

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Безродный С.Л.^{1,3}, Жигалева О.Н.¹, Марданлы С.Г.^{1,4}, Помазанов В.В.², Гашенко Т.Ю.¹

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА SARS-COV-2 В НАЗО- И ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫХ МАЗКАХ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ЗАО Эколаб, 142530, Московская область, Электрогорск;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 142611, Московская область, | г. Орехово-Зуево;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

Коронавирусная инфекция продолжает распространяться по всему миру. В связи с этим целью данной работы - разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2. Набор разработан в ЗАО «ЭКОлаб». Для разработки набора были использованы 20 положительных образцов. Метод исследования состоял из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени». Основные характеристики набора: аналитическая чувствительность – 100%, специфичность – 100%, точность – 100%. Таким образом, разработанная нами методика диагностики новой коронавирусной инфекции на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволяет качественно и быстро выявлять РНК бетакоронавируса в клиническом материале больных и здоровых лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию и другими симптомами ОРВИ.

Ключевые слова: COVID-19; пандемия, ПЦР-анализ; ОТ-ПЦР в режиме реального времени, диагностика инфекций.

Для цитирования: Безродный С.Л. Жигалева О.Н. Марданлы С.Г. Помазанов В.В. Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 663-667. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667>

Для корреспонденции: Безродный Святослав Леонидович; e-mail: frebiotik@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.08.2022

Принята к печати 15.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

Bezrodny S.L.^{1,3}, Zhigaleva O.N.¹, Mardanly S.G.^{1,4}, Pomazanov V.V.², Gashenko T.Yu.¹

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR QUALITATIVE DETECTION OF SARS-COV-2 VIRUS RNA IN NASO AND OROPHARYNGEAL SMABS BY REAL-TIME RT-PCR

¹CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²The «State Humanitarian and Technological University», 142611, Moscow region, Orekhovo-Zuevo, Russia;

³G. N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

⁴FGAOU VO «First MGUMU named after I. M. Sechenov» Ministry of Health of Russia, 119991, Moscow, Russia

The coronavirus infection continues to spread around the world. In this regard, the purpose of this work was: to develop a set of reagents for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA. The set was developed by CJSC «Ecolab», 20 positive samples were used to develop the kit. The research method consisted of several stages: isolation of SARS-CoV-2 RNA, RNA reverse transcription reaction and PCR amplification of cDNA with simultaneous detection of the result in real time. The main characteristics of the kit: analytical sensitivity - 100%, specificity - 100%, accuracy - 100%. Thus, our method for diagnosing a new coronavirus infection based on real-time RT-PCR makes it possible to qualitatively and quickly detect betacoronavirus RNA in clinical material from patients and healthy individuals with suspected coronavirus infection and other symptoms of SARS. Keywords: COVID-19; pandemic, PCR analysis; Real-time RT-PCR, diagnosis of infections.

For citation: Bezrodny S.L. Zhigaleva O.N. Mardanly S.G. Pomazanov V.V. Gashenko T.Yu. Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 663-667 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667>

For correspondence: Bezrodny Svyatoslav Leonidovich; e-mail: frebiotik@mail.ru

Information about authors:

Bezrodny S.L., <https://orcid.org/0000-0001-5869-2503>;

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Pomazanov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>;

Gashenko T. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>.

Acknowledgment. *The study was funded by CJSC «EKOlab».*

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 15.08.2022

Accepted 15.09.2022

Published 14.11.2022

Введение. В 2019 г. мир охватила пандемия новой инфекции, вызванная РНК-содержащим вирусом из семейства *Coronaviridae* [1, 2]. Бетакоронавирус (β -CoV) является возбудителем тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 [2]. Предполагается, что коронавирус произошел от летучих мышей [3], однако есть данные указывающие на то, что коронавирус β -CoV был создан искусственным путем в лаборатории Уханьского института вирусологии (WIV) под руководством Ши Дженли и Ральфа С. Барика еще в 2015 году [4]. Геном бета-коронавирусов представлен одноцепочечной (+) РНК с 26-32 тысячами пар нуклеотидов. Общая структура генома β -CoV аналогична структуре генома других коронавирусов и включает в себя полибелок репликазы ORF1ab, а так же гены, кодирующие белки - S, M, E и N [5, 6]. Возникновение COVID-19 впервые произошло в Китае, в г. Ухань, инфекция быстро распространилась по всему миру [7]. По оценкам ВОЗ на сегодняшний день общее количество смертей от новой коронавирусной инфекции равно 6,4 миллион [8]. По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации общее число смертей от коронавирусной инфекции составляет 380 076 человек [9]

Спектр клинических признаков COVID-19, варьируется от бессимптомного течения заболевания до тяжелой дыхательной недостаточности и полиорганной дисфункции [10]. Наиболее распространенными симптомами, связанными с COVID-19, являются лихорадка, сухой кашель, одышка, образование мокроты, миалгия, повышенная утомляемость [11]. Бессимптомное течение инфекции может возникать из-за ослабления иммунных реакций и субклинических проявлений, а также из-за латентной стадии, когда вирус выживает возможность для проникновения в клетку и размножения [12].

Одним из новейших методов диагностики новой коронавирусной инфекции является метод обнаружения SARS-CoV-2 без амплификации с помощью технологии CRISPR-Cas13a микроскопии с использованием камеры мобильного телефона, однако золотым стандартом диагностики инфекции SARS-CoV-2 является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [13]. ОТ-ПЦР - метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК), в основе которого лежит использование праймеров, направленных на гены нуклеокапсида (N), оболочки (E) и открытой рамки считывания *lab* - *ORF1ab* [13, 14]. Терапия новой коронавирусной инфекции включает как стандартные методы лечения с применением детоксикационной и антиоксидантной терапии [15], так и применение новых препаратов, воздействующих на процесс прикрепления к клеточной мембране проникновения и эндоцитоза вируса [16, 17].

Цель исследования: разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2.

Материал и методы. Для разработки метода были получены положительные образцы из медицинского центра E1 Clinic ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск. Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования осуществлялось в соответствии с МР 3.1.0169-20 Лабораторная диагностика COVID-19.

Внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген РНКазы Р человека. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала (эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей).

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмидную ДНК (*pUC19*) вируса SARS-CoV-2 (ЗАО «ЭКОлаб» кат.№120-03) в 0,1 М трис буфере (CAS номер: 77-86-1) с азидом натрия (CAS номер: 26628-22-8) - 0,1%.

При подготовке были использованы следующие реактивы и материалы: пластиковые флаконы объемом 2,0 мл фирмы «Sarstedt» (Германия), кат. № 72.609; хлорид натрия, CAS номер: 7647-14-5; гуанидин тиоционат, CAS номер: 593-84-0; CAS номер: 26628-22-8; азид натрия, CAS номер: 26628-22-8; ацетон, CAS номер: 67-64-10; ЭДТА, CAS номер: 60-00-4; олигонуклеотид модифицированный, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-01; Taq ДНК-полимераза, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-02; плазмидная ДНК, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-03; планшет для ПЦР, фирма «Sovtech», Россия, кат. № PCR-P-96-08W; пленка для ПЦР-планшета, фирма «Sovtech» (Россия), кат. № P-500. Амплификацию, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США).

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008. Для проверки аналитической специфичности использована РНК штаммов различных вирусов с концентрацией матрицы не ниже 10^3 ГЭ/мл.

Результаты и обсуждение. Разработан набор реагентов «КовидЭк» для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

Метод исследования состоит из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

На первом этапе проведена очистка суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов для выделения РНК, основанная на связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера. Метод исследования основан на реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации к-ДНК с одновременной

детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. РНК SARS-CoV-2 подвергается обратной транскрипции с помощью ревертазы. Участки полученной кДНК амплифицировали при помощи специфических к данным участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В состав реакционной смеси включены флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (ДНК-зонды). Данные ДНК-зонды, содержащие флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой к ДНК-мишени. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, воздействие гасителя на флуоресцентную метку прекращается. В результате происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов.

Нарастающий уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». В состав набора реагентов входит положительный контрольный образец (ПКО), представляющий собой MS2 фагоподобные частицы, содержащие фрагмент генома коронавируса SARS-CoV-2.

В качестве мишеней выбраны следующие инсерционные последовательности SARS-CoV-2: фрагменты ORF и N (табл. 1).

Молекулярная структура праймеров проверена с учётом общих требований при использовании алгоритма BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов, опубликованных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Реакционную смесь (мастер-микс) готовили путем смешивания в эппендорфе следующих реактивов по формуле:

$$5*(N+1) \text{ мкл ОТ-ПЦР-реагента} + 15*(N+1) \text{ мкл праймеров,}$$

где: N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Далее перемешивали полученный «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осажи-

дали кратковременным центрифугированием и вносили по 20 мкл в микропробирки для проведения ПЦР.

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов определялась с использованием контрольной панели «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», положительные образцы которой (№ 1-№ 6) содержат искусственную РНК вируса SARS-CoV-2 в разных концентрациях аналита (от 500 ГЭ/мл и выше). Положительные образцы по каналу «HEX» должны иметь значения Ct меньше или равно 33, по каналу «FAM» – значения Ct не анализируются (могут быть любые или отсутствовать). Чувствительность определялась по стандартной панели образцов «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», содержащих искусственно синтезированную РНК SARS-CoV-2, как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определялась по стандартной панели образцов «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», не содержащих искусственно синтезированную РНК SARS-CoV-2, как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Для контроля повторяемости использовали образец КОЧ ПКО разведенный до концентрации $1,0 \times 10^3$ копий/мл (5 образцов). Процедура проводилась одним оператором на одном наборе. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле: $CV_p (\%) = \frac{Ct(\text{станд.отклон.})}{Ct(\text{ср.знач.})} \times 100 \%$ для 5 проб КОЧ ПКО и не превышает 3 %.

Для контроля воспроизводимости использовали образец КОЧ ПКО, разведенный до концентрации $1,0 \times 10^3$ копий/мл (10 образцов). Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни. Коэффициент вариации для воспроизводимости рассчитывается по формуле: $CV_p (\%) = \frac{Ct(\text{станд.отклон.})}{Ct(\text{ср.знач.})} \times 100 \%$ для 10 проб КОЧ ПКО и не превышает 6 %.

Интерпретация результатов ПЦР приведена в табл. 2.

Разработанным набором реагентов проведены исследования клинических образцов от 20 пациентов с симптомами ОРВИ и подтвержденным диагнозом COVID-19.

Результаты детекции вирусной РНК и РНКазы Р представлены на рисунке и в табл. 3.

Таблица 1

Используемые праймеры – фрагменты ORFa1b и N

Мишень	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ориентация праймера
SARS-CoV-2	ORFa1b	5' TTCTGCGCCTCCCAAGCTGA 3'	Прямой
		5' CCTAATTGAGGTTGAACCT 3'	Обратный
		5' GTTGTCAGGCAGTGC GGCCAATC 3'	Флуоресцентный зонд
	N	5' CAATGCCCCAATCGTCTAC 3'	Прямой
		5' CCTCATCACCGAAAGTCGCAAC 3'	Обратный
		5' CCAAAACGGGCAACGCAGAGGGGAGC 3'	Флуоресцентный зонд
Homo sapiens	PHKазы P	5' GGATCCATCTCACTGCAATG 3'	Прямой
		5' CCTGCTATCAAAGACTCCACA 3'	Обратный
		5' CCTCTATTAATGTGGCGATTGACCGA 3'	Флуоресцентный зонд

Таблица 2

Интерпретация результатов образцов

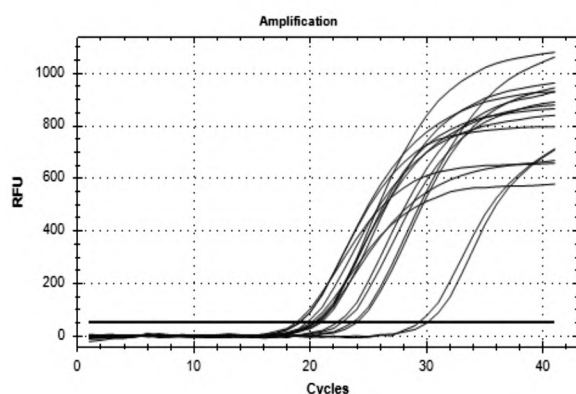
Результат образца	Значение «Сt» по каналу FAM/Green	Значение «Сt» по каналу HEX/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	+/-	33–35
Отрицательный	+	> 35 или отсутствует
Не валидный	–	–

Таблица 3

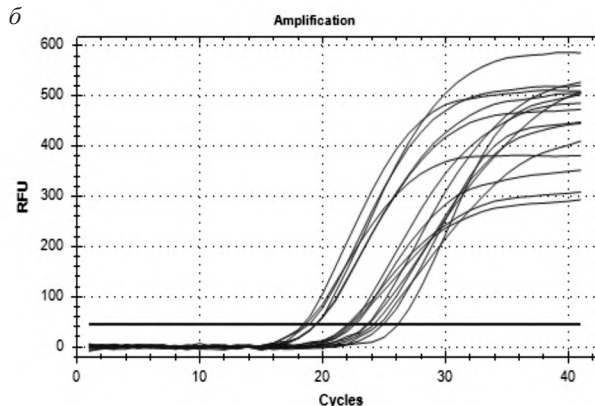
Данные выявления коронавируса с внутренним контролем из клинических образцов

Номер образца	Значение Ct		Интерпретация результата
	в канале FAM	в канале HEX	
ПМ1	34,11	21,59	Положительный
ПМ2	33,25	17,11	Положительный
ПМ3	25,90	26,81	Положительный
ПМ4	30,36	22,70	Положительный
ПМ5	26,92	18,41	Положительный
ПМ6	35,12	22,74	Положительный
ПМ7	28,10	25,15	Положительный
ПМ8	26,36	20,60	Положительный
ПМ9	34,75	25,52	Положительный
ПМ10	29,23	27,36	Положительный
ПМ11	28,41	27,74	Положительный
ПМ12	26,25	20,56	Положительный
ПМ13	32,80	24,73	Положительный
ПМ14	34,63	26,80	Положительный
ПМ15	30,15	22,75	Положительный
ПМ16	27,71	18,41	Положительный
ПМ17	35,16	19,61	Положительный
ПМ18	28,20	25,75	Положительный
ПМ19	26,24	20,70	Положительный
ПМ20	34,81	25,26	Положительный

a



б



Детекция нуклеиновых кислот.

a – выявление РНК коронавируса, *б* – выявление РНК РНКазы *P.*

Как видно из рисунка и табл. 3, разработанный нами набор реагентов выявляет коронавирус SARS-CoV-2 из клинических образцов, и может занять свое место в клинической лабораторной диагностике нового коронавируса.

Заключение. Разработанная методика диагностики новой коронавирусной инфекции на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволяет качественно и быстро выявлять РНК бета-коронавируса в клиническом материале больных и здоровых лиц с подозрением на вирусную инфекцию и другими симптомами ОРВИ.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-14, см. REFERENCES)

- Лахтин В.М., Лахтин М.В., Комбарова С.Ю., Давыдкин В.Ю., Мелихова А.В., Давыдкин И.Ю., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Ковид как мультицелевая инфекция: превентивные стратегии управления. Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г. Зайцева Н.Н., ред. Нижний Новгород: Медиаль; 2021; 1: 55-7.
- Хавкина Д.А., Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Пушакова Е.К. и др. Роль дезинтоксикационной и антиоксидантной терапии в лечении COVID-19: теория и практика. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2020; 10 (2): 62-9.
- Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осешнюк Р.А., Солюянова Т.Н., Шестакова И.В. и др. Возможности этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у амбулаторных пациентов. *Медицинский оппонент.* 2020; 1 (9): 48-58.
- Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осешнюк Р.А. и др. Эффективность и безопасность применения фавипиравира в комплексной терапии COVID-19 легкого и среднетяжелого течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2020; 4 (35): 26-38.

REFERENCES

- Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 418–23. DOI: 10.1002/jmv.25681.
- Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Kombarova S.Yu., Davydkin V.Yu., Melikhova A.V., Davydkin I.Yu., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. COVID as a multi-target infection: preventive management strategies. *Epidemiological Surveillance of Actual Infections: New Threats and Challenges: Collection of Scientific Papers of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation Dedicated to the 100th Anniversary of Academician*

- I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, April 26–27, 2021. Zaitseva N.N., ed. Nizhny Novgorod: Medial; 2021; 55-7. (in Russian)
- Lau S.K., Poon R.W., Wong B.H., Wang M., Huang Y., Xu H. et al. Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Roussetus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. *J. Virol.* 2010 Nov; 84 (21): 11385-94.
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Debbink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015 Dec; 21 (12): 1508-13.
- Woo P.C., Huang Y., Lau S.K., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2: 1804–1820. DOI: 10.3390/v2081803.
- Romano M., Ruggiero A., Squeglia F., Maga G., Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* 2020; 9: 1267.
- Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 401–2. DOI: 10.1002/jmv.25678.
- <https://covid19.who.int/>
- <https://www.rospotrebnadzor.ru/>
- Xu X.W., Wu X.X., Jiang X.G., Xu K.J., Ying L.J., Ma C.L. et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ.* 2020; 368: m606. DOI: 10.1136/bmj.m606.
- He F., Deng Y., Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J. Med. Virol.* 2020; 92: 719–25. DOI: 10.1002/jmv.25766.
- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72,314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020; 323: 1239–42. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
- Fozouni P., Son S., Diaz de León Derby M., Knott G.J., Gray C.N., D'Ambrosio M.V. et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell.* 2021 Jan 21; 184 (2): 323-39. DOI: 10.1016/j.cell.2020.12.001.
- Tevfik Dorak M., ed. Real-time PCR School of Clinical Medical Sciences (Child Health). Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne (UK); by Taylor & Francis; 2006.
- Khavkina D.A., Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Garbulov A.A., Shushakova E.K. The role of detoxification and antioxidant therapy in the treatment of COVID-19: theory and practice. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2020; 10 (2): 62-9. (in Russian)
- Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A., Garbulov A.A., Ploskireva A.A., Oseshnyuk R.A. et al. Possibilities of etiotropic therapy of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 in outpatients. *Meditsinskiy opponent.* 2020; 1 (9): 48-58. (in Russian)
- Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A., Garbulov A.A., Ploskireva A.A., Oseshnyuk R.A. et al. Efficacy and safety of favipiravir in the complex therapy of mild and moderate COVID-19. *Infeksionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2020; 4 (35): 26-38. (in Russian)