

Способ количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени для измерения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов у пациентов с COVID-19

Научный руководитель – Абдуллаев Адхамжон Одилович

Одилов А.А.¹, Одилов А.А.²

1 - Российский университет дружбы народов, Медицинский факультет, Москва, Россия, *E-mail: a.odilov.tma@gmail.com*; 2 - Ташкентская медицинская академия, Лечебный факультет, Ташкент, Узбекистан, *E-mail: alisher.odilov99@gmail.com*

Введение. Основной причиной смерти пациентов с COVID-19 является развитие острого респираторного дистресс синдрома и полиорганной недостаточности, обусловленной диссеминацией и поражающим воздействием SARS-CoV-2 в ткани жизненно важных органов. Однако, уровень вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в тканях пораженных органов остается неизвестной из-за технических препятствий, связанных с отсутствием способа количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР РВ).

Цель. Разработка способа кПЦР РВ, позволяющего количественно оценить уровень ВН в тканях пораженных коронавирусом SARS-CoV-2 органов.

Материалы и методы. В качестве материала использованы фиксированные в 10% растворе формалина и заключенные в парафин образцы тканей легкого, сердца, печени и селезенки, взятые для обязательных патологоанатомических исследований. Выделение РНК осуществлено из 10-12 срезов тканей толщиной 3 мкм с использованием набора реагентов Pure Link™ FFPE (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя. Для получения кДНК в объеме 20 мкл проведена реакция обратной транскрипции с использованием 10 мкл раствора РНК и набора реагентов «Реверта-L» («Интерлаб-сервис», Россия), в соответствии с инструкцией производителя. кПЦР РВ проводилась в амплификаторе Rotor-Gene Q («Qiagen», США) с использованием реагентов для ПЦР РВ («Синтол», Россия), набора праймеров и флуоресцентных зондов для РНК SARS-CoV-2 и человеческого *ABL1*. Число копий РНК SARS-CoV-2 и *ABL1* рассчитаны специальной программой прибора, при коэффициенте корреляции серийных разведений копий плазмид pGEM®-T Easy, содержащих клонированный ампликон кДНК SARS-CoV-2 и *ABL1*, равной $R^2 \geq 0,99$ и эффективности не ниже 0,9. ВН рассчитывалась по формуле: число копий РНК SARS-CoV-2 / число копий РНК *ABL1* x 100.

Результаты. Название исследованных образцов, число пороговых циклов и копий РНК SARS-CoV-2 и *ABL1*, а также графические кривые кПЦР РВ, представлены на рисунке 1. Число копий РНК SARS-CoV-2 и *ABL1* в легких составило 163845 и 20330, сердце - 1341388 и 137741, печени - 167436 и 27812, и селезенке - 151327 и 24047, соответственно. ВН SARS-CoV-2 в исследованных тканях составила соответственно 806, 974, 602 и 629 копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий РНК *ABL1*. Данный способ апробирован в тканях различных органов 7 пациентов с COVID-19. Медиана ВН в легких составила 9147 (диапазон - 34-444847), сердце - 127 (64-1035), печени - 35 (24-1287), и селезенке - 50 (9-489) копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий РНК *ABL1*.

Выводы. Разработанный способ кПЦР РВ может использоваться для выявления РНК SARS-CoV-2 и количественной оценки ВН в аутопсийном, операционном и биопсийном образцах тканей различных органов пациентов с COVID-19.

Иллюстрации

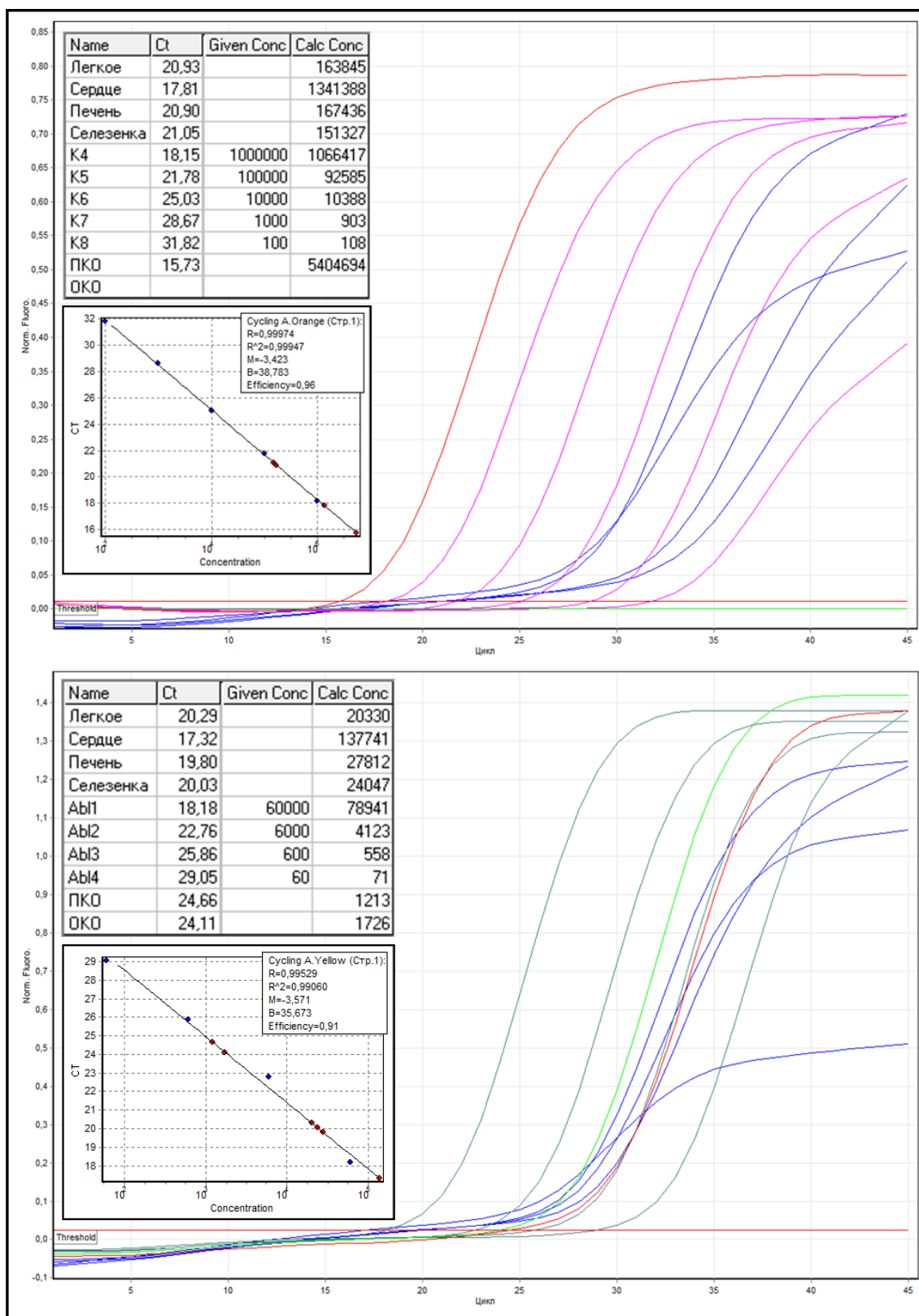


Рис. 1. Число пороговых циклов и копий РНК SARS-CoV-2 и ABL1 в тканях легкого, сердца, печени и селезенки пациента с COVID-19