

МИКРОБИОЛОГИЯ

© АНДРЮКОВ Б.Г., ЛЯПУН И.Н., 2020

Андрюков Б. Г.^{1,2}, Ляпун И. Н.¹

ЛАБОРАТОРНЫЕ СТРАТЕГИИ ДИАГНОСТИКИ COVID-19: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Минобрнауки России, 690087, г. Владивосток, Россия;

²Дальневосточный федеральный университет Минобрнауки России, 690950, г. Владивосток, Россия

Пандемия COVID-19, спровоцированная новым коронавирусом SARS-CoV-2, вызвала всплеск заболеваемости по всему миру. Стремительное распространение инфекции вызвало тяжелейший кризис глобального здравоохранения и мировой экономики. Для предотвращения дальнейшего распространения пандемии важна быстрая и точная диагностика инфекции. Стандартным методом выявления коронавируса является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР требует дорогостоящего оборудования, специальной подготовки персонала, что ограничивает проведение массового тестирования и удлиняет время получения результата исследования. Серологические тесты на антитела против SARS-CoV-2 и определения защитного иммунитета у различных групп населения используют для ретроспективного выявления пациентов, перенесших бессимптомную и лёгкую форму инфекции, мониторинга протекания инфекции у госпитализированных больных, с целью отслеживания контактов и эпидемиологического надзора. Использование стандартных методов диагностики COVID-19 в условиях массовой заболеваемости, особенно при дефиците ресурсов и отсутствии соответствующей инфраструктуры связано с целым рядом ограничений. Поиск и разработка новых быстрых недорогих, простых, бесприборных, но не менее чувствительных и специфичных тестов является актуальной задачей. В обзоре рассматриваются новые лабораторные технологии диагностики новой инфекции – петлевая изотермическая амплификация (LAMP) и иммунохроматографический анализ (ИХА), которые могут стать реальной альтернативой используемым молекулярным и иммуноферментным технологиям. Динамическое развитие этих методов в последние годы расширяет перспективы их использования как для диагностики COVID-19, так и мониторинга пандемии.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР); иммуноферментный анализ; петлевая изотермическая амплификация (LAMP); иммунохроматографический анализ.

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Лабораторные стратегии диагностики COVID-19: современные технологии и тенденции развития (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 757-766. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-757-766>

Andryukov B. G.^{1,2}, Lyapun I. N.¹

COVID-19 DIAGNOSTIC LABORATORY STRATEGIES: MODERN TECHNOLOGIES AND DEVELOPMENT TRENDS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Education and Science, 690087, Vladivostok, Russia;

²Far Eastern Federal University of the Ministry of Education and Science of Russia, 690950, Vladivostok, Russia

The COVID-19 pandemic, associated with the new coronavirus SARS-CoV-2, has caused a surge in incidence worldwide, as well as a severe crisis in global health and economy. Therefore, fast and accurate diagnosis of infection is key to timely treatment and elimination of the spread of the virus. Currently, the standard method for detecting coronavirus is reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). However, this method requires expensive equipment and trained personnel, which limits the conduct of mass testing and lengthens the time to obtain a research result. Serological tests for antibodies against SARS-CoV-2 and the determination of protective immunity in various populations are used to retrospectively identify patients with asymptomatic and mild forms of infection, monitor the course of infection in hospitalized patients, and also track contacts and epidemiological surveillance. The use of standard methods for diagnosing COVID-19 in conditions of mass morbidity, especially in conditions of insufficient resources and lack of appropriate infrastructure, is associated with a number of limitations. Therefore, the search and development of new, fast, inexpensive, simple, device-free and no less sensitive and specific tests is an urgent task. Therefore, the search and development of new, fast, inexpensive, simple, device-free and no less sensitive and specific tests is an urgent task. The review examines new laboratory technologies for diagnosing a new infection – loop isothermal amplification (LAMP) and immunochromatographic analysis (ICA), which can become a real alternative to the used molecular and enzyme immunoassay methods. The dynamic development of these methods in recent years expands the prospects for their use both for diagnosing COVID-19 and monitoring a pandemic.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); enzyme-linked immunosorbent assay; loop isothermal amplification (LAMP); immunochromatographic analysis.

Для корреспонденции: Андрюков Борис Георгиевич, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова, проф. Департамента биомедицины ДВФУ; e-mail: andryukov_bg@mail.ru

For citation: Andryukov B. G., Lyapun I. N. COVID-19 diagnostic laboratory strategies: modern technologies and development trends (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65(12): 757-766 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-757-766>

For correspondence: *Andryukov Boris Georgievich*, MD, Lead Researcher of the laboratory of molecular microbiology «Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Professor of the Department of Biomedicines «Far Eastern Federal University»; e-mail: andrukov_bg@mail.ru

Information about authors:

Andryukov B. G., <http://orcid.org/0000-0003-4456-808X>;

Lyapun I. N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 28.09.2020
Accepted 05.10.2020

Введение. В конце 2019 г. в Китае появилась новая коронавирусная инфекция COVID-19, последующее распространение которой по миру приняло характер пандемии и вызвало тяжелейший кризис глобального здравоохранения и экономики [1]. По данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний COVID-19, к началу октября 2020 г. в мире насчитывалось более 32 млн заболевших и около 1 млн случаев с летальным исходом. В РФ эти показатели соответственно превысили 1,2 млн и 200 тыс. человек [2-4].

Схожесть клинических проявлений текущей инфекции с симптоматикой других ОРВИ, вероятность бессимптомного течения заболевания, сравнительно высокая контагиозность осложняют эпидемиологический мониторинг распространения вируса. В связи с этим создание платформ для эффективной диагностики COVID-19 стало особенно актуальным для своевременного выявления и лечения заболевших пациентов, для мониторинга эпидемической ситуации, ориентированного на опыт ликвидации недавних вирусных эпидемий [1, 3, 4].

Появление в XXI веке трёх новых патогенных для человека видов коронавируса вызывает серьёзные опасения. Эти РНК-содержащие β -коронавирусы семейства *Coronaviridae*, среди которых особое внимание привлекли возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (MERS) – MERS-CoV и источник тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS) – SARS-CoV [5-7].

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ показали, что коронавирус, вызывающий COVID-19, является β -коронавирусом того же подрода, что и вирус SARS-CoV. Новый вирус предложено обозначить как SARS-CoV-2 [5, 8].

Как и у других β -коронавирусов, геном SARS-CoV-2 содержит специфические последовательности РНК, кодирующие структурные и неструктурные белки, которые обеспечивают транскрипцию и репликацию вируса (полипротеин ORF1ab) и реализацию патогенных механизмов вируса. Некоторые из них экспонированы на поверхности вириона (спайковый гликопротеин S, белок оболочки E, мембранный протеин M, нуклеокапсид N) и вызывают значительный биотехнологический, фармакологический и биомедицинский интерес [6, 7, 9, 10].

Результаты молекулярно-филогенетического анализа показали, что геномные нуклеотидные последовательности SARS-CoV-2 и SARS-CoV связаны с идентичностью около 80%. Гликопротеины S этих видов вирусов в процессе инфицирования используют ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) в качестве рецептора, для проникновения в клетки человека [11].

Основными патогенетическими мишенями для всех представителей этой подгруппы β -коронавирусов являются респираторный и желудочно-кишечный тракт, печень, центральная нервная система, поражение которых становится характерным признаком коронавирусных инфекций [2, 8, 12]. До возникновения современных эпидемических вспышек β -коронавирусных инфекций (SARS в 2002-2004 г. г. и MERS в 2012 г.) [8, 10, 12], эти возбудители не относили к группе высоковирулентных патогенов человека [13, 14]. Эпидемии SARS и MERS, и особенно пандемия COVID-19, изменили существующий до этого взгляд на патогенность коронавирусов и эпидемиологию новых инфекций, на потенциальную перспективу возникновения новых вспышек и их диагностику [5-7, 15].

Одним из важнейших направлений стратегии борьбы с новой инфекцией стала необходимость массового лабораторного скрининга групп населения с высоким риском заражения. Своевременная и качественная лабораторная диагностика пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, стала основным приоритетом в ликвидации пандемии и введении карантинных мер [1, 4, 5, 16]. В этих условиях создание быстрых, эффективных и недорогих инструментов для диагностики стало важной составляющей борьбы с новой инфекцией. Как и при ликвидации коронавирусных инфекций SARS и MERS, так и при диагностике COVID-19, перед общественным здравоохранением стоит одна и та же задача. Она связана с определением роли и места различных диагностических платформ для осуществления скрининга, диагностики и мониторинга новых коронавирусных инфекций как традиционных, так и новых диагностических платформ с учётом их преимуществ и ограничений [7, 9, 17, 18].

Результаты секвенирования генома SARS-CoV-2 стали основой для создания тест-систем для диагностики и эпидемического мониторинга инфекции, предпосылкой для создания лекарственных препаратов и вакцин [19]. На фоне отсутствия опыта ликвидации пандемии новой вирусной инфекции и научной доказательности рекомендаций по использованию лабораторных тестов и управлению диагностикой, общественное здравоохранение нуждается в решении новых вопросов и проблем, связанных со своевременностью, частотой и выбором инструментов тестирования. Ответы на эти вопросы лежат в плоскости решения дилеммы о доступности определённых типов лабораторных тестов, своевременности их проведения и информативности, в клинко-эпидемиологической и экономической обоснованности использования в быстро меняющейся и беспрецедентной для новейшей истории картине пандемии [15, 20-22].

Существуют значительные различия в выборе наиболее подходящих инструментов и эффективных методов тестирования заболевших COVID-19, их контактов, потенциальных носителей, медицинских работников и представителей других служб экстренной помощи [1, 2, 21, 22]. После десяти месяцев борьбы с COVID-19 усилия общественного здравоохранения по-прежнему оцениваются количеством проведённых тестов, а последствия пандемии – числом умерших и заболевших. При этом среди последних не учитывают миллионы лёгких и бессимптомных случаев, хотя вполне вероятно, что именно эта категория пациентов является источником инфицирования окружающих. Отрицательные тесты ПЦР и появление специфических антител считают критерием выздоровления переболевших пациентов без учёта последствий на здоровье и качества их жизни. При этом уровни антител у переболевших в дальнейшем не исследуют, как не изучается напряжённость иммунитета и возможность повторного заражения COVID-19 [17, 21]. Возможно, это связано с недостаточным пониманием иммунных сигнальных путей и общей иммунопатологии при этой инфекции [2, 3, 22].

Ситуация с диагностикой COVID-19 ещё больше осложняется из-за отсутствия понимания в обществе, прессе, среди медицинских чиновников и некоторых специалистов биомедицины различий между существующими типами доступных тестов для диагностики этой инфекции. Неудивительно, что нет единой методологии целей и задач использования их, интерпретации полученных результатов для дальнейших решений [2, 3, 23].

Один из основных вопросов выработки стратегии тестирования в период пандемии связан с существующими типами диагностических инструментов и их принципиальным различием для диагностики вирусных инфекций, клинической целесообразности и бесполезности для различных категорий пациентов на разных этапах заболевания. Другие широко обсуждаемые темы касаются времени тестирования, их периодичности и правильной интерпретации полученных результатов [2, 3, 5, 7].

Данные рутинных лабораторных исследований имеют неспецифический характер (лейкопения, лимфопения, лёгкая тромбоцитопения, повышение содержания острофазовых белков, в тяжелых случаях повышение уровней цитокинов IL2, IL4, IL6, IL7, IL10, TNF) [12, 14, 17, 18].

Все существующие на данный момент типы специальных лабораторных тестов для диагностики COVID-19 можно разделить на две категории. Одни их них обнаруживают сам вирус (антигены или нуклеиновые кислоты), другие выявляют иммунную реакцию организма человека на его присутствие (антитела классов IgM, IgG). В условиях отсутствия специфических симптомов, доказанной эффективности методов этиотропного лечения и вакцинации, результаты лабораторной диагностики становятся единственным информационным источником наличия и мониторинга течения COVID-19 [3, 23, 24].

В идеальном гипотетическом варианте при помощи теста, выявляющего вирус и имеющего 100% чувствительность и специфичность, можно обследовать всё население. В зависимости от полученных результатов выделить всех инфицированных людей и разделить их на категории в зависимости от наличия и выраженности клинической картины: с бессимптомным, лёгким, средним, тяжёлым течением. После чего всех пациентов с

положительными результатами тестирования в зависимости от клинической картины изолировать на карантин, лечение на дому, госпитализировать в медицинское учреждение.

В качестве альтернативы, в другом гипотетическом варианте, обследовать всё население на наличие антител с помощью другого теста, имеющего 100% чувствительность и специфичность для идентификации пациентов, которые ранее были инфицированы вирусом, но перенесли инфекцию бессимптомно или оказались невосприимчивы к инфекции. Эти категории населения можно было бы привлекать для оказания помощи заболевшим, периодически контролируя у них уровень специфических антител.

Реальная картина распределения заражённых COVID-19 напоминает айсберг: в меньшей, надводной части которого размещаются категории тяжело заболевших и госпитализированных пациентов, на вершине – погибшие от инфекции. Большую долю подводной части айсберга занимают пациенты, перенесшие инфекцию в бессимптомной (около 45%), лёгкой или умеренной форме, без специфической клинической картины, с ОРЗ [4, 7, 25]. Пациенты с бессимптомным течением, как и с манифестной формой инфекции, несут одинаковую вирусную нагрузку в течение одного и того же периода времени [3, 4, 7, 17].

Рассмотренные варианты, при всей их гипотетичности, помогают определить место и оценить диагностическую ценность имеющихся тестов, целесообразность их использования, особенно в условиях отсутствия терапевтических средств или вакцин.

Из первой группы тестов сразу следует исключить вирусологический метод и детекцию антигенов коронавируса, которые проводят в специализированных вирусологических лабораториях для научных исследований.

Лабораторные тесты для прямой индикации вируса и идентификации РНК. Индикация вируса является важным диагностическим этапом мониторинга уровня заболеваемости и управления эпидемиологическим процессом. Эволюция молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики связана с развитием аналитических платформ идентификации нуклеиновых кислот, которые стали быстрыми и надёжными инструментами для прямой индикации вирусов [11, 15, 26-28].

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), нацелен на детекцию ДНК – одного из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение наследственной информации о генетическом коде всех живых организмов. ПЦР является широко используемым диагностическим методом для индикации большого спектра патогенных микроорганизмов и считается «золотым стандартом» с высокой чувствительностью и специфичностью [10, 29]. Более чем за 30 лет применения, эта концептуально простая технология стала одной из наиболее распространённых в медико-биологической практике для диагностики инфекционных и наследственных заболеваний, в молекулярной биологии для научных генно-инженерных исследований [11, 30, 31].

Геном коронавирусов состоит из РНК, которая схожа с ДНК по химическому составу, но имеет ряд принципиальных отличий. ДНК хранит наследственную информацию, РНК переносит её, ДНК является двуцепочечной молекулой, РНК – одноцепочечной, имеет меньшую молекулярную массу [32, 33].

Эти отличия являются причиной того, что стандартный каталитический фермент *Tag*-полимераза, используемый в классической ПЦР-технологии для амплификации определенных фрагментов ДНК в биоматериале, неэффективно реплицирует РНК. Для детекции РНК вирусов, включая SARS-CoV-2, применяется другой вариант тестирования, получивший название ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР или Reverse Transcription PCR, RT-PCR) из-за его преимуществ в качестве специфического и чувствительного анализа для ранней диагностики вирусных инфекции [26, 27, 29, 33].

В отличие от традиционной ПЦР, которая используется для усиления целевых последовательностей ДНК, ОТ-ПЦР представляет метод амплификации специфического фрагмента РНК в комплементарное ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. RT-PCR проходит в два этапа: сначала молекулу РНК превращают в комплементарную ДНК (кДНК) при помощи реакции обратной транскрипции (ОТ), катализируемой ферментом обратной транскриптазой (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза). На втором этапе амплифицируют молекулу ДНК, используя *Tag*-полимеразу и классическую схему ПЦР [11, 31]. С целью диагностики эти два этапа удобнее проводить в одной пробирке; для научных исследований – ОТ и ПЦР проводят в отдельных пробирках [31, 34].

ОТ-ПЦР, успешно зарекомендовавшая себя при тестировании вируса сезонного гриппа, одобрен ВОЗ в качестве диагностического стандарта, применяемого для диагностики COVID-19 и детекции SARS-CoV-2 [8, 35-37]. Тестирование проводится в скрининговом режиме среди бессимптомных пациентов с предполагаемыми контактами с SARS-CoV-2 для раннего выявления или определения тенденций развития инфекции [27, 28, 34, 36].

В дополнении к качественному определению РНК, при вирусных инфекциях часто используют объединенную с qPCR технологию, которая применяется для определения количества экспрессированного гена. Этот объединенный вариант, получивший название количественной RT-PCR в реальном времени (qRT-PCR, RT-qPCR), является самым мощным и чувствительным инструментом для количественного обнаружения уровня РНК [31, 34, 38].

ОТ-ПЦР является одной из многих разновидностей традиционной техники ПЦР, и её часто путают с количественной ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR, ПЦР в реальном времени). Ключевая разница между этими двумя вариантами заключается в том, что в отличие от ОТ-ПЦР, которая используется для обнаружения экспрессии генов посредством создания транскриптов кДНК из матричной РНК, Q-ПЦР применяется для количественного измерения продуктов ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных интеркалирующих красителей или меченных зондов [11, 15, 27, 37].

Технология ПЦР-диагностики отработана десятилетиями, есть подготовленные специалисты и необходимое оборудование, высокая чувствительность и специфичность ПЦР даёт основание доверять полученным результатам. Как нередко бывает в клинической лабораторной диагностике, не уделяется должное внимание преаналитическому этапу – взятию и транспортировке биоматериала, которые, как правило, проводит неподготовленный персонал [26, 27, 31, 38].

Сбор и пробоподготовка являются ключевыми этапами проведения тестов на вирусную РНК. Время отбора

проб, правильное их взятия и оптимальные типы образцов имеют определяющее значение для получения правильного результата. Чтобы предотвратить деградацию РНК, после взятия мазков их погружают в транспортную среду (буфер для лизиса или стерильный физраствор). Хранить образцы следует при температуре 2-8°С до 72 ч [11, 35, 36]. При необходимости более длительного хранения предпочтительная температура для сохранности взятого биоматериала -70°С и ниже [35, 37].

Распространёнными типами исследуемых образцов являются секреты, взятые из носо- и ротоглотки, при этом материал из носоглотки является предпочтительным [38, 20, 21, 29]. Образцы должны быть получены с помощью тупферов с тампонами из полиэстера и доставлены в лабораторию как можно скорее после сбора. У пациентов с пневмонией для исследования берут дополнительные материалы: мокрота и бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). После сбора мазки помещают в жидкость для высвобождения вирусной РНК из тампонов в раствор, откуда в последующем извлекают и амплифицируют нуклеиновую кислоту [11, 15, 20, 29].

Вероятность детекции коронавируса в каждом из перечисленных материалов варьируется в разных пределах и может меняться у отдельных пациентов, поэтому отрицательный результат тестирования не исключает возможности инфицирования человека. Получение ложноотрицательного результата может быть связано с неравномерным распределением вируса в дыхательной системе, с игнорированием стандартов взятия образцов [35, 36, 39]. При получении положительного результата существует небольшая вероятность вирусной контаминации в процессе тестирования или перекрестного инфицирования (ложноположительный результат).

При выполнении теста следует учитывать, что некоторые компоненты, находящиеся в пробе, могут снижать или полностью ингибировать активность используемых каталитических ферментов (транскриптазы, *Tag*-полимеразы), что, соответственно, будет частично или полностью блокировать амплификацию ДНК, снижать качество диагностики и являться одной из причин появления ложноотрицательных результатов ПЦР [39, 40]. *Tag*-полимераза полностью инактивируется при наличии в пробе даже следов крови (от 0,004%). Качество взятия материала и предварительная обработка образца является ключевым этапом при ПЦР-тестировании, влияющим на диагностическую надежность и эффективность метода [34, 35, 39, 40].

Причиной ложноотрицательного результата может стать изменение последовательностей вирусной РНК. Как и другие вирусы, SARS-CoV-2 мутирует по мере распространения пандемии [22, 25, 41]. Генетическое разнообразие и быстрая эволюция нового коронавируса наблюдались в различных исследованиях [41]. Эти мутации изучают с целью отслеживания глобального распространения вируса, изменения его вирулентных свойств [22, 42]. Большинство изменений не оказывают заметного влияния, но некоторые из них, образовавшиеся в областях праймеров и зондов SARS-CoV-2, могут снизить эффективность ПЦР-тестирования и стать причиной ложноотрицательных результатов [22, 34, 43].

Риск ложных результатов, является важной проблемой, связанной с методом ОТ-ПЦР-РВ, и в значительной степени влияет на эффективность борьбы с распространением инфекции [42]. Многие случаи COVID-19 с типичной клинической картиной и соответствующим

заклЮчением исследования компьютерной томографии (КТ) не диагностированы ПЦР-тестированием в 35-50% [28, 29].

Для исключения или минимизации вероятности ложноположительных результатов, при выполнении каждого цикла ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 рекомендуется использовать отрицательный матричный контрольный материал (NTC, No Template Control), не содержащий нуклеаз. Результат тестирования NTC должен быть отрицательным, а возникновение положительных результатов будет свидетельствовать о перекрёстном загрязнении образца [2, 35, 37].

Чувствительность и специфичность RT-PCR ниже 100%, полученный отрицательный результат при ПЦР-тестировании не исключает возможности заражения COVID-19 [28, 29]. Для достижения максимальной эффективности молекулярно-генетической диагностики имеет значение правильное выполнение стандартов операционных процедур (СОП) и лабораторной практики, связанных со взятием исследуемых материалов, условиями транспортировки образцов и их хранением, взятием альтернативных типов биоматериалов у одного пациента [28, 43].

Несмотря на то, что ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 является методом выбора при диагностике COVID-19, его результаты следует интерпретировать с осторожностью, с учётом данных КТ и клинических симптомов заболевания, что облегчает раннюю постановку диагноза и обеспечивает своевременное лечение пациентов. Эффективность метода значительно повышается при использовании для тестирования нескольких типов образцов из верхних и нижних дыхательных путей, при соблюдении СОП и надлежащей лабораторной практики.

Серологические методы детекции антител и определения защитного иммунитета у недавно инфицированных SARS-CoV-2. Вторая группа широко используемых методов – тесты, предназначенные для определения серологического статуса пациентов и детекции специфических антител классов IgA, IgM, IgG, определения защитного иммунитета у различных групп населения, инфицированных SARS-CoV-2. Результаты тестов на антитела особенно важны для выявления предыдущего инфицирования пациентов с маловыраженной симптоматикой или бессимптомной формой заболевания [2, 23, 44].

Серологические тесты в наиболее распространённых форматах твёрдофазного иммуоферментного анализа (ИФА) хорошо известны и зарекомендовали себя как сравнительно простые, безопасные, чувствительные и специфичные диагностические платформы для выявления антител, вырабатываемых в ответ на SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови [23, 44, 45]. В качестве антигена при конструировании системы использует один из иммуогенных белков SARS-CoV-2 (как правило, спайковый гликопротеин S или нуклеокапсид N). Полный цикл исследования занимает не менее 1,5-2 часов и требует специального лабораторного оборудования [20, 44, 46].

Основное требование к тест-системам – отсутствие перекрестной реактивности с антителами, вырабатываемыми к другим распространённым коронавирусам, вызывающим менее серьёзные ОРВИ. Перекрестную реактивность при постановке ИФА полностью исключать нельзя. Ложноположительные результаты встречаются при инфицировании другим видом β -коронавируса в случае использования тест-систем, в которых в качестве

антигена использовался нуклеокапсид N [44, 45, 47]. По оценкам разработчиков, большинство серологических тестов ИФА имеют специфичность более 99% и чувствительность 96% [2, 23, 45, 47]. Многие авторы, чтобы избежать ложноотрицательных результатов, указывают на необходимость исследований на антитела против нескольких антигенов [2, 23, 47, 48].

Динамика иммунного ответа против SARS-CoV-2 и, в частности, сероконверсия при COVID-19, находятся в стадии изучения, как и корреляция уровня специфических антител с вирусной нагрузкой, и роль в элиминации вируса [20, 23, 47]. Средняя продолжительность появления антител IgM и IgA составляет 5–7 дней, тогда как антитела IgG обнаружены через 14 дней после появления симптомов у лиц с инфекциями, подтверждёнными ОТ-ПЦР [45].

Требуют подтверждения и защитные свойства антител от повторного инфицирования пациентов, переболевших COVID-19, и продолжительность сохранения защитного иммунитета [20, 23, 47, 48].

Исследования динамики появления противовирусных антител у пациентов с другими коронавирусными инфекциями в период эпидемий SARS и MERS показали, что специфические иммуноглобулины выявлялись у 80-100% пациентов в среднем через 14–20 дней после постановки диагноза, что соответствовало 2-3 нед от начала появления клинических симптомов болезни [9, 12, 26, 49]. Сероконверсия является надёжным диагностическим признаком коронавирусной инфекции, как и обнаружение вирусной РНК [11, 49-51].

Результаты серодиагностики на антитела к SARS-CoV-2 могут быть использованы для ретроспективного выявления пациентов, перенесших бессимптомную и лёгкую формы инфекции, мониторинга протекания инфекции у госпитализированных больных, отслеживания контактов и эпидемиологического надзора на региональном уровне для определения истинных масштабов пандемии и уровня летальности [23, 45, 47]. Появление специфических антител, например, у медицинских работников, работающих в условиях, потенциально опасных вторичным инфицированием COVID-19, могло бы служить основанием для допуска к работе [2, 3, 7, 49]. Исследование сероконверсии у инфицированных SARS-CoV-2 может быть использовано для диагностики ПЦР-отрицательных больных, в том числе, поступивших на поздней стадии заболевания, и для ретроспективной оценки чувствительности молекулярно-генетического тестирования.

Поиск и разработка новых методов для экспресс-диагностики COVID-19. Для реализации эффективных мер по контролю за распространением инфекции в период ликвидации пандемии решающее значение имеет раннее и надёжное обнаружение вируса [6,13,52,53]. Массовое тестирование заболевших и бессимптомных носителей оказалось весьма эффективным в борьбе с пандемией. Оно связано с громадными финансовыми расходами на приобретение необходимого оборудования, тест-систем, создание специализированных лабораторий [23, 52-54]. В условиях ограниченных ресурсов и оборудования, отсутствие возможности проведения стандартной лабораторной диагностики COVID-19 становится фактором, ограничивающим возможность борьбы с распространением вируса. Поиск и разработка диагностических инструментов, соответствующих современной концепции ASSURED (доступных, чувстви-

тельных, специфичных, удобных для пользователя, быстрых, надежных и бесприборных) является актуальной задачей [13, 23, 52, 54].

Одной из современных высокотехнологичных тенденций индикации и идентификации инфекционных патогенов в клинической лабораторной диагностике является развитие технологий point-of-care (POC). Их преимущества, такие как простота, быстрое получение результата, экономичность и отсутствие необходимости в подготовленных специалистах и дорогостоящего лабораторного оборудования, снижают финансовые затраты и время на верификацию возбудителей и опосредуют активный рост их использования для диагностики [52-54].

Ряд молекулярных методов из арсенала технологий POC разработаны и доступны для экспресс-диагностики пациентов с COVID-19.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP).

В последнее время для скрининговой и мониторинговой диагностики вирусных инфекций всё более популярным становится быстрый, простой и экономичный метод петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (Loop mediated isothermal amplification, LAMP и RT-LAMP), аналогичный классической ПЦР [6, 54, 55].

Этот одностадийный метод амплификации детектирует РНК вируса в различных биосубстратах с точностью, сопоставимой с RT-qPCR, который, являясь золотым стандартом для обнаружения SARS-CoV-2, требует обученного персонала, сложной инфраструктуры и длительного времени анализа, что ограничивает его использование [54-56]. В условиях пандемии COVID-19 новая и экономичная лабораторная POC-технология RT-LAMP стала альтернативой ОТ-ПЦР как несложный инструмент скрининга в условиях ограниченных ресурсов [6, 54, 56-58].

Подобно ОТ-ПЦР, тесты LAMP очень чувствительны и надежны, при условии их проведения во время острой стадии инфекции, и позволяют получать результат в течение 20-30 мин. Ключевым этапом при разработке тест-систем RT-LAMP является выбор целевых мишеней вируса и использование соответствующих четырёх праймеров, нацеленных на различные консервативные области генома [54, 59, 60]. Праймеры связываются с комплементарными последовательностями кДНК-

мишени и образуют ДНК в форме гантелей. Затем на этапе циклической амплификации непрерывно производятся несколько копий таких гантелей ДНК. Продукты, образующиеся на этапе циклической амплификации, используются в фазе элонгации для циклического синтеза ДНК различных размеров.

Разработан одностадийный экспресс-тест для диагностики COVID-19 со временем анализа 30 мин [55]. При конструировании набора использовались праймеры N_1 и N_{15} , нацеленные на гены, кодирующие N нуклеокапсид, спайковый гликопротеин (S_{17} и O_{117}) и репликазу (*ORF1ab*) SARS-CoV-2 соответственно. Высокая чувствительность и 100% специфичность теста подтверждена на образцах сыворотки, мочи, слюны, мазков из рото- и носоглотки с использованием колориметрической и флуоресцентной детекции [55].

Технологические преимущества LAMP, такие как амплификация при постоянной температуре 60-65° С (что исключает необходимость использования термоблокера), более быстрое получение результата при сохранении аналогичной чувствительности и специфичности, делают его более подходящим для скрининга COVID-19, чем RT-PCR [55, 57, 59]. Важными достоинствами этого уникального метода являются высокая экономичность и простота выполнения с возможностью выявления амплификационного продукта и оценки результата визуально, по изменению цвета после добавления одного из интеркалирующих красителей [57, 58]. Современные модификации технологии RT-LAMP позволяют получать количественный результат в режиме реального времени [58, 61, 62] (табл. 1).

Немаловажными преимуществами этого одностадийного метода является выполнение тестирования в широких диапазонах температур и pH, что облегчает и ускоряет этап пробоподготовки [56, 57, 59, 60].

Примером успешного клинического опыта создания эффективного инструмента для диагностики COVID-19 является тест N_1 -STOP-LAMP, разработанный австралийскими учёными, основанный на методе RT-LAMP с набором праймеров для детекции участка CDC N_1 гена нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2. При проведении испытаний на клинических образцах, предварительно проведенных методом RT-qPCR с E-геном, новая тест-система

Таблица 1

Сравнение методов петлевой изотермической амплификации (LAMP) и классической полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Критерии	LAMP	ПЦР
Температурные циклы	Изотермальная амплификация (60-65° С)	Необходимость различных температурных циклов
Количество праймеров	4(6) специально разработанных праймеров	2 праймера
Время анализа	До 30 мин	2-4 часа
Выход ДНК	Выход ДНК - 10-20 мкг	Выход ДНК - до 0,2 мкг
Визуальная детекция	Возможна	Невозможна
Экономичность и простота выполнения	Экономичный, прост в выполнении	Требует дорогостоящего оборудования и подготовленных специалистов
Чувствительность к ингибиторам пробы	Нечувствительна	Чувствительна
Возможность мультиплексирования	Возможно	Невозможно
Известность метода, оценка в клинических условиях	Мало известен, клиническая оценка продолжается	Хорошо известен, клиническая эффективность доказана

показала 87% чувствительности и 100% специфичности при среднем времени выявления положительного результата 14 мин [61].

Ограничением применения LAMP-тестирования является отсутствие у исследователей достаточного опыта использования метода в условиях эпидемических вспышек и чрезвычайных ситуаций, в клинической интерпретации результатов [54, 59, 61, 62]. Быстрое развитие технологий способствует появлению на рынке новых тест-систем, в том числе, разрешённых для детекции SARS-CoV-2 (табл. 2).

О перспективности LAMP-технологий, как инструмента для диагностики COVID-19, свидетельствуют последние разработки, сочетающие возможности метода с системой молекулярного иммунитета CRISPR-Cas12(13), коллатеральная активность которой против РНК-мишеней вирусов обеспечивает основу для высокоспецифичной и чувствительной детекции SARS-CoV-2 [62].

Иммунохроматографический анализ (ИХА). Другой перспективной технологией экспресс-диагностики коронавирусных инфекций и, в частности, COVID-19, является иммуноанализ латерального потока (lateral flow immunoassay, LFIA), который в России больше известен как иммунохроматографический анализ (ИХА) [6, 13, 52]. Эта диагностическая платформа, основанная на иммуносерологическом тестировании, широко известна в мире уже более 60 лет, все эти десятилетия непрерывно совершенствовалась, в том числе, как простой и экономичный тест РОС для диагностики инфекций [52, 53, 65, 66].

В отличие от молекулярно-генетических диагностических технологий, серологические ИХА тесты могут обнаруживать не только инфекционное заражение пациентов (детектировать антигены в биосубстратах), но и оценивать реакцию иммунной системы (детектировать в крови антитела), и тем самым обеспечивать необходимой информацией для принятия организационных решений [6, 65, 66]. В отличие от ИФА, весь цикл исследования с использованием тест-систем ИХА занимает от 10 до 20 мин [6, 53, 67, 68].

В контексте диагностики инфекций SARS, MERS, COVID-19 экспресс-тесты LFIA чаще всего используются для проверки наличия антител пациента (IgM, IgG) или вирусных антигенов [13, 53, 66, 67]. С помощью ИХА тестов можно выявить не только инфицированных пациентов, но и проводить ретроспективную диагностику тех кто перенёс заболевание бессимптомно, выздоровел и в настоящее время обладает определённой степенью иммунной защиты [6, 66, 69, 70].

ИХА тест-системы для определения антител против SARS-CoV-2 обнаруживают два типа антител по отдельности или оба одновременно, выпускаются в виде наборов для тестирования специалистами клиничко-диагностических лабораторий. Для анализа требуется капля капиллярной или венозной крови пациента, сыворотки или плазмы. Образец наносится на прокладку, далее последовательно вносятся специфические реагенты (конъюгированные антитела) и реагенты для продвижения и взаимодействия антигенов и антител против SARS-CoV-2, присутствующих в образце. Считывание результатов происходит визуально по появляющимся цветовым полосам в контрольной и тестовой зонах.

Проведено ретроспективное исследование динамики образования антител к SARS-CoV-2 с оценкой чувствительности и специфичности четырёх тест-систем ИХА у пациентов, чтобы диагностировать значимость экспресс-серологических тестов в ведении пациентов с COVID-19, диагноз у которых установлен молекулярным тестированием (ОТ-ПЦР) [68]. Через 3 нед. после появления симптомов заболевания все тесты показали наличие антител (IgM, IgG) в сыворотке крови обследуемых. У пациентов с COVID-19, осложнённым пневмонией, выявлено более раннее появление антител против SARS-CoV-2 [68].

Разработан и тестируется ИХА-тест для обнаружения антител IgG к SARV-CoV-2 в сыворотке крови человека [13]. Конструктивные особенности этой тест-системы связаны с использованием наночастиц полистирола, модифицированных лантаноидами, и рекомбинантного нуклеокапсидного протеина SARS-CoV-2, помещённого на нитроцеллюлозную мембрану для захвата специфических антител. Процесс анализа занимает 10 мин [13].

В соответствии с технологией ИХА, инфекционные маркёры могут быть обнаружены в крови (антитела), слюне, секрете верхних дыхательных путей на протяжении всего инфекционного цикла (заражение, инкубационный период, разгар, реконвалесценция) [66, 68, 69]. В отличие от молекулярных методов, использование ИХА экспресс-тестов не требует специальной подготовки специалистов и может использоваться для скрининговых исследований в полевых условиях, на вокзалах, аэропортах, в частных медицинских кабинетах, необорудованных диагностических пунктах, сельских больницах [65, 66, 68].

Использование индивидуальных ИХА тест-систем оказалось более дорогостоящим по сравнению с ИФА в практических приложениях для диагностики инфекций SARS, MERS, COVID-19, их применение оказалось экономически оправданным клиническими преимуществами этой диагностической платформы [65 – 67, 70].

Таблица 2

Тест-системы LAMP (RT-LAMP), разрешённые для детекции SARS-CoV-2

Страна-производитель, фирма-разработчик	Название	Описание	Ссылка
Seasun Biomaterials Inc., Южная Корея	AQ-TOP™ COVID-19 Rapid Detection Kit.	Качественное (RT-LAMP) выявление РНК в пробах слизи рото- и носоглотки, БАЛ и мокроте в острой фазе инфекции. Ответ <30 мин	[63]
Color Genomics, Inc., США	Color Genomics SARS-COV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay	Качественное (RT-LAMP) выявление РНК в пробах слизи рото- и носоглотки, БАЛ и мокроте в острой фазе инфекции. Ответ <30 мин	[64]
Мельбурнский университет, Австралия	N1-STOP-LAMP	Качественное (RT-LAMP) выявление участка CDC N1 гена нуклеокапсидного (N) SARS-CoV-2 в пробах слизи рото- и носоглотки, инфекции. Ответ <20 мин	[61]

ИХА тест-системы, одобренные для диагностики COVID-19 [52]

Страны-производители, компании-разработчики	Чувствительность / специфичность тест-систем, %	Описание тест-системы	Используемые биосубстраты, время анализа	Ссылки
US / China, Cellex Inc.	93,8/95,6	Детекция IgM/IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, цитрат Na), 20 мин	[71]
US, ChemBio	92,7 (IgM) и 95,9 (IgG)/99,0 (IgM и IgG)	Детекция IgM/IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 15 мин	[72]
US, Autobio Diagnostics Co. Ltd. (+ Hardy Diagnostics)	95,7 (IgM) и 99,0 (IgG)/99,0 (IgM и IgG)	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 15 мин	[73]
US / China, Healgen Scientific LLC	96,7 (IgG), 86,7 (IgM), 96,7 / 98,0 (IgG), 99,0 (IgM), 97,0	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 10 мин	[74]
China, Hangzhou Biotest Biotech Co., Ltd	92.5 (IgM), 91.56 (IgG)/98.1 (IgM), 99.52 (IgG)	Детекция IgM/IgG к S1 локусу S белка SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 20 мин	[75]
US / China, Aytu Biosciences / Orient Gene Biotech	87.9 (IgM) & 97.2 (IgG)/100,0 (IgG и IgM)	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, цитрат Na), 10 мин	[76]

В ходе борьбы с пандемией COVID-19 разработано и предложено множество различных диагностических систем, основанных на принципах ИХА, которые различаются между собой чувствительностью и специфичностью [68, 70]. Некоторые из предложенных платформ прошли необходимую экспертизу и получили разрешение на использование в клинической практике (табл. 3).

Надежная эффективность и высокая чувствительность при детекции специфических антител к SARS-CoV-2 с использованием ИХА показывает, что эти технологии могут быть полезным диагностическим инструментом в дополнение к молекулярным методам для диагностики COVID-19.

Международный опыт использования серологических тестов на основе ИХА для устранения эпидемических вспышек коронавирусных инфекций показал важность и необходимость этого диагностического инструмента. Наиболее рациональным применением этого диагностического инструмента является массовый скрининг населения из групп риска, пациентов с бессимптомной формой заболевания. Все положительные результаты должны быть подтверждены количественными молекулярно-генетическими методами.

Заключение. Некоторые успехи в борьбе с пандемией COVID-19 достигнуты, в том числе, благодаря хорошо зарекомендовавшим себя основным инструментам лабораторной диагностики, в первую очередь, молекулярно-генетическим и иммуноферментным методам. На оптимизацию этих технологий потребовались десятилетия, но сейчас они имеют ключевое значение в выявлении и контроле распространения COVID-19. Опыт, полученный при ликвидации эпидемий SARS, MERS, послужили основой для разработки лабораторной стратегии для индикации вируса SARS-CoV-2 и антител к нему в период пандемии COVID-19. Их грамотное выполнение, своевременная и правильная интерпретация результатов позволяют вовремя принимать необходимые организационные решения. По-прежнему существует необходимость в поиске и разработке быстрых, надежных, экономичных, но не менее чувствительных и специфичных диагностических инструментов для выявления и борьбы с распространением инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- World Health Organization (WHO) official website. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200701-covid-19-sitrep-163.pdf?sfvrsn=c202f05b2> (accessed on September 2, 2020).
- Centers for Disease Control and Prevention (2019). Novel coronavirus, Wuhan, China. Information for Healthcare Professionals. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/index.html> (Accessed on September 11, 2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) COVID 19 (2020). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus-china> Online: last update August 11, 2020.
- Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(18):1708–20. Doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A. et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*. 2020. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1> (Accessed on August 30, 2020).
- Wu J.L., Tseng W.P., Lin C.H., Lee T.-F., Ming-Yi Chung, Huang C.-H. et al. Four point-of-care lateral flow immunoassays for diagnosis of COVID-19 and for assessing dynamics of antibody responses to SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020; 81(3): 435–42. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.023.
- Ghebreyesus T.A., Swaminathan S. Scientists are sprinting to outpace the novel coronavirus. *Lancet*. 2020; 395(10226): 762–64. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)30420-7.
- World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance (2020). Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance> (Accessed on September 11, 2020).
- Petrosillo N., Viceconte G., Ergonul O., Ippolito G., Petersen E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(6): 729–34. Doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026.
- Noh J.Y., Yoon S.W., Kim D.J., Lee M.S., Kim J.H., Na W. et al. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. *Arch. Virol.* 2017; 162(6): 1617–23. Doi: 10.1007/s00705-017-3281-9.

11. Pfefferle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill.* 2020; 25(9): 2000152. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152.
12. Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L. et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114(35): E7348–57. Doi: 10.1073/pnas.1707304114.
13. Chen Z., Zhang Z., Zhai X., Li Y., Lin L., Zhao H. et al. Rapid and Sensitive Detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, Using Lanthanide-Doped Nanoparticles-Based Lateral Flow Immunoassay. *Anal. Chem.* 2020; 92(10): 7226–31. Doi: 10.1021/acs.analchem.0c00784.
14. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I., Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M., et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am. J. Hematol.* 2020; 95(7): 834–47. Doi: 10.1002/ajh.25829.
15. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro. Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. Doi: 10.2807/1560-7917.
16. Chu D.K.W., Pan Y., Cheng S.M.S., Hui K.P.Y., Krishnan P., Liu Y. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin. Chem.* 2020; 66(4): 549–55. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
17. Oliveira B.A., Oliveira L.C., Sabino E.C., Okay T.S. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 2020; 62: e44. Doi: 10.1590/S1678-9946202062044.
18. Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. An Evolving Approach to the Laboratory Assessment of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020. Doi:10.1002/jmv.25954.
19. Catanzaro M., Fagiani F., Racchi M., Corsini E., Govoni S., Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2020; 5: 84. Doi: 10.1038/s41392-020-0191-1.
20. Pascarella G., Strumia A., Piliengo C., Bruno F., Del Buono R., Costa F. et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J. Intern. Med.* 2020; 288(2):192-206. doi: 10.1111/joim.13091.
21. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Liang L., Huang H., Hong Z. et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(12): 1177–9. Doi: 10.1056/NEJMc2001737.
22. Callaway E., Ledford H., Mallapaty S. Six months of coronavirus: the mysteries scientists are still racing to solve. *Nature.* 2020; 583(7815): 178–9. Doi: 10.1038/d41586-020-01989-z.
23. Patel R., Babady E., Theel E.S., Storch G.A., Pinsky B.A., George K. et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19. International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio.* 2020; 11(2): e00722-20. Doi: 10.1128/mBio.00722-20.
24. Tang Y.W., Schmitz J.E., Persing D.H., Stratton C.W. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(6): e00512-20. Doi: 10.1128/JCM.00512-20.
25. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell. Host. Microbe.* 2020; 27(3): 325–8. Doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
26. Shen Z., Xiao Y., Kang L., Ma W., Shi L., Zhang L. et al. Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 713–20. Doi: 10.1093/cid/ciaa203.
27. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 81: 104260. Doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260.
28. Wang Y., Kang H., Liu X., Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J. Med. Virol.* 2020; 92(6): 538–39. Doi: 10.1002/jmv.25721.
29. Wang Y., Wang Y., Chen Y., Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 568–76. Doi: 10.1002/jmv.25748.
30. Adams N.M., Leelawong M., Benton A., Quinn C., Haselton F.R., Schmitz J.E. COVID-19 diagnostics for resource – limited settings: Evaluation of “unextracted” qRT-PCR. *J. Med. Virol.* 2020. Doi: 10.1002/jmv.26328.
31. Alcoba-Florez J., Gil-Campesino H., de Artola D.G., González-Montelongo R., Valenzuela-Fernández A., Ciuffreda L. et al. Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 99: 190-2. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.058.
32. Malik Y.S., Sircar S., Bhat S., Sharun K., Dhama K., Dadar M. et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)-current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.* 2020; 40(1): 68–76. Doi: 10.1080/01652176.2020.1727993.
33. Kim J.Y., Ko J.H., Kim Y., Kim Y.J., Kim J.M., Chung Y.S. et al. Viral Load Kinetics of SARS-CoV-2 Infection in First Two Patients in Korea. *J. Korean. Med. Sci.* 2020; 35(7): e86. Doi: 10.3346/jkms.2020.35.e86.
34. Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453-4. Doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
35. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., Malekjahani A., Osborne M., Li V.Y.C. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020; 14(4): 3822–35. Doi: 10.1021/acsnano.0c02624.
36. Sri Santosh T., Parmar R., Anand H., Srikanth K., Saritha M. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus.* 2020; 12(4): e7708. Doi:10.7759/cureus.7708.
37. Wan D.Y., Luo X.Y., Dong W., Zhang Z.W. Current practice and potential strategy in diagnosing COVID-19. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(8): 4548–53. Doi: 10.26355/eurrev_202004_21039.
38. Bustin S.A., Nolan T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(8): 3004. Doi: 10.3390/ijms21083004.
39. Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J. et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv.* 2020. Doi: 10.1101/2020.02.11.20021493.
40. Jo S., Kim S., Shin D.H., Kim M.S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *J. Med. Chem. Enzyme. Inhib.* 2020; 35(1): 145–51. Doi: 10.1080/14756366.2019.1690480.
41. Yip C.C., Ho C.C., Chan J.F., Kai-Wang To K., Shuk-Ying Chan H., Cheuk-Ying Wong S. et al. Development of a Novel, Genome Subtraction-Derived, SARS-CoV-2-Specific COVID-19-nsp2 Real-Time RT-PCR Assay and Its Evaluation Using Clinical Specimens. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2574. Doi: 10.3390/ijms21072574.
42. Winichakoon P., Chaiwarith R., Liwsrisakun C., Salee P., Goonna A., Limsukon A. et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swab does not rule out COVID-19. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00297-20. Doi: 10.1128/JCM.00297-20.
43. Wan Z., Zhang Y., He Z., Liu J., Lan K., Hu Y. et al. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(11): 1880. Doi: 10.3390/ijms17111880.
44. Zhong L., Chuan J., Gong B., Shuai P., Zhou Y., Zhang Y. et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(5): 777-80. Doi: 10.1007/s11427-020-1688-9.
45. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F. et al. Profiling early humoral response to diagnose novel Coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020. 71(15): 778-85. Doi: 10.1093/cid/ciaa310.
46. Xiang F., Wang X., He X., Peng Z., Yang B., Zhang J. et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa461. Doi: 10.1093/cid/ciaa461.
47. Lv H., Wu N.C., Tsang O.T., Yuan M., Perera R.A.P.M., Leung W.S. et al. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Rep.* 2020; 31(9): 107725. Doi: 10.1016/j.celrep.2020.107725.
48. Brouwer P.J.M., Daniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon

- Y., Bangaru S. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369(6504): 643–50. Doi: 10.1126/science.abc5902.
49. Chia W.N., Tan C.W., Foo R., Kang A.E.Z., Peng Y., Sivalingam V. et al. Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 1497–1505. Doi: 10.1080/22221751.2020.1780951.
50. Wang S.F., Tseng S.P., Yen C.H., Yang J.-Y., Ching-Han Tsao, Chun-Wei Shen et al. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451(2): 208–14. Doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.090.
51. Döhla M., Boesecke C., Schulte B., Diegmann C., Sib E., Richter E. et al. Rapid point-of-care testing for SARS-CoV-2 in a community screening setting shows low sensitivity. *Public Health*. 2020; 182: 170–2. Doi: 10.1016/j.puhe.2020.04.009.
52. Johns Hopkins University Health Safety Center official website (2020). Available at: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html> (accessed on 14 June 2020).
53. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology* (Basel). 2020; 9(8): 182. Doi: 10.3390/biology9080182.
54. Huang W.E., Lim B., Hsu C.C., Xiong D., Wu W., Yu Y. et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb. Biotechnol.* 2020; 13(4): 950–61. Doi: 10.1111/1751-7915.13586.
55. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0234682. Doi: 10.1371/journal.pone.0234682.
56. Shen M., Zhou Y., Ye J., Al-Maskri A., Kang Y., Zeng S. et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. Doi: 10.1016/j.jpfa.2020.02.010.
57. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V. et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975-7. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa102.
58. Kashir J., Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med. Hypotheses*. 2020; 141: 109786. Doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
59. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports*. 2020; 2(1): 100017. Doi: 10.1016/j.sn.2020.100017.
60. Koch T., Dahlke C., Fathi A., Kupke A., Krähling V., Okba N.M.A. et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet. Infect. Dis.* 2020; 20(7): 827–38. Doi: 10.1016/S1473-3099(20)30248-6.
61. Lee J.Y.H., Best N., McAuley J., Porter J.L., Seemann T., Schultz M.B. et al. Validation of a single-step, single-tube reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2 RNA. *J. Med. Microbiol.* 2020. Doi: 10.1099/jmm.0.001238.
62. Ali Z., Aman R., Mahas A., Sivakrishna Rao G., Tehseen M., Mar-sic T. et al. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Res.* 2020; 288: 198129. Doi: 10.1016/j.virusres.2020.198129.
63. Seasun Biomaterials Inc. official website (2020). Available at: <http://www.seasunbio.com>. (accessed on 02/09/2020).
64. Color Genomics, Inc., official website (2020). Available at: <https://www.color.com>. (accessed on 06/09/2020).
65. Montesinos I., Gruson D., Kabamba B., Dahma H., Van den Wijngaert S., Reza S. et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J. Clin. Virol.* 2020; 128: 104413. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104413.
66. Andryukov B.G. Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiol.* 2020; 6(3): 280–304. Doi: 10.3934/microbiol.2020018.
67. Zhang Y., Kong H., Liu X., Cheng J., Zhang M., Wang Y. et al. Quantum dot-based lateral-flow immunoassay for rapid detection of rhein using specific egg yolk antibodies. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018; 46(8): 1685–93. Doi: 10.1080/21691401.2017.1389749.
68. Wu J.L., Tseng W.P., Lin C.H., Chien-Hao Lina, Tai-Fen Leeb, Ming-Yi Chung et al. Four point-of-care lateral flow immunoassays for diagnosis of COVID-19 and for assessing dynamics of antibody responses to SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020; 81(3): 435-2. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.023.
69. Wen T., Huang C., Shi F.J., Xiao-Yan Zeng, Tian Lu, Shou-Nian Ding et al. Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *Analyst*. 2020. Doi: 10.1039/d0an00629g.
70. Nicol T., Lefeuvre C., Serri O., Piverta A., Joubau F., Dubée V. et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J. Clin. Virol.* 2020; 129: 104511. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104511.
71. Cellex Ltd. official website. Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Rapid Test (2020). Available at: <https://cellexcovid.com> (accessed on August, 23, 2020).
72. ChemBio Ltd. official website. DPP® COVID-19 IgM/IgG System (2020). Available at: <http://chembio.com> (accessed on August, 22, 2020).
73. Hardy diagnostics official website. Anti-SARS-CoV-2 Rapid Test (2020). Available at: <https://hardydiagnostics.com/sars-cov-2> (accessed on August, 23, 2020).
74. Healgen Scientific LLC official website. COVID-19 Antibody Rapid Detection Kit (2020). Available at: <https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19> (accessed on August, 25, 2020).
75. Hangzhou Biotest Biotech Co., Ltd official website. Right Sign™ COVID-19 IgM/IgG Rapid Test Kit (2020). Available at: <https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19> (accessed on August, 25, 2020).
76. Aytu Biosciences/Orient Gene Biotech official website. The COVID-19 IgG/IgM Point-of-Care Rapid Test (2020). Available at: <https://stocknewsnow.com/companynews/5035338834942348/AYTU/101843> (accessed on August, 24, 2020).

Поступила 28.09.20

Принята к печати 05.10.20