сравнение различных анализов. Поэтому при разработке клинко-диагностических тест-систем высокое качество разрабатываемых праймеров и наличие положительного контроля

являются одними из основных требований и задач, предъявляемых к тест-системам.

По указанным выше причинам по результатам исследования были сделаны следующие выводы:

1. В ходе исследования с учетом генетических вариаций вируса были разработаны праймеры (RdRp-436F и RdRp-588R) и флуоресцентный зонд (зонд RdRp-478), специфичные к консервативным участкам гена RdRp вируса SARS-CoV-2.

2. Для стандартизации тест-систем был создан синтетический положительный контроль на основе плазмидных конструкций, содержащих участки целевых генов SARS-CoV-2. ПКО позволяет не только повысить точность и подтвердить диагностики, но и стандартизировать процесс тестирования на всех этапах: от выделения РНК до амплификации.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Исследование было проведено в рамках реализации инициативного проекта ТОО НИИПБ АО «Национальный холдинг «QazBioPharm», государственный регистрационный номер 0120РКИ0089.

Литература

1. Припутневич Т.В., Гордеев А.Б., Гончарук О.Д., Чубаров В.В., Трофимов Д.Ю., Быстрицкий А.А., Донников А.Е. “Опыт разработки и использования новой тест-системы для скрининга и диагностики инфекций, вызывающих острые респираторные заболевания.” *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика* 21, №3 (2022): 72-79. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-72-79>
2. Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu L, Theodoratou E, Qazi S, Lukšić I, Fischer Walker CL, Black RE, Campbell H; “Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG). Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries.” *J Glob Health* 3, no. 1 (2013): doi: 10.7189/jogh.03.010401.
3. Припутневич Т.В., Ачкасова Е.Н., Чубаров В.В., Гордеев А.Б. “Острые респираторные заболевания и грипп в современном акушерстве: эпидемиологические особенности и проблемы диагностики: обзор литературы.” *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика* 18, №3 (2019): 89-97. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-3-89-97>
4. Орлова НВ, Суранова ТГ. “Острые респираторные заболевания: особенности течения, медикаментозная терапия.” *Медицинский Совет* 15, (2018): 82-88. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-15-82-88>
6. Ayittey F.K., Ayittey M.K., Chiwero N.B., Kamasah J.S., Dzuovor C. “Economic impacts of Wuhan 2019-nCoV on China and the world.” *J Med Virol.* (2020). <https://doi.org/10.1002/jmv.25706>
7. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 16 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---16-march-2020>
8. Chung YS, Lee NJ, Woo SH, Kim JM, Kim HM, Jo HJ, Park YE, Han MG. “Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea.” *Sci Rep* 11, no 1 (2021): 14817. doi: 10.1038/s41598-021-94196-3
9. COVID-19 Cases, World. WHO COVID-19 dashboard. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=001&n=o>
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. “Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.” *Euro Surveill* 25, no 3 (2020): 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
11. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Catherine Muenker M, Moore AJ, Klein J, Lu P, Lu-Culligan A, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Tokuyama M, Venkataraman A, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Cheemarla NR, White EB, Lapidus S, Earnest R, Geng B, Vijayakumar P, Odio C, Fournier J, Bermejo S, Farhadian S, Dela Cruz CS, Iwasaki A, Ko AI, Landry ML, Foxman EF, Grubaugh ND. “Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets”. *Nat Microbiol* 5, no 10 (2020): 1299-1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6.
12. Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, Pas SD, Goorhuis A, Schinkel J, Molenkamp R, Kümmerer BM, Bleicker T, Brünink S, Eschbach-Bludau M, Eis-Hübinger AM, Koopmans MP, Schmidt-Chanasit J, Grobusch MP, de Lamballerie X, Drosten C, Drexler JF. “Assay optimization for molecular detection of Zika virus.” *Bull World Health Organ* 94, no 12 (2016): 880-892. doi: 10.2471/BLT.16.175950.
13. Anahtar MN, Shaw B, Slater D, Byrne E, Botti-Lodovico Y, Adams G, Schaffner S, Eversley J, McGrath G, Gogakos T, Lennerz J, Desai Marble H, Ritterhouse LL, Batten J, Georgantas NZ, Pellerin R, Signorelli S, Thierauf J, Kemball M, Happi C, Grant DS, Ndiaye D, Siddle KJ, Mehta SB, Harris J, Ryan ET, Pierce V, LaRocque R, Lemieux JE, Sabeti P, Rosenberg E, Branda J, Turbett SE. “Development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2: A guide and case study in setting up an emergency-use, laboratory-developed molecular assay. medRxiv [Preprint]. 2020 Sep 1:2020.08.26.20157297. doi: 10.1101/2020.08.26.20157297. Update in.” *Clin Pathol.* 74, no 8 (2021): 496-503. doi: 10.1136/jclinpath-2020-207128
14. Dorlass EG, Monteiro CO, Viana AO, Soares CP, Machado RRG, Thomazelli LM, Araujo DB, Leal FB, Candido ED, Telezynski BL, Valério CA, Chalup VN, Mello R, Almeida FJ, Aguiar AS, Barrientos ACM, Sucupira C, De Paulis M, Sáfiadi MAP, Silva DGBP, Sodré JJM, Soledade MP, Matos SF, Ferreira SR, Pinez CMN, Buonafina CP, Pieroni LNF, Malta FM, Santana RAF, Souza EC, Fock RA, Pinho JRR, Ferreira LCS, Botosso VF, Durigon EL, Oliveira DBL. “Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR.” *Braz J Microbiol* 51, no.3 (2020): 1117-1123. doi: 10.1007/s42770-020-00347-5.
15. Bhadra S, Riedel TE, Lakhota S, Tran ND, Ellington AD. “High-Surety Isothermal Amplification and Detection of SARS-CoV-2.” *mSphere* 6, no.3 (2021): e00911-20. doi: 10.1128/mSphere.00911-20
16. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. “Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification.” *PLoS One* 15, no.6 (2020): e0234682. doi: 10.1371/journal.pone.0234682
17. Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, Daneshnia F, Yu J, Liao W, Pei H, Li X, Lass-Flörl C. “Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System

Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19." *Front Cell Infect Microbiol* 10, (2020): 331. doi: 10.3389/fcimb.2020.00331

18. Xue G, Li S, Zhang W, Du B, Cui J, Yan C, Huang L, Chen L, Zhao L, Sun Y, Li N, Zhao H, Feng Y, Wang Z, Liu S, Zhang Q, Xie X, Liu D, Yao H, Yuan J. "Reverse-Transcription Recombinase-Aided Amplification Assay for Rapid Detection of the 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2)." *Anal Chem* 92, no.14 (2020): 9699-9705. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01032

19. Wu T, Ge Y, Zhao K, Zhu X, Chen Y, Wu B, Zhu F, Zhu B, Cui L. "A reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid detection of N gene of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2)." *Virology* 549, (2020): 1-4. doi: 10.1016/j.virol.2020.07.006

20. Yu B, Xu C, Huang S, Ni J, Zhou J, Zhang y, Wu M, Zhang J, Fang L. "Development of a universal real-time RT-PCR assay for detection of pan-SARS-coronaviruses with an RNA-based internal control." *Front Microbiol* 14.1181097, (2023). doi: 10.3389/fmicb.2023.1181097

21. Kutumbetov L., Orynbaev M., Zakarya K., Kerimbayev A., Zhugunissov K., Sultankulova K., et al. (2020). The strain "SARS-CoV-2/KZ_Almalyk/04.2020" of the coronavirus infection COVID-19, used for the preparation of specific prophylaxis, laboratory diagnostics and evaluation of the effectiveness of biological protection of vaccines against coronavirus infection COVID-19. Patent 2020:34762

22. Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. "Mutations on COVID-19 diagnostic targets." *Genomics* 112, no. 6 (2020): 5204-5213. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.028.

23. Ma S, Xiao G, Deng X, Tong M, Huang J, Li Q, Zhang Y. "CovidShiny: An Integrated Web Tool for SARS-CoV-2 Mutation Profiling and Molecular Diagnosis Assay Evaluation In Silico." *Viruses* 15, no.10 (2023). doi: 10.3390/v15102017

24. Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, Akite N, Ho J, Lee RT, Yeo W, Curation Team GC, Maurer-Stroh S. "GISAID's Role in Pandemic Response." *China CDC Wkly* 3, no.49 (2021): 1049-1051. doi: 10.46234/ccdcw2021.255.

25. O'Toole Á, Pybus OG, Abram ME, Kelly EJ, Rambaut A. "Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences." *BMC Genomics* 23, no.1 (2022): 121. doi: 10.1186/s12864-022-08358-2

26. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, Sagulenko P, Bedford T, Neher RA. "Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution." *Bioinformatics* 34, no. 23 (2018): 4121-4123. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407

27. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." *BMC Bioinformatics* 13, (2012):134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

28. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." *Nucleic Acids Res* 35, (2007): W71-4. doi: 10.1093/nar/gkm306.

29. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* 40, no.15 (2012): e115. doi: 10.1093/nar/gks596.

30. Vural-Ozdeniz M, Akturk A, Demirdizen M, Leka R, Acar R, Konu O. "CoVrimer: A tool for aligning SARS-CoV-2 primer sequences and selection of conserved/degenerate primers." *Genomics* 113, no.5 (2021): 3174-3184. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.07.020.

31. Nascimento Junior JAC, Santos AM, Oliveira AMS, Guimarães AG, Quintans-Júnior LJ, Coutinho HDM, Martins N, Borges LP, Serafini MR. "Trends in MERS-CoV, SARS-CoV, and SARS-CoV-2 (COVID-19) Diagnosis Strategies: A Patent Review." *Front Public Health* 8, (2020): 563095. doi: 10.3389/fpubh.2020

32. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, Fung AY, Ng AC, Zou Z, Tsoi HW, Choi GK, Tam AR, Cheng VC, Chan KH, Tsang OT, Yuen KY. "Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeL Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens." *J Clin Microbiol* 58, no.5 (2020): e00310-20. doi: 10.1128/JCM.00310-20

33. Zhou Y, Zhang L, Xie YH, Wu J. "Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics." *Lab Invest* 102, no.1 (2022): P. 4-13. doi: 10.1038/s41374-021-00663-w

34. Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten, Olfert Landt, Marion Koopmans, Maria Zambon. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf> (дата обращения: 12.03.2025)

35. Н.С. Кожабегенов, А.И. Тагайев, М.Р. Абаева, К.Т. Султанкулова, Е.О. Абдураимов, А.К. Наханов, К.Д. Закарья. "Разработка тест-системы для диагностики вируса нодулярного дерматита КРС на основе метода ПЦР в режиме реального времени." *БИОКАУПСІЗДІК ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ* 8, (2021): 31 – 40.

36. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. "Причины ложно-негативной пцр и недопущение некоторых из них." *Биомика* 4, №1 (2012): 31-47

References

1. Pripitnevich T.V., Gordeev A.B., Goncharuk O.D., Chubarov V.V., Trofimov D.Yu., Bystritsky A.A., Donnikov A.E. "Experience in developing a new test system for screening and diagnosis of infections that cause acute respiratory diseases, and its use." *Epidemiology and Vaccinal Prevention* 21, no.3. (2022): 72-79. (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-72-79>

2. Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu L, Theodoratou E, Qazi S, Lukšić I, Fischer Walker CL, Black RE, Campbell H; "Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG). Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries." *J Glob Health* 3, no. 1 (2013): doi: 10.7189/jogh.03.010401.

3. Pripitnevich T.V., Achkasova E.N., Chubarov V.V., Gordeev A.B. "Acute Respiratory Diseases and Influenza in Modern Obstetrics: Epidemiological Features and Diagnostic Problems: Literature Review." *Epidemiology and Vaccinal Prevention* 18, no.3 (2019): 89-97. (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-3-89-97>

4. Orlova NV, Suranova TG. "Acute respiratory diseases: progression features, pharmaceutical therapy." *Meditsinskiy sovet = Medical Council* 15, (2018): 82-88. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-15-82-88>

6. Ayithey F.K., Ayithey M.K., Chiwero N.B., Kamasah J.S., Dzuvoor C. "Economic impacts of Wuhan 2019-nCoV on China and the world." *J Med Virol.* (2020). <https://doi.org/10.1002/jmv.25706>
7. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 16 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---16-march-2020>
8. Chung YS, Lee NJ, Woo SH, Kim JM, Kim HM, Jo HJ, Park YE, Han MG. "Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea." *Sci Rep* 11, no 1 (2021): 14817. doi: 10.1038/s41598-021-94196-3
9. COVID-19 Cases, World. WHO COVID-19 dashboard. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=001&n=o>
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." *Euro Surveill* 25, no 3 (2020): 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
11. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Catherine Muenker M, Moore AJ, Klein J, Lu P, Lu-Culligan A, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Tokuyama M, Venkataraman A, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Cheemarla NR, White EB, Lapidus S, Earnest R, Geng B, Vijayakumar P, Odio C, Fournier J, Bermejo S, Farhadian S, Dela Cruz CS, Iwasaki A, Ko AI, Landry ML, Foxman EF, Grubaugh ND. "Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets". *Nat Microbiol* 5, no 10 (2020): 1299-1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6.
12. Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, Pas SD, Goorhuis A, Schinkel J, Molenkamp R, Kümmerer BM, Bleicker T, Brünink S, Eschbach-Bludau M, Eis-Hübinger AM, Koopmans MP, Schmidt-Chanasit J, Grobusch MP, de Lamballerie X, Drosten C, Drexler JF. "Assay optimization for molecular detection of Zika virus." *Bull World Health Organ* 94, no 12 (2016): 880-892. doi: 10.2471/BLT.16.175950.
13. Anahtar MN, Shaw B, Slater D, Byrne E, Botti-Lodovico Y, Adams G, Schaffner S, Eversley J, McGrath G, Gogakos T, Lennerz J, Desai Marble H, Ritterhouse LL, Batten J, Georgantas NZ, Pellerin R, Signorelli S, Thierauf J, Kembal M, Happi C, Grant DS, Ndiaye D, Siddle KJ, Mehta SB, Harris J, Ryan ET, Pierce V, LaRocque R, Lemieux JE, Sabeti P, Rosenberg E, Branda J, Turbett SE. "Development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2: A guide and case study in setting up an emergency-use, laboratory-developed molecular assay. medRxiv [Preprint]. 2020 Sep 1:2020.08.26.20157297. doi: 10.1101/2020.08.26.20157297. Update in." *Clin Pathol.* 74, no 8 (2021): 496-503. doi: 10.1136/jclinpath-2020-207128
14. Dorlass EG, Monteiro CO, Viana AO, Soares CP, Machado RRG, Thomazelli LM, Araujo DB, Leal FB, Candido ED, Telezynski BL, Valério CA, Chalup VN, Mello R, Almeida FJ, Aguiar AS, Barrientos ACM, Sucupira C, De Paulis M, Sáfiadi MAP, Silva DGBP, Sodré JJM, Soledade MP, Matos SF, Ferreira SR, Pinez CMN, Buonafina CP, Pieroni LNF, Malta FM, Santana RAF, Souza EC, Fock RA, Pinho JRR, Ferreira LCS, Botosso VF, Durigon EL, Oliveira DBL. "Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR." *Braz J Microbiol* 51, no.3 (2020): 1117-1123. doi: 10.1007/s42770-020-00347-5.
15. Bhadra S, Riedel TE, Lakhota S, Tran ND, Ellington AD. "High-Surety Isothermal Amplification and Detection of SARS-CoV-2." *mSphere* 6, no.3 (2021): e00911-20. doi: 10.1128/mSphere.00911-20
16. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. "Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification." *PLoS One* 15, no.6 (2020): e0234682. doi: 10.1371/journal.pone.0234682
17. Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, Daneshnia F, Yu J, Liao W, Pei H, Li X, Lass-Flörl C. "Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19." *Front Cell Infect Microbiol* 10, (2020): 331. doi: 10.3389/fcimb.2020.00331
18. Xue G, Li S, Zhang W, Du B, Cui J, Yan C, Huang L, Chen L, Zhao L, Sun Y, Li N, Zhao H, Feng Y, Wang Z, Liu S, Zhang Q, Xie X, Liu D, Yao H, Yuan J. "Reverse-Transcription Recombinase-Aided Amplification Assay for Rapid Detection of the 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2)." *Anal Chem* 92, no.14 (2020): 9699-9705. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01032
19. Wu T, Ge Y, Zhao K, Zhu X, Chen Y, Wu B, Zhu F, Zhu B, Cui L. "A reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid detection of N gene of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2)." *Virology* 549, (2020): 1-4. doi: 10.1016/j.virol.2020.07.006
20. Yu B, Xu C, Huang S, Ni J, Zhou J, Zhang y, Wu M, Zhang J, Fang L. "Development of a universal real-time RT-PCR assay for detection of pan-SARS-coronaviruses with an RNA-based internal control." *Front Microbiol* 14.1181097, (2023). doi: 10.3389/fmicb.2023.1181097
21. Kutumbetov L., Orynbaev M., Zakarya K., Kerimbayev A., Zhugunissov K., Sultankulova K., et al. (2020). The strain "SARS-CoV-2/KZ_Almalyk/04.2020" of the coronavirus infection COVID-19, used for the preparation of specific prophylaxis, laboratory diagnostics and evaluation of the effectiveness of biological protection of vaccines against coronavirus infection COVID-19. Patent 2020:34762
22. Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. "Mutations on COVID-19 diagnostic targets." *Genomics* 112, no. 6 (2020): 5204-5213. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.028.
23. Ma S, Xiao G, Deng X, Tong M, Huang J, Li Q, Zhang Y. "CovidShiny: An Integrated Web Tool for SARS-CoV-2 Mutation Profiling and Molecular Diagnosis Assay Evaluation In Silico." *Viruses* 15, no.10 (2023). doi: 10.3390/v15102017
24. Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, Akite N, Ho J, Lee RT, Yeo W, Curation Team GC, Maurer-Stroh S. "GISAID's Role in Pandemic Response." *China CDC Wkly* 3, no.49 (2021): 1049-1051. doi: 10.46234/ccdcw2021.255.
25. O'Toole A, Pybus OG, Abram ME, Kelly EJ, Rambaut A. "Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences." *BMC Genomics* 23, no.1 (2022): 121. doi: 10.1186/s12864-022-08358-2
26. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, Sagulenko P, Bedford T, Neher RA. "Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution." *Bioinformatics* 34, no. 23 (2018): 4121-4123. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407

27. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." *BMC Bioinformatics* 13, (2012):134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
28. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." *Nucleic Acids Res* 35, (2007): W71-4. doi: 10.1093/nar/gkm306.
29. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* 40, no.15 (2012): e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
30. Vural-Ozdeniz M, Akturk A, Demirdizen M, Leka R, Acar R, Konu O. "CoVrimer: A tool for aligning SARS-CoV-2 primer sequences and selection of conserved/degenerate primers." *Genomics* 113, no.5 (2021): 3174-3184. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.07.020.
31. Nascimento Junior JAC, Santos AM, Oliveira AMS, Guimarães AG, Quintans-Júnior LJ, Coutinho HDM, Martins N, Borges LP, Serafini MR. "Trends in MERS-CoV, SARS-CoV, and SARS-CoV-2 (COVID-19) Diagnosis Strategies: A Patent Review." *Front Public Health* 8, (2020): 563095. doi: 10.3389/fpubh.2020
32. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, Fung AY, Ng AC, Zou Z, Tsoi HW, Choi GK, Tam AR, Cheng VC, Chan KH, Tsang OT, Yuen KY. "Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeL Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens." *J Clin Microbiol* 58, no.5 (2020): e00310-20. doi: 10.1128/JCM.00310-20
33. Zhou Y, Zhang L, Xie YH, Wu J. "Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics." *Lab Invest* 102, no.1 (2022): P. 4-13. doi: 10.1038/s41374-021-00663-w
34. Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten, Olfert Landt, Marion Koopmans, Maria Zambon. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf> (date of access: 12.03.2025)
35. N.S. Kozhabergenov, A.I. Tagayev, M.R. Abayeva, K.T. Sultankulova, E.O. Abduraimov, A.K. Nakhanov, K.D. Zakarya. "Development of a test system for diagnosis of cattle nodular dermatitis virus based on real-time PCR method." *BIOKAUIPSIZDIK ZHANE BIOTECHNOLOGY* 8, (2021): 31 – 40. (In Russ.)
36. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. "Causes of false-negative pcr and avoidance of some of them." *Biomics* 4, no. 1 (2012): 31-47. (In Russ.)

Информация об авторах:

Усербаев Бекболат Сабитулы (корреспондентный автор) – научный сотрудник лаборатории коллективного пользования ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, b.userbayev@biosafety.kz).

Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна – кандидат биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной биологии и генной инженерии ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, k.sultankulova@biosafety.kz).

Жұмаділ Балнур Нурболқызы – старший лаборант лаборатории коллективного пользования ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, b.zhumadil@biosafety.kz).

Червякова Ольга Викторовна – заместитель генерального директора по науке и коммерциализации, кандидат биологических наук, профессор, ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, o.chervyakova@biosafety.kz).

Шыныбекова Гаухар Орынбековна – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и генной инженерии ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, g.shynybekova@biosafety.kz).

Кожаберженов Нурлан Сиязбекович – заведующий лабораторией коллективного пользования ТОО НИИПББ, АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» (пгм. Гвардейский, Казахстан, n.kozhabergenov@biosafety.kz).

Information about authors:

Userbayev Bekbolat Sabituly (corresponding author) – researcher at the Laboratory of Collective Use of RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeysky uts, Kazakhstan, b.userbayev@biosafety.kz).

Sultankulova Kulyaysan Turlybaevna – Candidate of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering of the RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeysky uts, Kazakhstan, k.sultankulova@biosafety.kz).

Zhumadil Balnur, Nurbolgyzy – senior laboratory assistant at the Laboratory of Collective Use of the RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeysky uts, Kazakhstan, b.zhumadil@biosafety.kz).

Chervyakova Olga Viktorovna – Deputy General Director for Science and Commercialization, Candidate of Biological Sciences, Professor, RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeyskiy uts, Kazakhstan, o.chervyakova@biosafety.kz).

Shynybekova Gauhar Orynbekovna – Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering of the RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeysky uts, Kazakhstan, g.shynybekova@biosafety.kz).

Kozhabergenov Nurlan Siyazbekovich – Head of the Laboratory of Collective Use of the RIBSP LLP, JSC «National Holding QazBioPharm» (Gvardeysky uts, Kazakhstan, n.kozhabergenov@biosafety.kz).

Поступило 11 декабря 2024 года
Повторно загружено 1 апреля 2025 года
Принято 20 мая 2025 года