

Опыт Центральной референтной лаборатории по реагированию на угрозу распространения возбудителя нового инфекционного заболевания COVID-19



Национальный центр биотехнологии,
г. Нур-Султан



Филиал НЦБ в Центральной референтной
лаборатории, г. Алматы

Структура Центральной референтной лаборатории



Миссия и задачи ЦРЛ

Миссия ЦРЛ

- Усиление диагностических и исследовательских возможностей.
- Разработки и реализация государственной политики в системе эпидемиологического мониторинга за особо опасными инфекциями.
- Предоставления услуг в области профилактики особо опасных инфекций.

Задачи ЦРЛ

- Расширение потенциала по обнаружению, диагностике и реагированию на биологические угрозы.
- Консолидация и обеспечение хранения коллекций особо опасных патогенов МЗ РК и МСХ РК.
- Внедрение международной лабораторной практики и стандартов биобезопасности.





Задачи АФ НЦБ в ЦРЛ

- Оказание содействия подразделениям МЗ РК и МСХ РК в области применения наукоемких технологий.
- Проведение собственных исследований и разработок в рамках отечественного и международного грантового финансирования.
- Адаптация современных методов и разработок в области биологической безопасности и молекулярной биологии, а также способствование их внедрению в лабораторную практику подразделений МЗ и МСХ.



Реагирование на COVID-19

24 января 2020 года специалисты Филиала РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК в г. Алматы (АФ НЦБ) в Центральной референтной лаборатории выступили с двумя инициативами:

1. помощь государству в проведении диагностических исследований на наличие 2019-nCoV (COVID-19) с полным развертыванием диагностического алгоритма на базе ЦРЛ за 10 дней;
2. разработка и создание опытной партии отечественных ПЦР наборов для выявления SARS-CoV-2 (на 6000 тестов) за 3 месяца для последующей передачи подразделениям МЗ РК.



Проведение диагностических исследований на наличие SARS-CoV-2



Первая задача была реализована за 6 дней вместо 10 запланированных. На основе рекомендованных и опубликованных ВОЗ протоколов специалисты АФ НЦБ приступили к созданию праймеров и зондов для диагностики коронавируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

С 30 января 2020 года АФ НЦБ совместно с Национальным научным центром особо опасных инфекций имени Масгута Айткымбаева МЗ РК (ННЦООИ), после тщательно проведенных подготовительных работ приступили к диагностике проб, полученных от пациентов с подозрением на коронавирусную инфекцию COVID-19.

Для обеспечения нужд ЦРЛ все праймеры, зонды и внутренние контрольные образцы в достаточном объеме были самостоятельно синтезированы по инициативе и из средств НЦБ. Для проведения анализов использовались реагенты, расходные материалы и средства индивидуальной защиты из собственных резервов АФ НЦБ и ННЦООИ.

Разработка отечественных диагностических систем на SARS-CoV-2

По второй задаче специалистами НЦБ и АФ НЦБ в трех месячный срок были проведены следующие работы:

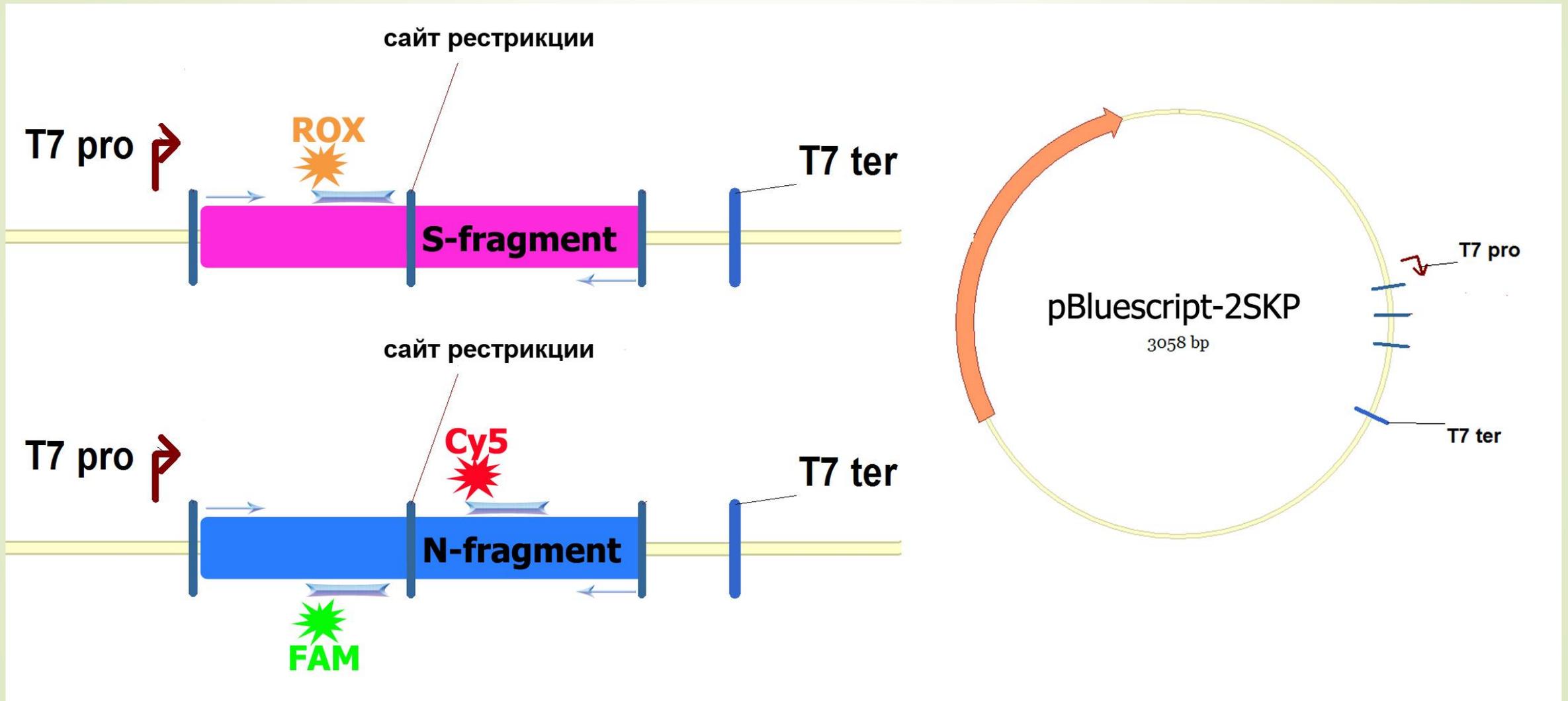
- 1) компьютерное моделирование компонентов диагностической системы (праймеры, зонды, контроли);
- 2) синтез опытных образцов компонентов тест-систем;
- 3) создание системы контрольных образцов;
- 4) оптимизация условий проведения ПЦР анализа;
- 5) создание оптимизированного протокола исследования (рецептуры);
- 6) проведены работы по внутренней валидации теста – подтверждение чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов;
- 7) завершен полупромышленный синтез праймеров и зондов;
- 8) завершенно формирование партии тест-систем и передача подразделению МЗ РК.

На данный момент:

- получена лицензия на производство изделий медицинского назначения;
- полностью завершена регистрация тест-системы «Sarbeco/SARS-CoV-2 Screen».

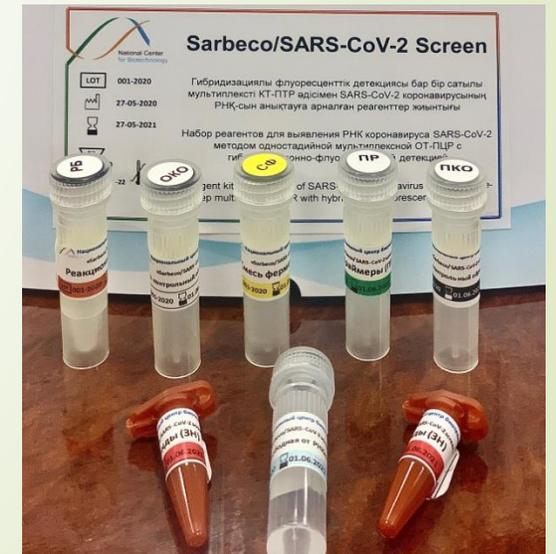


Положительные контроли на SARS-CoV-2 spike-protein (S) и nucleocapsid protein (N)



Преимущества тест-системы «Sarbeco/SARS-CoV-2 Screen» (НЦБ, Казахстан)

- Наличие уникальной системы контролей для оценки корректности стадий исследования:
 - 1) забор материала;
 - 2) выделение РНК;
 - 3) проведение ОТ-ПЦР;
 - 4) контроль наличия контаминации (загрязнения в лаборатории).
- Высокая аналитическая чувствительность 10 копий кДНК SARS-CoV-2 в реакционной смеси.
- Одностадийная реакция для ускоренной детекции.
- Стабильность детекции возбудителя в пробе за счет наличие двух мишеней в геноме вируса.
- Удешевление себестоимости за счет производства компонентов в РК.
- Разработка под приборы наиболее распространенные в сети лабораторий РК – RotorGene 6000/Q и возможная адаптация под другое оборудование.
- Возможность перевода тест-системы на ферменты собственного производства.



Состав отечественного диагностикума SARS-CoV-2 в сравнении с дизайном по протоколу, рекомендованному ВОЗ

Праймеры/пробы, рекомендованные ВОЗ, и используемые в настоящее время		Праймеры/пробы разрабатываемой тест-системы SARS/SARS-2	
Специфичность к гену	Набор, краситель	Специфичность к гену	Набор, краситель
ORF1ab вся группа β-коронавирусов	RdRP_SARSr-F2 / RdRP_SARSr-R1 FAM-RdRP_SARSr-P1	N protein вся группа β-коронавирусов	FwN / RvN FAM-ProbeNcon
ORF1ab специфичен к SARS-2	RdRP_SARSr-F2 / RdRP_SARSr-R1 FAM-RdRP_SARSr-P2	N protein специфичен к SARS-2	FwN / RvN Cy5-ProbeNvarC
E protein вся группа сарбеко-вирусов	E_Sarbeco_F1 / E_Sarbeco_R2 FAM-E_Sarbeco_P1	S protein специфичен к SARS-2	FwS / RvS ROX-ProbeS
N protein вся группа β-коронавирусов	HKU-NF / HKU-NR FAM-HKU-NP	β-актин человека	FwActB / RevActB R6G-ActB-P
		RPS23 человека	FwRPS23 / RvRPS23 Cy5.5-RPS23-P

Наращивание мощностей производства и ассортимента тест-систем

- Произведено дооснащение лабораторно-производственной базы НЦБ и его Филиала в ЦРЛ за счет средств МОН РК.
- Завершается разработка новой тест-системы:
 - **«Sarbeco/SARS-CoV-2 Basic»**- удешевленная версия для рутинных исследований.
- Осуществление этапа исследований и разработки (R&D) для производства собственных ферментов для ОТ-ПЦР.



Практическая помощь НЦБ и АФ НЦБ здравоохранению РК с применением молекулярно-генетических технологий

- Развертывание и проведение диагностики лиц с подозрением на COVID-19 в режиме 24/7 (январь-июнь 2020 года.).
- Проведение референтных исследований (январь-июнь 2020 г.).
- Проведение независимой оценки ввозимых в РК тест-систем (ПЦР, ИФА, ИХА, ИХА на антиген).
- Разработка отечественной тест-системы на SARS-CoV-2 с выпуском опытной партии на 6000 тест-систем.
- Предоставление методических рекомендаций и экспертных заключений в области молекулярной диагностики и биологической безопасности при ее проведении.
- Мониторинг и секвенирование штаммов SARS-CoV-2 в Казахстане.
- Исследование случаев заболевания пневмониями неясной этиологии.

Исследование случаев заболевания пневмониями неясной этиологии в Западном Казахстане в 2020 году

- ▶ Специалистами АФ НЦБ в ЦРЛ по запросу подразделений МЗ РК Мангистауской области было проведено исследование тканей легких и бронхов пяти случаев материнской смертности с диагнозом пневмония и отрицательным анализом ПЦР на COVID-19.
- ▶ В результате исследования патологического материала на наличие возможных возбудителей инфекций с применением протоколов оптимизированных специалистами АФ НЦБ было установлено:
 1. В образцах тканей нижних дыхательных путей 4 женщин выявлена РНК вируса SARS-CoV-2;
 2. В одном случае из 5 исследованных не удалось обнаружить РНК вируса SARS-CoV-2 по причине давнего срока начала заболевания (более 1,5 месяца);
 3. Все результаты были подтверждены дважды.
- ▶ В результате проведенного исследования было подтверждено, что пневмонии с неясной этиологией, распространенные в то время в Казахстане вызваны с высокой долей вероятности вирусом SARS-CoV-2.
- ▶ Результаты исследований переданы в МЗ РК.

Создание Референтного центра полногеномного секвенирования опасных и особо опасных патогенов для нужд медицины и ветеринарии

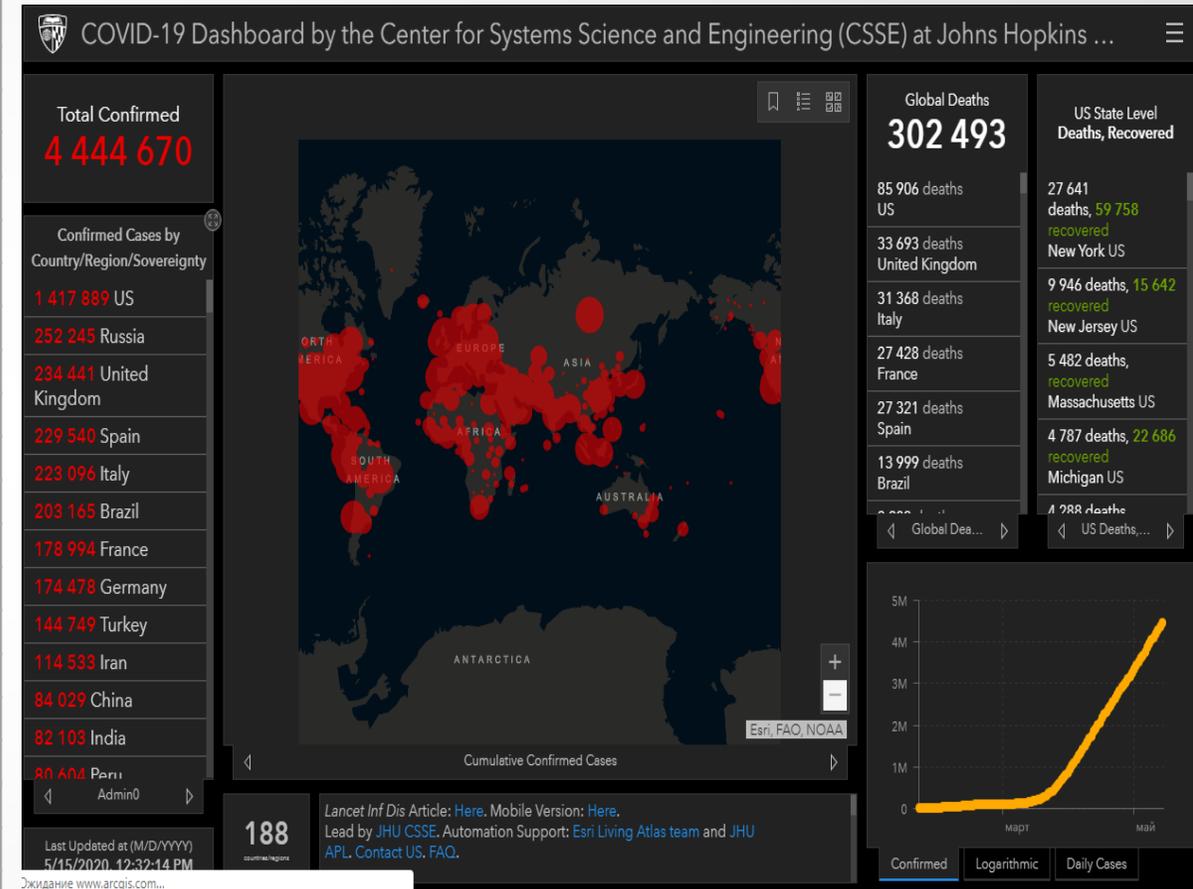
- Концепция была включена в Стратегический план развития Алматинского филиала НЦБ в ЦРЛ.
- Мероприятия по достижению этой цели начались в 2019 году. К настоящему времени пробелы в оснащении ЦРЛ ключевым оборудованием были заполнены за счет грантового финансирования МОН РК, поддержки проекта МНТЦ, DTRA и CDC.
- В то же время эта работа продолжается, так как все еще отсутствует некоторое дополнительное периферийное оборудование, и, конечно же, сама основная платформа для секвенирования следующего поколения.
- В качестве основной платформы планируется использование Illumina MiSeq, максимально соответствующей потребностям Центра полногеномного секвенирования.
- На основе имеющихся возможностей инициировано применение технологии Oxford Nanopore в ЦРЛ в исследовательской деятельности АФ НЦБ по мониторингу генотипов вируса SARS-CoV-2, циркулирующих в РК.



*Полногеномный анализ изолятов коронавируса SARS-CoV-2,
циркулирующих в Республике Казахстан*

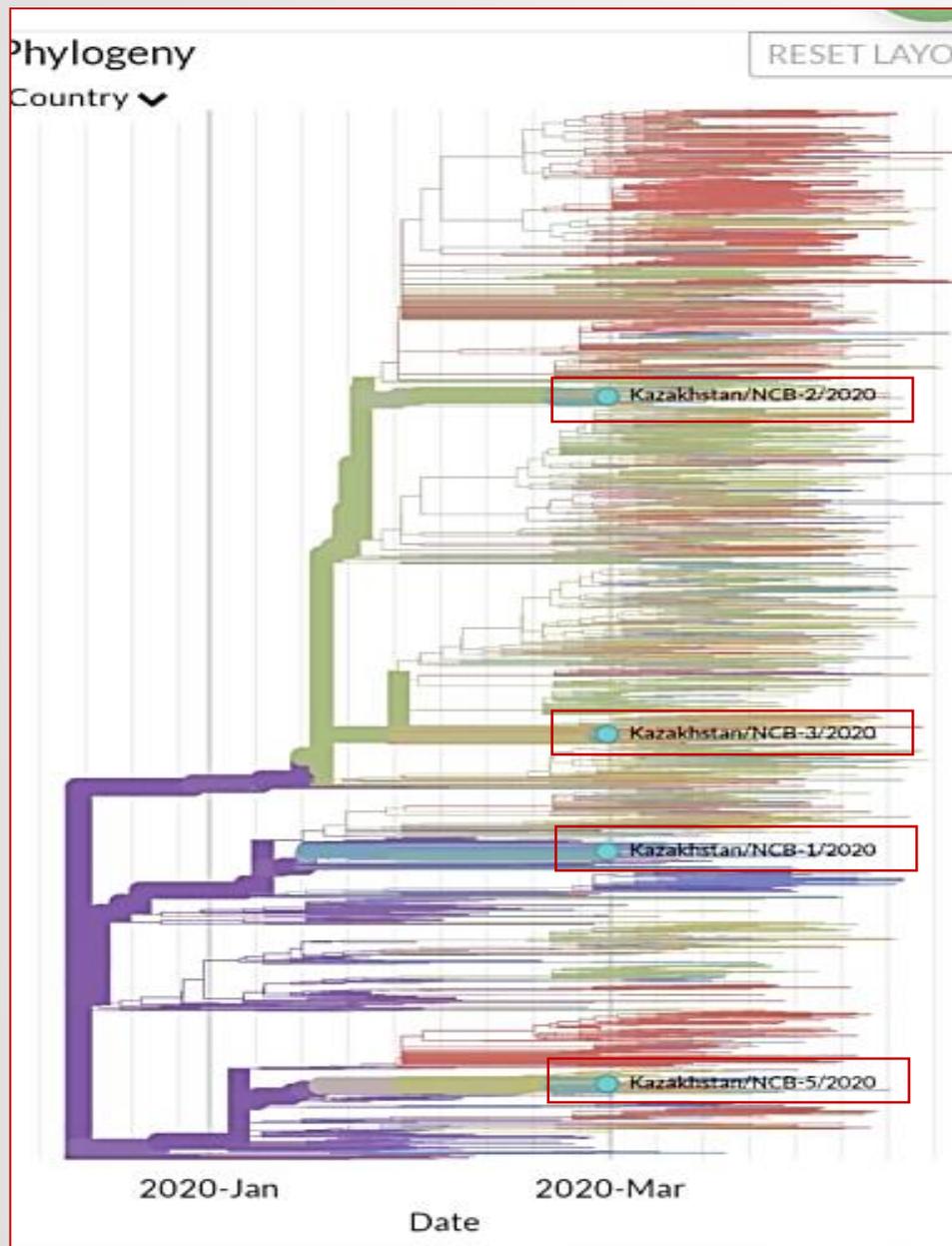
Ситуация по количеству отсеквенированных последовательностей SARS-CoV-2 на 15 мая 2020 г.

Страны и континенты	Количество последовательностей SARS-CoV-2
Все страны (ситуация на 15 мая)	25,251
Europe	16145
England	8653
USA	5513
Asia	1725
Oceania	1361
China	510
India	238
Germany	180
Canada	174
Africa	161
Russia	154
South America	148
Japan	129
Sweden	110
Italy	84
Turkey	63
Finland	40
Iran	28
Kazakhstan	4
Belarus	2
Ukraine	0
Uzbekistan	0
Tajikistan	0
Turkmenistan	0
Kyrgyzstan	0



Ожидание www.arcgis.com...

Казахстанские изоляты SARS-CoV-2, размещены в международных базах GISAID и NCBI



Название изолята	Номер доступа Genbank (NCBI submission ID)	Номер доступа GISAID (Accession ID)	Дата взятия изолята в 2020	Длина генома
hCoV-19/Kazakhstan/NCB-1/2020	MT428551	EPI_ISL_435045	22 марта	29900
hCoV-19/Kazakhstan/NCB-2/2020	MT428552	EPI_ISL_435046	25 марта	29903
hCoV-19/Kazakhstan/NCB-3/2020	MT428553	EPI_ISL_435047	25 марта	29903
hCoV-19/Kazakhstan/NCB-5/2020	MT428554	EPI_ISL_435048	21 апреля	29903

Шевцов А.Б., 2020 г.

Полногеномный анализ позволяет выявить источник заноса инфекции



Источниками заноса инфекции в г. Нур-Султан являются
Иран, Англия и Испания

Опыт НЦБ и ЦРЛ в целом доказал, что сочетание таких факторов, как наличие квалифицированных специалистов, собственной возможности синтеза ключевых диагностических компонентов и стратегического запаса расходных материалов позволило в сжатые сроки оперативно решить вопрос обеспечения Республики диагностическими средствами.

Цели поставленные в 2020 г. для усиления готовности к эпидемическим угрозам и обеспечения бесперебойной диагностики COVID-19 и других заболеваний

- Развитие центра геномных исследований, созданного на базе АФ НЦБ в 2019 году:
 1. Дооснащение платформой для полногеномного секвенирования Illumina MiSeq.
 2. Дооснащение производительными автоматизированными станциями пробоподготовки.
- Усиление диагностического потенциала ЦРЛ для скрининга свыше 3000 образцов в сутки:
 1. Роботизированные станции выделения нуклеиновых кислот для размещения в лабораториях 3-го уровня биологической безопасности.
 2. Оснащение производительными ПЦР машинами с детекцией в реальном времени в формате 384 образца.
- Использование надежных диагностических систем, имеющих 2 и более мишеней в геноме возбудителя заболевания.
- Создание и поддержание стратегического запаса расходных материалов и средств индивидуальной защиты.
- Создание в стране собственного производства компонентов тест систем.

Спасибо за внимание