



ПРОБЛЕМНЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2 С ПОМОЩЬЮ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ПЦР

¹Мавзютов А.Р.*, ²Гарафутдинов Р.Р., ³Халикова Е.Ю., ²Юлдашев Р.А., ^{2,4}Хусаинова Р.И., ²Чубукова О.В., ²Гималов Ф.Р., ²Матниязов Р.Т., ^{5,6}Алексеев Я.И., ⁷Воробьев А.А., ²Вершинина З.Р., ⁸Мифтахов И.Ю., ²Никоноров Ю.М., ²Максимов И.В., ^{1,2}Кулуев Б.Р., ^{1,2}Баймиев Ан.Х., ^{1,2}Баймиев Ал.Х., ²Чемерис А.В.

¹Башкирский государственный медицинский университет,
Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3, *E-mail: ufalab@mail.ru

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября 71

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

⁴ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, Россия, 450076, г. Уфа, ул. Гафури, д. 74

⁵ООО «Синтол», Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

⁶Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31/33

⁷Научно-исследовательский центр Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации,
Россия, 610017, г. Киров, Октябрьский проспект, 119

⁸ГБУ РБ «Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством Академии наук Республики Башкортостан»
Россия, 450029, Уфа, ул. Ульяновых, д. 65

Резюме

Представлены основные проблемы, возникающие в процессе диагностики новой коронавирусной инфекции при использовании ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Основной акцент сделан на анализе причин как истинных ложноотрицательных результатов диагностики, так и «ложноотрицательных» результатов, обусловленных издержками преаналитической стадии и/или неверной интерпретацией получаемых данных. Приведены оценки вирусной нагрузки у человека и высказаны предположения относительно ожидаемого количества вирусных частиц в исследуемых рото- и носоглоточных образцах. Дана сравнительная характеристика и оценка аналитической чувствительности разрешенных к применению в Российской Федерации диагностических тест-систем для выявления SARS-CoV-2, основанных на ОТ-ПЦР. Обсуждаются различные технологические подходы к конструированию тест-систем для снижения вероятности ложноотрицательных реакций, в частности, основывающиеся на одновременной детекции нескольких геномных мишеней коронавируса, применении зондов с одинаковыми флуорохромами для усиления сигнала и исключения ложноотрицательных результатов, связанных с мутациями в сайтах отжига праймеров и гибридизационных зондов.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, РНК, COVID-19, диагностика, ОТ-ПЦР в реальном времени, цифровая ПЦР, ложноотрицательный результат, носоглоточный мазок

Цитирование: Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Юлдашев Р.А., Хусаинова Р.И., Чубукова О.В., Гималов Ф.Р., Матниязов Р.Т., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Вершинина З.Р., Мифтахов И.Ю., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Проблемные аспекты диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с помощью обратно-транскрипционной ПЦР // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50

© Авторы

PROBLEMATIC ASPECTS OF DIAGNOSTICS OF SARS-COV-2 CORONAVIRUS INFECTION USING REVERSE-TRANSCRIPTIONAL PCR

¹Mavzyutov A.R.*, ²Garafutdinov R.R., ³Khalikova E.Yu., ²Yuldashev R.A., ⁴Khusainova R.I., ²Chubukova O.V., ²Gimalov F.R., ²Matniyazov R.T., ^{5,6}Alekseev Ya.I., ⁷Vorobev A.A., ²Vershinina Z.R., ⁸Miftakhov I.Yu., ²Nikonorov Yu.M., ²Maksimov I.V., ^{1,2}Kuluev B.R., ^{1,2}Baymiev An.Kh., ^{1,2}Baymiev Al.Kh., ²Chemeris A.V.

¹Bashkir State Medical University, 3 Lenina Str., 450008, Ufa, Russia

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, *E-mail: ufalab@mail.ru

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2 Trubetskaya str. Moscow, 119991, Russia

⁴Republican Medical Genetic Center 74 Gafuri street, 450076, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

⁵Syntol Ltd, 42 Timiryazevskaya str., 127550, Moscow, Russia

⁶Institute for Analytical Instrumentation RAS, 31/33 Ivana Chernyh str., 198095, St. Petersburg, Russia

⁷Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 119 Oktyabr'skiy prospekt, 610017, Kirov, Russia

⁸Research technological Institute of herbicides and plant growth regulators with experimental production of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, 65 Ulyanov str., Ufa, 450029, Russia

Resume

The paper considers the problematic aspects of detecting a new coronavirus infection using RT-PCR, which often lead to false negative diagnostic results, which occur both at the preanalytic stage and during nucleic acid amplification, including the interpretation of the obtained data. The viral load in humans was evaluated and assumptions were made about the expected number of viral particles in the studied oropharyngeal and nasopharyngeal samples. The list of diagnostic test systems approved for use in the Russian Federation for detecting SARS-CoV-2 with their brief characteristics is given. The necessity of simultaneous use of several targets in the coronavirus genome in one test system detected by probes with the same fluorochrome is noted, which on the one hand increases the probability of detection by increasing the signal, and on the other hand eliminates the false negative results that could occur in the case of mutations in the virus genome at the sites of annealing primers and hybridization probes.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, RNA, COVID-19, diagnostics, real-time RT-PCR, digital PCR, false negative result, nasopharyngeal swab

Citation: Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Yuldashev R.A., Khusainova R.I., Chubukova O.V., Gimalov F.R., Matniyazov R.T., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Vershinina Z.R., Miftakhov I.Yu., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Problematic aspects of diagnostics of SARS-CoV-2 coronavirus infection using reverse-transcriptional PCR. *Biomics*. 2020. V.12(4). P. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50

© The Authors

Введение

Человечество уже год находится в условиях пандемии, вызванной новой коронавирусной инфекцией. Что можно сказать по итогам уходящего 2020 г.? Достигнут определенный прогресс в понимании основных закономерностей распространения этой «заразы», способов её диагностики и лечения больных. При этом все равно остается много неясного в эпидемиологии новой коронавирусной инфекции, хотя есть и некоторые позитивные тенденции. Так, на примере более чем полутора тысяч больных COVID-19 в Регенсбурге (Германия) было отмечено значительное снижение тяжести течения заболевания в августе-октябре 2020 г.

по сравнению с периодом март-июнь 2020 г. [Lampf, Salzberger, 2020]. В частности, у заболевших отмечалось снижение частоты выявления кашлевого симптомокомплекса в три раза (14% против 42%), лихорадки – в два с лишним (17% против 38%), летальных исходов ниже на порядок - с 2,1% до 0,2%. Подобная тенденция наблюдалась и в других странах. Однако осенью началась вторая волна коронавирусной инфекции, которая при переходе в зиму только усилилась. По всей видимости, решать проблему COVID-19 человечеству предстоит еще довольно долго. Тем не менее, прошедшие с весны месяцы дали возможность встретить вторую волну лучше подготовленными. Поскольку одним из

наиболее эффективных способов защиты населения является своевременное выявление инфицированных, значительное развитие получила диагностика РНК вируса. Так, если весной в нашей стране к концу марта, например, были разрешены к применению единичные наборы для молекулярной диагностики РНК SARS-CoV-2, то в начале лета таковых набралось больше двадцати, а к концу лета – свыше тридцати.

Учитывая, что компьютерная томография (КТ) и серодиагностика не обеспечивают непосредственного обнаружения вируса SARS-CoV-2, основным методом этиологической диагностики новой коронавирусной инфекции становится обратнотранскрипционная полимеразная цепная реакция¹ (ОТ-ПЦР), являющаяся высокоспецифичным и довольно чувствительным методом. Несмотря на это, проведение массовых исследований методом ОТ-ПЦР, в том числе лабораториями, не имевшими ранее должного опыта, привело к увеличению количества сообщений о том, что ПЦР-диагностика не идеальна, и может давать ошибочные результаты, чему способствовал и авральный характер работы на первых порах. К тому же, этот инфекционный агент весьма опасен, что также добавляло немало хлопот. Причем все это происходило на фоне повсеместного дефицита специалистов в области вирусологии и микробиологии, ограниченного числа лабораторий, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами II группы патогенности (к которой был отнесен SARS-CoV-2) и оборудованных должным образом для эффективного использования амплификационных методов. При этом ОТ-ПЦР теоретически способна показать наличие в организме человека самого коронавируса, даже если болезнь протекает бессимптомно. Но бывает и наоборот. И с этим как раз связаны проблемы, которые в целом типичны для любой ПЦР-диагностики, но и специфичны именно для нового коронавируса отчасти из-за недостаточного количества информации по нему. Так, в поведении нового коронавируса SARS-CoV-2 еще далеко не все понятно, в том числе на какой стадии его лучше идентифицировать методами молекулярной диагностики. Это приводит к возможно большему, чем когда-либо раньше, проценту недостоверных (ошибочных) результатов. В качестве подтверждения этих слов можно привести недавнюю публикацию сотрудников Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М.Сеченова, которые совместно с коллегами из

других стран провели масштабное исследование проблемы диагностики COVID-19 в России и изучили течение заболевания у большого числа людей [Munblit et al., 2020]. Так, авторами того исследования было показано, что из почти трех с половиной тысяч пациентов Сеченовского университетского госпиталя, находившихся там в период между 8 апреля и 29 мая 2020 г., у 1728 человек ОТ-ПЦР тест на коронавирус оказался положительным, тогда как у даже большего числа (1748 пациентов) присутствия РНК SARS-CoV-2 выявлено не было, что составило более 50% ложноотрицательных результатов ОТ-ПЦР, если учесть, что по остальным показаниям все три с половиной тысяч были больны COVID-19. Конечно, формально ни один из клинических признаков болезни (потеря обоняния, вкусовых ощущений и пр.) и применяющихся для обследования больных методов (КТ, пульсоксиметрия и др.), кроме в данном случае ОТ-ПЦР, не несет информации об этиологии процесса, в силу их неспецифичности. Но и ОТ-ПЦР может ошибаться, приводя к ложноотрицательным результатам, причин для которых довольно много и этому вопросу применительно к коронавирусу уже было уделено определенное внимание [Момыналиев, Иванов, 2020]. С частью из них в данной статье мы также попытаемся разобраться, но одной из главных причин, как это ни странно звучит, служит недостаточная чувствительность массовой ПЦР, не являющейся при этом научным исследованием, где пределы детекции уже другие. Ведь даже мазок со слизистой, взятый в не самое подходящее время у больного COVID-19, теоретически должен содержать хоть какое-нибудь количество вирусных частиц, но оно оказывается за пределом чувствительности стандартного (массового) метода.

ОТ-ПЦР, несмотря на то, что теоретически позволяет детектировать единичные копии искомым мишеней, все же имеет предел чувствительности, выражающийся в детекции исходного числа копий коронавируса (обломков его РНК генома), присутствующих в исследуемом образце, ниже которого получаемый результат окажется ложноотрицательным. При этом возможны и противоположные ложноположительные результаты из-за загрязнения ампликонами помещения, где проводится диагностика, рабочих растворов, пипеток и пр., что является следствием человеческого фактора в виде непрофессионального выполнения необходимых процедур. В целом ложноположительные результаты относительно легко преодолимы, тогда как ложноотрицательные требуют к ним повышенного внимания и этим вопросам посвящены другие наши статьи [Mavziutov et al., 2003; Чемерис и др., 2011; 2012; 2012a]. Впрочем, ложноположительные результаты были свойственны

¹ Прочие методы избирательной амплификации и детекции нового коронавируса, в том числе протекающие в изотермических условиях, требуют другой статьи (готовящейся), хотя ряд проблем диагностики у них с ОТ-ПЦР совпадают.

преимущественно ПЦР с детекцией результатов по конечной точке с помощью гель-электрофореза, требовавшей открытия пробирок с триллионами копий ампликонов. Безусловно, при постановке экспериментов необходимо использовать целый комплекс специальных отрицательных и положительных контролей, позволяющих повысить достоверность анализов. Тем не менее, (ложно)положительный результат заставляет обратить на себя внимание и конкретный анализ можно (и нужно) повторить, тогда как ложноотрицательный результат приводит к худшим последствиям, поскольку человек не будет считаться носителем коронавируса, хотя на самом деле таковым является со всеми вытекающими последствиями в виде вреда его собственному здоровью и угрозы окружающим.

К тому же необходимо учитывать максимальную локализацию вирионов в организме человека. Так, например, в Ливане был госпитализирован 47-ми летний мужчина, контактировавший с больным COVID-19 однако его мазок из носоглотки дал отрицательный результат при наличии очень высокой температуры и прочих симптомов [Waked et al., 2020]. Но взятый у него позже бронхоальвеолярный лаваж показал наличие SARS-CoV-2 с помощью тест-системы в виде мультиплексной ОТ-ПЦР, оказавшись при этом негативным на остальные коронавирусы и ряд других вирусов. Но как бы то ни было, анализ мазков из ротоглотки и носоглотки с помощью ОТ-ПЦР является в настоящее время неким «золотым стандартом» при выявлении SARS-CoV-2.

Работам по детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР первой половины 2020 г. мы уже уделили внимание ранее [Гарафутдинов и др., 2020; 2020а], и здесь будут цитироваться только статьи, опубликованные исключительно во втором полугодии 2020 г. по состоянию на середину ноября с учетом предпубликаций, хотя в ряде случаев сделанные наблюдения или полученные результаты имели место еще весной.

Итак, ОТ-ПЦР диагностика коронавируса² включает следующие этапы³: 1) взятие материала; 2) транспортировка образца; 3) выделение РНК

² Детекция нового коронавируса SARS-CoV-2 в окружающей среде, включая сточные воды, и его выживаемость (что также представляет важную проблему) станут темой отдельной нашей статьи, тогда как здесь будут подниматься вопросы, носящие исключительно диагностический медицинский характер.

³ Как будет видно из дальнейшего изложения, отдельные этапы диагностического процесса могут отсутствовать.

коронавируса; 4) проведение ОТ-ПЦР; 5) интерпретация результатов. Все они по-своему важны, и на каждом этапе исследователей могут подстергать неудачи, о которых речь пойдет ниже. Но прежде следует остановиться на количественном содержании коронавируса у человека при COVID-19 и его персистенции в организме.

Вирусная нагрузка на человека при COVID-19

Данные о количественной оценке представленности вируса SARS-CoV-2 (*син.* обсеменность, вирусная нагрузка) в организме человека при COVID-19, в том числе в различных тканях, пока немногочисленны и нередко противоречивы. Тем не менее, они имеют прикладное значение и на них можно опираться для обоснования выбора времени и мест при взятии образцов для ОТ-ПЦР исследования.

Рассматривая различные аспекты COVID-19 и обращаясь к её первопричине, вирусу SARS-CoV-2, необходимо дифференцировать две основные составляющие этой проблемы. Это эпидемиологические риски инфицирования населения и индивидуальную опасность коронавирусной инфекции для конкретных пациентов, определяющие тяжесть течения заболевания, вероятность связанных с ним осложнений и/или неблагоприятных исходов. Так при использовании компьютерного моделирования было показано, что от «слабого» распространителя (бессимптомного носителя) даже при кашле (не говоря уже про обычное дыхание и разговор) в воздух выделяется не более 0,277 вирионов в 1 см³ (2,77x10²/л). Тогда как явный источник инфекции (больной с тяжелым течением болезни) может выделять до 36030 вирионов в 1 см³ (3,6x10⁷/л) [Riediker, Tsai, 2020]. В контексте рассматриваемой в данной работе проблемы ложноотрицательных результатов ОТ-ПЦР приведенная информация в дальнейшем будет иметь значение, несмотря на компьютерное моделирование ситуации. В том числе с точки зрения обеспечения сан.-эпид. режима в «красной зоне» и защиты медицинских работников, поскольку уже через 3 часа в плохо проветриваемом помещении объемом 50 м³, например в холодное время года, образующийся аэрозоль может содержать до 7,5x10⁹ вирусных частиц.

Установлено, что в инициации процесса вирус-индуцированного эндцитоза задействован рецептор ACE2 клеток человека. В связи с этим была прослежена корреляция между уровнем экспрессии гена данного рецептора в клетках различных тканей и содержанием в них коронавируса [Trypsteen et al., 2020]. Однако прямой зависимости выявить не удалось. Так, например, наиболее высокое содержание

ACE2 имело место на мембранах клеток слизистой ротоглотки, желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и мочеполовой системы мужчин. Несколько ниже уровень экспрессии этого гена был показан в клетках верхних дыхательных путей и наименьший – в альвеолярных клетках легких. Тогда как наибольшая концентрация вируса SARS-CoV-2 была показана на клетках слизистой ротоглотки, верхних и нижних отделов дыхательной системы, несколько меньшие количества вируса обнаруживались в клетках ЖКТ и минимальные – в эпителиоцитах мочеполовой системы как мужчин, так и женщин.

Интересны данные по подсчету количества вирусных частиц SARS-CoV-2, обнаруженных в клетках отдельных тканей и органов человека [Sender et al., 2020]. Так, методом ОТ-ПЦР на культуре клеток определяли инфицирующую дозу вируса или его минимальное количество, необходимое для поражения 50% клеток культуры ткани (TCID₅₀, Tissue Culture Infective Dose). При этом авторы опирались также на данные двух публикаций, где было произведено экстраполирование на человека результатов определения концентрации коронавирусов разными способами (ОТ-ПЦР и культурой клеток) у зараженных SARS-CoV-2 макаков [Munster et al., 2020; Rockx et al., 2020; Williamson et al., 2020]. Согласно расчетным данным инфицированный человек на пике заболевания может нести от 10⁹ до 10¹¹ вирионов SARS-CoV-2. Из них в клетках трахеи и бронхов обнаруживается до 10⁴–10⁸ молекул вирусной РНК, миндалин и лимфоузлов – 10⁶–10⁹, легких – 10⁹–10¹¹ и ЖКТ – 10³–10⁷ копий РНК. В этой связи можно обратиться еще к одной статье, где показано, что у перенесших заболевание в легкой форме, вирусная нагрузка, а точнее концентрация вирусов, оказалась ниже приблизительно в 60 раз по сравнению с тяжелыми формами заболевания [Li et al., 2020a], то есть почти на два порядка, что в общем и целом соответствует разбросу приведенных выше данных.

Возвращаясь к статье Sender et al. [2020], следует отметить, что в ней есть интересные подсчеты, в том числе с привлечением данных по старым коронавирусам, полученным с использованием электронной микроскопии, согласно которым авторы сочли, что в одной инфицированной клетке может находиться около 10⁵ вирусных частиц SARS-CoV-2 (10% от общей массы клетки), исходя из объема поражаемой клетки в 1 пиколитр и массы одного вириона в 1 фемтограмм. При этом они посчитали, что лишь приблизительно 10 вирионов из этого количества являются инфекционно-способными, тогда как остальное количество представляет собой дефектные и неактивные вирусы. Здесь нужно заметить, что для детекции коронавирусной РНК с

помощью ОТ-ПЦР подходят любые вирусные частицы, в том числе дефектные при условии сохранения в них мест для отжига праймеров и гибридизационных зондов, но об этом речь пойдет дальше. Тут надо еще напомнить, что человеческий организм состоит из приблизительно 10¹³ клеток, но лишь 10¹¹ из них (по мнению этих авторов) могут использоваться для репликации коронавируса. Они также пришли к заключению, что у человека только одна клетка из 10⁵ – 10⁷ может быть инфицированной, фактически определяя тем самым тяжелую и легкую форму течения болезни соответственно. Вероятнее всего, что тяжесть заболевания зависит не от количества вирионов в каждой клетке, а именно от числа инфицированных клеток, поскольку, попав внутрь клетки, коронавирус подчиняет себе ее трансляционный аппарат, запуская собственное воспроизводство, которое в принципе должно быть одинаково для клеток одного типа.

На основании данных этих авторов [Sender et al., 2020], попробуем сделать свои расчеты, беря как минимальные, так и максимальные значения. Если допустить, что из 10¹¹ клеток инфицировано, например 10⁴ - т.е. каждая 10-ти миллионная (нижний предел) и она содержит 10⁵ вирусных частиц, то это будет как раз 10⁹. При 10⁶ инфицированных клеток (верхний предел) с тем же количеством вирусных частиц в них получим ожидаемые 10¹¹. Но для детекции РНК SARS-CoV-2 представляют интерес сведения - сколько вирусных частиц может оказаться в той или иной пробе, используемой для диагностики. При взятии мазка нужно, чтобы в него попала хотя бы одна из инфицированных клеток, содержащая около 10⁵ вирусных частиц. Для этого на мазке должно оказаться не менее 10⁶ эпителиальных клеток, допуская, что из них лишь одна может содержать вирусы. То есть проблема скорее всего в том, что лаборант, сам того не желая, может не взять нужную клетку. Но так ли это?

Для того чтобы оценить сколько эпителиальных клеток из слизистой носоглотки попадает на мазок можно привлечь данные из ДНК-криминалистики, использующей для идентификации личности мазки с зашечным буккальным эпителием. Так, считается, что из них выделяется в среднем около 600 нг ДНК [Butler, 2010]. Поскольку в каждой такой клетке эпителия содержится около 6 пикограмм ДНК, то клеток на мазке, чтобы получить такое количество ДНК, должно быть, по крайней мере, 5×10⁶ с учетом неизбежных потерь при экстракции. Из этого следует, что на мазке из рото- или носоглотки при детекции SARS-CoV-2 будет также приблизительно 5×10⁶ клеток или около того. Если принять, что только одна из 10⁵ - 10⁷ клеток слизистой инфицированы (по подсчетам Sender и соавт. [2020]), то будет очень

высока вероятность, что при взятии мазков нужные клетки будут попадать в них случайным образом или не попадать вовсе, что приведет к недостоверному результату анализа. Исходя из этого, следует допустить, что процент инфицированных клеток видимо повыше, но титр вирусных частиц в них поменьше. Возможно, инфицирована одна клетка из 10^4 или из 10^6 , но несут они не 10^5 , а 10^4 вирусных частиц. Таким образом, при взятии мазка с 5×10^6 клетками слизистой только 500 или всего лишь 5 клеток из них могут быть инфицированными, что в итоге обеспечит в мазке 5×10^6 или 5×10^4 вирусных частиц. Безусловно, нужно учитывать потери молекул РНК вируса при экстракции, но они не должны составлять большую долю и быть критичными. То есть потерять все 10^6 или 10^4 геном-эквивалентов вируса на преаналитических стадиях и донести до реакционной смеси единичные копии детектируемых обломков РНК коронавируса кажется невозможным. Однако такое похоже происходит. Для исключения факта потери РНК на преаналитических стадиях в набор реагентов для ОТ-ПЦР должен входить внутренний положительный контроль выделения РНК (искусственно синтезированный фрагмент РНК, с последовательностью, отличающейся от известных в природе), что сделано некоторыми отечественными производителями. Непрохождение реакции ОТ-ПЦР с данной контрольной РНК при одновременном прохождении реакции ОТ-ПЦР по фрагменту РНК SARS-CoV-2 будет свидетельствовать о потере препарата нуклеиновых кислот на этапе выделения и результат такого исследования должен быть исключен из анализа, а образец выделен и исследован повторно.

С другой стороны, этим выкладкам можно противопоставить исследование вирусной нагрузки у довольно большого числа людей с помощью ОТ-ПЦР не только РНК SARS-CoV-2, но и других респираторных вирусов, свидетельствующее о присутствии в анализируемых образцах весьма малых (единичных) количеств геном-эквивалентов вирусов [Jacot et al., 2020]. Если допустить, что данные по старым коронавирусам, которыми в том числе пользовались Sender и соавт [2020], не подходят новому коронавирусу, и его вирионов в инфицированной клетке бывает вообще не более 1000, включая дефектные, то вполне можно ожидать и довольно небольшое количество обломков вирусной РНК в конечном растворе.

При этом остаются неизвестными и процент инфицированных клеток и титр вирусных частиц в них. В общем, вопросов больше, чем ответов. Но эффективность экстракции РНК коронавируса оценить можно, если опять обратиться к данным по ДНК-криминалистике. Так, в одной из относительно недавних работ [Bruijns et al., 2018] было определено

как ворсистый материал на флок-тампоне, которым берутся мазки, влияет на экстракцию ДНК из них, что может быть вполне экстраполировано и на выделение РНК коронавируса. Были исследованы флок-тампоны для мазков, изготовленные из 5 типов различных материалов (хлопок и синтетика) 14-ю производителями, и при этом обнаружено, что жидкостная емкость ворсистого покрытия на наконечнике находилась в диапазоне от 25 до 200 мкл, а эффективность экстракции ДНК, специально помещенной на них в модельном эксперименте, варьировала от 5 до 50%. Вот и два порядка разницы на преаналитическом этапе только при экстракции вирусной РНК. Исходя из этой информации, можно допустить, что использованием различных типов ворсистых материалов⁴ при взятии мазков на коронавирус отчасти объясняются серьезные отличия в содержании вирусных частиц во взятых образцах, когда в лаборатории, где проводятся такие анализы, свозятся образцы из разных мест. И что подобное происходит авторам данной статьи доподлинно известно, поскольку в одних пробирках присутствует жидкость в виде специальной транспортной среды, а в других она может практически вся впитаться в ворсистый наконечник.

В этой связи нельзя не упомянуть о напечатанных на 3D принтере нефлокированных тампонах, показавших свое удобство при взятии мазков на коронавирус (<https://virologia.org/2020/12/16/3d-printed-nasal-swab-for-covid-testing/>).

Персистенция коронавируса SARS-CoV-2

Сейчас стандартной практикой определения излечения (освобождения от коронавируса) является двукратный негативный ОТ-ПЦР тест. Однако не все так просто и это может быть очень индивидуально. Не обнаружение вируса в отдельных случаях можно отнести за счет сниженной вирусной нагрузки у излечившегося больного, притом, что вирус в нем может оставаться, но переносчиком инфекции такой человек скорее всего уже не является, опять-таки ввиду крайне низкого «выхода» вирусных частиц из него. «Держать» выздоровевшего пациента в больнице

⁴ В действующих «Методических рекомендациях МР 3.1.0169-20 с изменениями №1 «Лабораторная диагностика COVID-19» не регламентируется тип материала на флок-тампонах или тупферах для взятия мазков, про которые только говорится, что они должны быть стерильными, что на самом деле для проведения ОТ-ПЦР не имеет значения, поскольку даже при помещении в транспортную среду и доставке образцов при положительных температурах на этих мазках неизбежно содержится множество бактерий из той же носоглотки.

только потому, что у него тест на коронавирус положительный возможно не совсем верно. В качестве некоего подтверждения подобных ситуаций можно привести ряд публикаций.

Персистенция SARS-CoV-2 в организме вылечившегося человека может иметь место весьма длительное время. Так, у двух пациентов из Намибии (у одного был слабо выраженный COVID-19, а у второго симптомы вообще не проявлялись) коронавирус с помощью ОТ-ПЦР обнаруживался соответственно через 72 и 77 дней после первого выявления [Kandetu et al., 2020]. В Италии у 43-х летнего мужчины были взяты мазки из рото- и носоглотки, которые при использовании ОТ-ПЦР показали наличие SARS-CoV-2 путем детектирования трех мишеней (E, RdRP, N) [Baldacci et al., 2020]. Причем после выписки из больницы анемия продолжалась у него более двух месяцев, столько же циркулировал в нем и коронавирус – по крайней мере, через 63 дня от момента первого выявления SARS-CoV-2 у него был детектирован, но через 73 дня уже нет. У 27-ми летней итальянки коронавирус с помощью ОТ-ПЦР был диагностирован на 29-ой неделе беременности и сохранялся в течение 34 дней послеродового периода и всего в течение 104 дней с момента первого положительного теста [Molina et al., 2020]. Еще более длительная персистенция SARS-CoV-2 в организме была отмечена у 83-х летнего японца [Abe et al., 2020]. Через три месяца лечения от COVID-19 ему почти полностью удалось восстановить свое здоровье, однако на 111-ый день у него с помощью ОТ-ПЦР все еще обнаруживался коронавирус, хотя и в довольно небольшом количестве, которого, впрочем, было достаточно, чтобы инфицировать культуру клеток Vero E6, свидетельствуя, что в нем «сидят» не какие-то остатки (обломки РНК) вируса, а полноценные вирионы, способные к инфицированию. Также для верификации наличия у него SARS-CoV-2 было проведено секвенирование изолятов, показавшее ожидаемую нуклеотидную последовательность. При этом у данного человека имелись нейтрализующие антитела, возможно не позволяющие вирусу активно размножаться. Авторы сделали вывод, что отдельные люди, несмотря на то, что могут быть практически хроническими носителями коронавируса, разносчиками инфекции уже не являются [Abe et al., 2020].

Здесь, пожалуй, нужно вспомнить, что в человеческом организме постоянно присутствует множество разных вирусов, среди которых самый известный – вирус герпеса, «пробуждающийся» при простудных явлениях, снижающих общий иммунитет. Поскольку про новый коронавирус мы еще очень мало знаем, то исключать, что у некоторых людей он может

сохраняться в организме весьма длительное время, никак себя не проявляя, нельзя.

Выбор, взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала

(преаналитический этап исследования)

В Приложении 3-1 «Инструкция по проведению диагностики COVID-19 с применением методов амплификации нуклеиновых кислот» к «Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 9»» довольно обстоятельно прописан порядок действий персонала при сборе, хранении и транспортировке диагностического материала, в том числе с учетом его биологической опасности. Однако соблюдение требований и рекомендаций, предписанных целым рядом нормативных документов, преимущественно направлено на минимизацию инфекционных рисков для персонала и населения. В то время как требования, обеспечивающие аналитическую составляющую лабораторного исследования, в особенности при использовании ОТ-ПЦР для диагностики вирусных инфекций сформулированы нечетко.

Рекомендации по хранению и условиям транспортировки образцов, подлежащих исследованию, изложенные в вышеуказанных документах были преимущественно ориентированы на сохранность ДНК-содержащих вирусов для вирусологического исследования с применением клеточных линий и/или ДНК для последующей ПЦР. Поскольку рекомендуемые для транспортировки исследуемого материала среды для культур клеток (199, Игла, Хенкса и др.) представляют собой, по сути, тканевую жидкость и, содержат полный набор незаменимых аминокислот, витаминов и пр., являясь по сути идеальной питательной средой для размножения бактериальной флоры, всегда присутствующей в отделяемом слизистых. Это предполагает использование антибактериальных бактериостатических препаратов, которые одновременно являются неспецифическими ингибиторами полимераз, в том числе используемых на этапах обратной транскрипции и ДНК-полимеризации. Это существенно повышает вероятность ложноотрицательных результатов ПЦР.

Образцы, берущиеся для выявления коронавирусной инфекции можно грубо разделить на две группы – 1) с большей вирусной нагрузкой, но более труднодоступные и 2) легкодоступные, но с меньшей вирусной нагрузкой. К первым относятся бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный аспират, назофарингеальный аспират, аспират трахеи, мокрота. Для посмертной диагностики используют

аутопаты легких, трахеи, селезенки. Ко второй группе нужно отнести носо-, ротоглоточные и назальные мазки, слюну.

Наиболее характерными и, к сожалению, ошибочными, являются механистичные представления о том, что ложноотрицательные результаты могут быть связаны с «уходом» вирусов «вглубь», «вниз» и т.д., в связи с чем они не обнаруживаются у больных. В таком случае рождается очередной закономерный вопрос, если вирус «спрятался», и мы не в состоянии обнаружить его РНК высокочувствительным методом – ОТ-ПЦР, то каким образом такой больной будет инфицировать окружающих? Как «уход» вирусов вглубь стыкуется с подсчитанным выделением больными с выдыхаемым воздухом свыше $3,6 \times 10^7$ /л вирионов, что в пересчете на объем легких и частоту дыхания обеспечивает непрерывное поступление в окружающее пространство триллионов вирусных частиц [Riediker, Tsai, 2020], и с чувствительностью всех применяемых тест-систем – не менее 10^3 копий РНК вируса на 1 мл экстракта. Таким образом, вышеуказанная причина ложноотрицательных результатов явно несостоятельна. Более того формальная логика утверждения об исчезновении вируса и его стремлении «скрыться» от диагностики является идеологической основой для целого ряда ятрогенных рисков.

Как уже говорилось выше, основным материалом для исследования методом ПЦР на COVID-19 является соскоб («мазок») со слизистых носоглотки и ротоглотки. При этом практически не возникают сомнения в обоснованности предлагаемой техники данной процедуры, как это показано на рис. 1. При этом назальные мазки подходят, в том числе и детям [Chan et al., 2020]. Взятие соскоба через носовые ходы со слизистой гортани или со слизистой ротоглотки не имеет никаких обоснованных преимуществ, более того, вредно для больного ввиду чрезмерной травматизации [Yee et al., 2020] и опасно непосредственно для медицинского персонала. Последнее объясняется тем, что раздражение нервных рецепторов слизистой ротоглотки неизбежно вызывает кашлевой и/или рвотный рефлекс и образование насыщенного аэрозольного «облака» диаметром 1,0-1,5 метра, содержащего многочисленные вирионы.

В ряде случаев как разумная альтернатива соскобам рассматривается слюна, в особенности у детей [Medeiros da Silva et al., 2020; Kandel et al., 2020; Moreno-Contreras et al., 2020; Uwamino et al., 2020; Sakanashi et al., 2021; Yee et al., 2020]. Однако информативность исследования слюны зависит от влияния на результат целого ряда трудноконтролируемых факторов (приема пищи,

питья, курения, использования жевательной резинки и др.) существенно снижающих содержание вирусной РНК. Безусловно, оптимальным следует признать взятие такого материала в утренние часы до умывания [Liu et al., 2020].

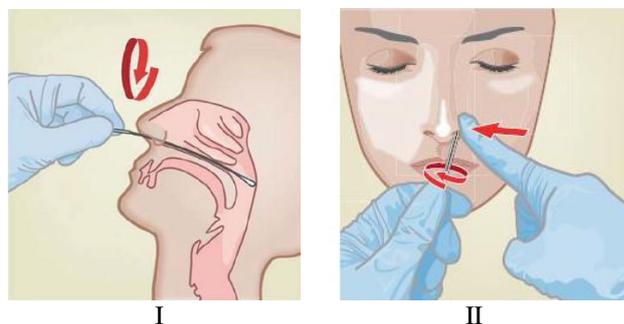


Рис. 1. Взятие мазков для детекции SARS-CoV-2. I – из носоглотки; II – назальный мазок

Fig. 1. The selection of swabs for the detection of SARS-CoV-2. I - from the nasopharynx; II - nasal swab

К другим образцам, используемым для детекции SARS-CoV-2, относится слезная жидкость, но это приемлемо лишь для пациентов со средней и тяжелой формой COVID-19 [Arora et al., 2020]. Сообщается о детекции коронавирусной РНК в выдыхаемом воздухе [Ryan et al., 2020; Sawano et al., 2020]. Причем результаты оказались не хуже, чем для носоглоточных мазков, но для их взятия требуются более сложные устройства типа R-tube Vent.

Исследование методом ОТ-ПЦР бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального и назофарингеального аспиратов ввиду инвазивности и риска для здоровья обследуемого явно выходит за пределы разумной достаточности, хотя содержание коронавируса в них, как правило, наиболее высокое.

Отдельно необходимо остановиться на исследовании пулированных образцов, снижающих затраты времени и реактивов. Так в модельном эксперименте по детекции SARS-CoV-2 в 94 пулированных пробах по 10 образцов, включавших 934 негативных и 6 позитивных образцов [Sahajpal et al., 2020], положительными оказались 4 пула. В последних каждый образец анализировался повторно и были выявлены ожидаемые 6 положительных. В итоге вместо 940 тестов удалось ограничиться в общей сложности 134 реакциями. Однако на практике, когда при использовании метода пулирования было обследовано 195 медицинских работников, 472 - пациентов с иными заболеваниями и 333 кашляющих пациента с лихорадкой, при этом вместо 1000 положенных исследований было проведено 538. В итоге даже среди пациентов с соответствующей симптоматикой положительный результат был

получен лишь у 12 человек или в 3,6% случаев от числа лихорадивших и кашляющих. Тот факт, что данная работа была выполнена в Японии в самый разгар первой волны пандемии (апрель 2020 г.), явился основанием для признания результатов исследования с использованием метода пулирования неудовлетворительными [Becker et al., 2020; Kim et al., 2020a]. Ещё больший разброс результатов ПЦР при использовании метода пулирования был получен на тест-системах различных производителей. Результативность исследования при этом варьировала в диапазоне 75 - 100% [Garg et al., 2020]. При этом было обнаружено, что четыре набора показали 100% чувствительность, а остальные три характеризовались 90, 85 и 75% точности. Таким образом, применение метода пулирования для ПЦР-диагностики COVID-19 сопровождалось значительным увеличением вероятности ложноотрицательных результатов.

Отдельно необходимо обратить внимание на то, что на конечный результат исследования существенное влияние могут оказывать различные способы инаktivации коронавируса во взятых образцах перед их хранением и транспортировкой для последующей детекции с помощью ОТ-ПЦР [Wang et al., 2020; Pan et al., 2020]. Так отмечено потенциальное получение ложноотрицательных результатов после температурной обработки (56°C, 30 мин) для образцов с низкой вирусной нагрузкой. Интересно, что высокотемпературная обработка (от 70 до 95°C в течение 3 – 15 мин) взятых образцов допускала детекцию SARS-CoV-2 без этапа выделения РНК, почти в два раза сокращая время всей процедуры [Mancini et al., 2020], о чем дальше еще пойдет речь.

Значительный процент ложноотрицательных результатов при детекции SARS-CoV-2 имел место весной 2020 г., когда в соответствии с первыми редакциями протоколов и нормативных документов по лабораторной этиологической диагностике COVID-19 в качестве основного метода исследования стала использоваться ОТ-ПЦР. В срочном порядке были разработаны рекомендации, изложенные в письме «О направлении временных рекомендаций по организации лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» от 21.01.2020 за №02/706-2020-27. Они базировались на документах прежних лет - СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)»; СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (с изменениями на 29 июня 2011 года), утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197) и 1.3. 2569-09

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

Рекомендации по хранению и условиям транспортировки образцов, подлежащих исследованию, изложенные в вышеуказанных документах были преимущественно ориентированы на сохранность ДНК-содержащих вирусов для вирусологического исследования с применением клеточных линий и/или ДНК для последующей ПЦР. Поскольку рекомендуемые для транспортировки исследуемого материала среды для культур клеток (199, Игла, Хенкса и др.) представляют собой, по сути, тканевую жидкость и, содержат полный набор незаменимых аминокислот, витаминов и пр., являясь по сути идеальной питательной средой для размножения бактериальной флоры, всегда присутствующей в отделяемом слизистых. Это предполагает использование антибактериальных бактериостатических препаратов, которые одновременно являются неспецифическими ингибиторами полимераз, в том числе используемых на этапах обратной транскрипции и ДНК-полимеризации. Это существенно повышает вероятность ложноотрицательных результатов ПЦР.

Выделение РНК коронавируса

Данный этап является одним из критических, поскольку от него зависит и количество выделяемой РНК (число копий мишеней или иначе геном-эквивалентов) и ее качество, под которым в данном случае в первую очередь следует понимать размер фрагментов этой молекулы. Хорошо известно, что РНК – биополимер в большей степени подверженный деградации в отличие от ДНК. При этом подобранные системы праймеров для детекции SARS-CoV-2 рассчитаны на амплификацию довольно коротких участков генома этого вируса, которые должны сохраняться при стандартных процедурах выделения РНК. В настоящее время производится, в том числе в нашей стране, большое количество коммерческих наборов для детекции в режиме реального времени коронавируса SARS-CoV-2, включающих в свой состав необходимые реагенты для выделения вирусной РНК, сводящие к минимуму человеческий фактор. Также существуют готовые наборы только для выделения РНК, в том числе в ручном режиме. Исключив ошибки пипетирования и не нарушая порядок действий при выделении РНК, можно получать достоверные результаты. При этом получение качественного препарата РНК коронавируса во многом зависит от предыдущего преаналитического этапа в виде хранения и транспортировки взятых образцов.

Безусловно, применение автоматических экстракторов нуклеиновых кислот повышает воспроизводимость результатов при выделении РНК SARS-CoV-2. В одной недавней работе было проведено сравнение эффективности нескольких моделей таких экстракторов производства ряда фирм [Ransom et al., 2020]. Так, были испытаны приборы KingFisher Flex (Thermo Fisher), EZ1 Advanced XL (Qiagen), NUCLISENS easyMAG (bioMerieux), показавшие в целом сходные результаты, в том числе при использовании двух моделей ДНК-термоциклеров с разными наборами для детекции SARS-CoV-2. Бразильскими авторами для автоматической экстракции РНК коронавируса была использована модель MagNA Pure 96 (Roche) [Barra et al., 2020]. В еще одной работе применялся экстрактор Chemagic 360 (Perkin-Elmer) [Radbel et al., 2020]. И это далеко не полный перечень таких статей, в которых были задействованы автоматические экстракторы. Однако главным общим недостатком этих и многих других подобных систем является довольно высокая стоимость как их самих, так и расходных материалов, что, тем не менее, абсолютно не исключает важность и необходимость их использования при потоковых исследованиях.

В этой связи стоит снова обратить внимание на отдельные публикации⁵, где описываются «прямые» ОТ-ПЦР коронавируса SARS-CoV-2 без выделения РНК, но с предварительным прогревом (для инактивации вируса) носо- или ротоглоточных мазков [Alcoba-Flores et al., 2020; Fukumoto et al., 2020; Kriegova et al. 2020; Lübke et al., 2020; Srivastan et al., 2020; Ulloa et al., 2020 и др.]. С одной стороны это делает диагностику коронавирусной инфекции еще дешевле и значительно быстрее, но при этом такая прямая диагностика теоретически должна вести к увеличению числа ложноотрицательных результатов. В одной из цитированных выше работ [Srivastan et al., 2020] для диагностики использовались «сухие» носоглоточные мазки, из которых непосредственно перед ОТ-ПЦР проводилась элюция РНК коронавируса. Другие авторы [Fukumoto et al., 2020] сравнили детекцию SARS-CoV-2 с использованием стандартного коммерческого набора для выделения РНК и без него, получив следующие результаты – прямой ОТ-ПЦР было обнаружено присутствие вируса в 53 из 71 образца, тогда как после этапа экстракции РНК эти же образцы показали наличие коронавируса в 55 образцах, что можно считать за практически одинаковый результат с учетом стандартной ошибки опыта. В еще одной статье [Kriegova et al., 2020] описана детекция SARS-

CoV-2 без этапа экстракции всего за один час, причем чувствительность их метода составила всего 7 копий геном-эквивалента вируса на реакцию или 550 копий на 1 мл.

Проведение ОТ-ПЦР

Эффективность ОТ-ПЦР во многом определяется выбором мишени для диагностически значимой амплификации. Наиболее существенное при этом требование к мишени: консервативность и мутационная стабильность. Известно, что геном SARS-CoV-2 представлен единой молекулой РНК в виде (+)-цепи, состоящей из приблизительно 29900 нуклеотидов и кодирующей несколько структурных и неструктурных белков, обозначенных на рис. 2 в виде разноцветных прямоугольников, тогда как тонкие черные линии символизируют некодирующие белки участки.

Следует заметить, что созданные диагностические тест-системы для детекции нового коронавируса имеют 100% специфичность⁶, благодаря выбору уникальных участков его генома в качестве мишеней. Ранее мы уже отметили быстроту создания таких тест-систем для выявления коронавируса SARS-CoV-2 вскоре после его появления и стремительный рост их числа в мире и в России [Гарафутдинов и др., 2020; 2020a]. Здесь же акцентируем внимание на экспериментальных работах второй половины 2020 г., посвященных детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с TaqMan зондами, которых опубликовано за этот период огромное количество, но мы остановимся лишь на некоторых.

В довольно большом числе публикаций говорится о сопоставлении различных коммерческих наборов, в том числе с изготовленными в лабораториях [Haddar et al., 2020; Liotti et al., 2020; Moore et al., 2020; Smith et al., 2020]. Так, в одной из статей [Dust et al., 2020] проведено сравнение четырех таких тест-систем с cobas (Roche) и Xpert (Cepheid), продемонстрировавшее хороший уровень детекции коронавирусного E гена в виде 2 – 10 копий на реакцию, что превысило эти показатели для коммерческих наборов, однако при пересчете на 1 мл «домашние» им уступили в первую очередь из-за используемых объемов реакционных смесей.

⁶ Здесь под специфичностью понимается, что подобранная система праймеров не будет амплифицировать никакие другие участки каких-либо вирусных или иных геномов. При этом может возникнуть ситуация, по которой из-за произошедших мутаций в геноме того же коронавируса праймер(ы) утратят свою специфичность и не будут способны обеспечивать амплификацию целевых участков, однако этому вопросу посвящен специальный раздел данной статьи.

⁵ Таких работ, выполненных в разных странах довольно много, но здесь упомянем лишь часть из них.



Рис. 2. Упрощенная схема организации генома бетакоронавируса SARS-CoV-2 (масштаб не соблюден). 5'-UTR и 3'-UTR – нетранслируемые области; ORF1a/b (replicase/transcriptase) кодирует 16 неструктурных белков (NSP); S - белок зубца короны (spike); E - малый белок оболочки (envelope); M - мембранный гликопротеин (membrane); N - нуклеокапсидный белок (nucleocapsid); 3a, 6, 7a, 8, 10 - ORF (открытая рамка считывания) различных вспомогательных белков.

Fig. 2. Simplified scheme of genome organization of SARS-CoV-2 beta coronavirus (scale not observed). 5'-UTR and 3'-UTR – untranslated regions; ORF1a/b (replicase/transcriptase) encodes 16 non-structural proteins (NSP); S - crown prong protein (spike); E - small envelope protein (envelope); M - membrane glycoprotein (membrane); N - nucleocapsid protein (nucleocapsid); 3a, 6, 7a, 8, 10-ORF (open reading frame) of various auxiliary proteins.

Определенный интерес представляют работы, в которых сообщается о мультиплексной ОТ-ПЦР с TaqMan зондами с использованием нескольких мишеней в коронавирусном геноме. Мультиплексные тест-системы имеют определенное преимущество перед одиночными в том плане, что в случае мутаций какого-нибудь изолята SARS-CoV-2 вероятность того, что в обоих мишенях произойдут замены нуклеотидов, не позволяющие праймерам отжигаться на нужном месте, несравнимо ниже, чем для одной мишени. Еще одним преимуществом может быть кратное усиление детектируемого сигнала, что будет иметь место при использовании разных гибридных зондов TaqMan зондов, но меченных одинаковым флуорохромом. Таким образом, триплексный набор (имеются в виду внутренние контроли) теоретически может дать тройное усиление сигнала, поскольку для детекции коронавирусной инфекции с подобным набором не имеет никакого значения какая мишень (или мишени) обеспечивает рост флуоресценции, свидетельствующий о наличии в образце SARS-CoV-2.

В одной из статей говорится о проведении мультиплексной ОТ-ПЦР, мишенями для которой служили участки генов E и N нового коронавируса, а также детектировался обычный сезонный грипп, выявляемых с помощью гибридных зондов, меченных разными флуорохромами – FAM, HEX и Cy5 соответственно [Mancini et al., 2020]. Достигнутый предел чувствительности находился между 5 и 10 геном-эквивалентами на реакцию, а значения пороговых циклов для разных вирусов составили 37,8 и 37,7. Проведенный в этой работе анализ 1000 человек (600 больных COVID-19 пациентов, 200 инфицированных гриппом и 200 теоретически здоровых) позволил выявить только двух человек, у которых одновременно присутствовал и SARS-CoV-2, и сезонный грипп. В еще одной работе [Freire-Paspuel et al., 2020] предел чувствительности составил 1000 копий вирусного

генома на 1 мл с мультиплексом, представленным двумя участками N-гена коронавируса, выявляемых зондами с теми же красителями FAM и HEX, а также геном человеческой рибонуклеазы P, служившим в качестве внутреннего контроля для оценки эффективности выделения РНК из анализируемых образцов, зонд для которой был мечен флуорохромом Cy5, тогда как в цитированной выше статье этот ген также имелся, но гибридный зонд для него нес флуорохром ROX. Другие авторы сообщили о мультиплексе, составленном на основе S-гена коронавируса и человеческой рибонуклеазы P, выявляемых разными флуорохромами [Zhen, Berry, 2020]. Пределы детекции SARS-CoV-2 в этой работе находились в диапазоне 1301 ± 13 геном-эквивалентов на 1 мл. 500 и более копий геном-эквивалентов на 1 мл экстракта удалось детектировать при использовании мультиплекса из двух участков N гена (N1 и N2) вкуче с рибонуклеазой P [Kudo et al., 2020]. В этой работе использовалось несколько поразному меченных гибридных зондов. Так, N2 пробы несли флуорохромы FAM или HEX, тогда как проба N1 была мечена только FAM. При детекции N1 и N2 по отдельности использовался краситель FAM, при мультиплексе - FAM и HEX. Однако из изложенного в той статье материала явно не следует, что в этом мультиплексе применялись разные гибридные зонды, несущие одинаковый краситель, что могло бы повысить чувствительность реакции, о чем говорилось выше.

Интерпретация результатов

Интерпретация данных ПЦР – обязательное условие постановки диагноза, несмотря на кажущуюся простоту, оказалась одной из наиболее трудных задач. Единого видения в её решении нет до настоящего времени даже среди специалистов (разработчиков тест-систем и соответствующего лабораторного оборудования, врачей и биологов диагностических лабораторий). Ещё больше разброс мнений среди специалистов смежных специальностей

(инфекционистов, эпидемиологов, анестезиологов-реаниматологов и др.).

Как это ни странно, но одной из основных причин указанного, на наш взгляд, стало смешение двух ключевых понятий: «результат лабораторного исследования» и «диагноз». Дело в том, что диагноз является результатом анализа всей совокупности имеющихся данных и описывает развивающуюся болезнь. Для постановки диагноза используются все доступные источники информации, включая анамнез, осмотр, термометрию, лабораторные исследования, компьютерную томографию и многое другое, каждый из которых является источником принципиально разнородных данных оценки, например, функциональной активности определенных систем организма или морфологических изменений легочной ткани, обусловленных воспалительным процессом, и т.д. В линейке представленных источников диагностических значимых данных информацию об этиологии инфекции применительно к массовому обследованию населения на коронавирусную инфекцию можно получить только при использовании методов лабораторной диагностики, среди которых наиболее информативной в настоящее время является методология амплификации нуклеиновых кислот, в том числе ОТ-ПЦР. В этой связи формальное сравнение данных КТ и прочих исследований с результатами ОТ-ПЦР, даже с применением мощного аппарата статистики [Момыналиев, Иванов, 2020], к сожалению, является наиболее частой причиной неверных решений. В целом же, если сравнивать ОТ-ПЦР и прочие способы амплификации нуклеиновых кислот с другими лабораторными методами, применяемыми для установления этиологии, то в любом случае придется признать, что методы амплификации сейчас являются наиболее информативными, поскольку та же детекция появляющихся разных антител к коронавирусу, не уступая ОТ-ПЦР в специфичности, характеризуется существенно меньшей чувствительностью и определяет уже процесс развития иммунитета к вирусу, имея другое предназначение.

Таким образом положительный результат детекции РНК вируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР является одной из основных, но далеко не единственной, составляющей диагноза – коронавирусная инфекция COVID-19. Стандартным подходом к валидации результатов ОТ-ПЦР является определение цикла начала амплификации исследуемого образца в сравнении с величиной порогового цикла (C_t – Cycle threshold). Последний обычно устанавливается производителем тест-систем. Анализ полученных данных осуществляется непосредственно оператором или при помощи специальных программ, например, таких как FRT

Manager (Интерлабсервис, Россия). Возможность анализа полученных данных заложена в программном обеспечении большинства современных термоциклеров (Rotor-Gene Q, CFX96, QuantStudio, DTprime, АНК-32, АНК-М) и может осуществляться в автоматическом режиме. Однако цикл начала амплификации вне зависимости от значений порогового преимущественно определяется исходным количеством матриц, часто обозначаемых как «вирусная нагрузка». Последняя характеристика является одной из наиболее вариативных, поскольку зависит от выбора материала для исследования, процедуры и времени его взятия, длительности хранения и соблюдения правил транспортировки. Одним словом, всего того, что включает в себя понятие «преаналитический этап». Расхожим является мнение о том, что основной причиной ложноотрицательных результатов является недостаточное количество матриц РНК SARS-CoV-2 для амплификации. Соответственно, если предполагать истинную инфекцию, вызванную репродукцией вируса, вероятность отсутствия вирусных геномов у больного стремится к нулю. Указанное находит косвенное подтверждение в одной из работ. В частности, был приведен график, согласно которому детекция РНК коронавируса с помощью ОТ-ПЦР у больных была возможна при исследовании различных образцов как за несколько дней до манифестации заболевания, так и в первую неделю с некоторым снижением к концу третьей недели и более заметным – к концу шестой, но, в любом случае, амплификация имела место [Seturaman et al., 2020].

В одной из статей приводится пример того, как легко ложноположительные результаты переводить в достоверно положительные или, наоборот, просто меняя пороговый цикл с 40 до 37 [Yang et al., 2020]. Вообще, согласно классическому определению, предел детекции – это то минимальное количество аналита, которое может быть детектировано, при этом аналитический сигнал должен быть выше такового, исходящего от отрицательного контроля в три раза. Но должны быть четкие критерии, а в коронавирусной диагностике их можно сказать нет, и к такому выводу приходят авторы одной обзорной аналитической статьи, в которой они попытались оценить соотношение ложноотрицательных результатов в различное время инфекционного процесса и пришли к заключению, что достоверные подсчеты невозможны ввиду большой гетерогенности условий, в которых ОТ-ПЦР проводилась [Kucirka et al., 2020]. Серьезное внимание пороговому циклу, разграничивающему ложноотрицательные результаты от истинно позитивных, уделили другие авторы, указав, что следует в его определении ориентироваться на внутренний

референсный контроль в виде гена «домашнего хозяйства» при ОТ-ПЦР [Zhang et al., 2020].

Ещё более сложным является этап интерпретации результатов ОТ-ПЦР, проводившейся для контроля излеченности от COVID-19, поскольку применяемые в настоящее время модификации не дают возможности дифференцировки выявляемой РНК с позиции её принадлежности к вирусам с инфекционной активностью. Здесь можно заметить, что существуют модификации амплификационных методов, применимые для дифференцировки нуклеиновых кислот «живых» и «неживых» бактерий [Баймиев и др., 2020]. Однако на данном этапе указанная методология применима лишь к прокариотическим микроорганизмам, тогда как вирусы отнесены к неклочным формам жизни.

Наименее изученными являются вопросы, связанные с темпами обновления эпителиальных клеток, содержащих вирусы, к моменту полного выздоровления человека. Это является одной из наиболее частых причин положительных находок ОТ-ПЦР у реконвалесцентов. С формальной точки зрения, обнаружение РНК SARS-CoV-2 является основанием для сохранения диагноза COVID-19, с неформальной – РНК может обнаруживаться до момента полного обновления эпителиальных клеток у переболевшего ввиду невозможности дифференцирования РНК способных к репродукции вирусов и вирусного детрита, не представляющего опасности. Темпы обновления эпителиальных клеток, служивших мишенями для вируса, разнятся в широких пределах в зависимости от возраста, индивидуальных особенностей пациента и даже от курения. В

последнем случае ресурсы клеточного обновления у курильщиков с большим стажем могут быть истощены. Никотин, влияя на симпатическую и парасимпатическую нервную систему, изменяет тонус сосудов и секреторную активность слизистых, ввиду чего повышается сухость слизистых покровов дыхательных путей. При этом увеличивается продолжительность периода обнаружения РНК вирусного детрита.

Как это ни странно, но вероятность обнаружения РНК вирусного детрита, не имеющая диагностического значения, значительно повышается с увеличением чувствительности тест-системы. В этой связи повышение чувствительности должно ограничиваться здравым смыслом. Объективным критерием разумного повышения чувствительности тест-системы может служить инфицирующая доза или минимальная концентрация вируса, достаточная для летального инфицирования культуры клеток или восприимчивых лабораторных животных в эксперименте.

Диагностические тест-системы на SARS-CoV-2 в Российской Федерации

В Российской Федерации разрешено применение 32 различных наборов для детекции РНК нового коронавируса, на которые выданы «Регистрационные удостоверения на медицинские изделия» (РУ). В данной статье мы кратко рассмотрели 25 тест-систем отечественных и зарубежных производителей, в основе которых лежит проведение ОТ-ПЦР (Табл. 1).

Таблица 1.

Разрешенные к применению в Российской Федерации основанные на проведении ОТ-ПЦР диагностические тест-системы для выявления SARS-CoV-2
Table 1 - Approved for use in Russia diagnostic test systems for detecting SARS-CoV-2 based on RT-PCR

Дата / Data	Наименование набора / The name of the kit	Владелец РУ в РФ / Owner	Кол-во мишеней* / Number of targets	Аналитическая чувствительность / Analytical sensitivity
11.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	1 ORF1a	2×10 ³ копий ГЭ*/мл
14.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS/COVID-19 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	1 ORF1a	2×10 ³ копий ГЭ/мл
27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (РеалБест РНК SARS-CoV-2)	АО «Вектор-Бест»	1	1×10 ³ копий ГЭ/мл
27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России	1 RdRp	1×10 ³ - 1×10 ⁴ копий ГЭ/мл

Проблемы диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2

27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией ПОЛИВИР SARS-CoV-2 (Base Express)	ООО НПФ «Литех»	1	1×10^3 1×10^4 копий ГЭ/мл
01.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2 /SARS-CoV)	ООО «ДНК-Технология ТС»	$E(1), E(2), N$	5×10^2 копий ГЭ/мл
03.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-PB-2019-nCov)	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России	1 ORF1ab	1×10^3 копий ГЭ/мл
07.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс Cov-Bat-FL"	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	1	1×10^3 или 1×10^4 копий ГЭ/мл
14.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SARS-CoV-2 -ПЦР»	ООО «МедипалТех»	1	1×10^2 копий ГЭ/мазок
16.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX-SARS-CoV-2 »	ООО «Система-БиоТех»	1	1×10^3 копий ГЭ/мл
21.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции с автоматической экстракцией РНК «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России	?	?
23.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS/COVID-19 методом ПЦР GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45)*	ООО «Авивир»***	3 (RdRp, N, E)	10 копий ГЭ/тест
30.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «COVID-19 OneStep»	ООО «Генотек»	1	1×10^2 копий ГЭ/мл
15.05.2020	Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом ОТ-ПЦР в реальном времени «CoV-2-Тест»	ООО «ТестГен»	1 N	5×10^2 копий ГЭ/мл
26.05.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-COV-2 методом ПЦР	ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера	1	1×10^3 копий ГЭ/мл
29.05.2020	Набор реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»	1	1×10^2 копий ГЭ/мл

	«SARS-CoV-2 FRT»	Минздрава России		
03.06.2020	Набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для диагностики <i>in vitro</i> «SARS-CoV-2 -тест»	ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ	?	?
15.06.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO»	ООО «НекстБио»	2 ORF1a, S	1×10 ³ копий ГЭ/мл
30.06.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2)	ООО «НПФ Синтол»	1	1×10 ³ копий ГЭ/мл
30.06.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2 »	ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	?	?
10.07.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции с автоматической экстракцией РНК «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»	ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	?	?
14.07.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Интифика SARS-CoV-2 »	ООО «Компания Алкор Био»	3 ORF1ab, ORF8, N	1×10 ³ копий ГЭ/мл
05.08.2020	Реагенты в кассете для обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом real-time PCR в мазках из носа, носоглотки и ротоглотки на системе автоматизированной cobas 6800 (cobas SARS-CoV-2)	ООО «Рош Диагностика Рус»****	2 ORF1a, E	17-58 копий/мл 21-73 копии/мл
20.08.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX- SARS-CoV-2»	ООО «Система-БиоТех»	1 3CL ^{pro}	1×10 ³ копий ГЭ/мл
20.08.2020	Набор реагентов для <i>in vitro</i> качественного обнаружения РНК SARS-CoV-2 в образцах мазков из носоглотки Xpert Xpress SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени	ООО «Бекмен Культер»*****	2 N, E	50 копий/мл 200 копий/мл

* - имеются в виду только мишени в виде нового коронавируса SARS-CoV-2 / only targets as the new SARS-CoV-2 coronavirus

** - ГЭ – геном-эквивалент / genome-equivalent

*** - производитель Osang Healthcare Co Ltd. (Южная Корея) / manufacturer Osang Healthcare Co Ltd. (South Korea)

**** - производитель Roche Molecular Systems (США) / manufacturer Roche Molecular Systems (USA)

***** - производитель Cepheid (США) / manufacturer Cepheid (USA)

Как можно видеть из данной таблицы, диагностические тест-системы преимущественно ориентированы на детекцию одной мишени в геноме коронавируса и характеризуются схожей аналитической чувствительностью, обеспечивая детекцию около 1000 копий геном-эквивалента SARS-

CoV-2 в одном мл.⁷ Две тест-системы способны обнаружить приблизительно 500 копий/мл, четыре

⁷ К сожалению, нам неизвестны такие характеристики нескольких наборов, но можно предположить, что

тест-системы позволяют выявить 200 копий/мл. Два зарубежных диагностикума “Xpert Xpress SARS-CoV-2” и “cobas SARS-CoV-2” высокочувствительны и для одной из мишеней гарантируют обнаружение даже 17 копий/мл, но, к сожалению, они являются системами полностью закрытого типа.

Казалось бы, что детекция 100, 500 и даже 1000 копий ГЭ в одном мл обеспечивает высокочувствительную диагностику SARS-CoV-2, обеспечивающую с учетом объемов реакционных смесей обнаружение в них около 20 – 10 копий ГЭ или даже меньшего количества. Однако необходимо заметить, что заявленная аналитическая чувствительность была достигнута самими разработчиками этих тест-систем, имеющих несравненно более высокий уровень профессиональной подготовки, нежели лаборанты на местах. К тому же производители многих наборов отмечают, что они оптимизировали их под несколько моделей ДНК-термоциклеров с оптическим модулем, тогда как последних существует большое разнообразие, что также не способствует унификации результатов. Безусловно, огульно нельзя для всех диагностических лабораторий считать пределы детекции коронавируса «в их руках» значительно увеличенными, но то, что они в целом по стране превышают заявленные, сомнений не вызывает, что, в том числе, ведет к получению ложноотрицательных результатов.

Поскольку РНК SARS-CoV-2 диагностировать в человеческих популяциях еще предстоит довольно долго, то выход из сложившейся ситуации с довольно большим числом неверных тестов, заключается в существенном повышении чувствительности ОТ-ПЦР, способной после ее усовершенствования уверенно выявлять единичные копии РНК нового коронавируса в реакционной смеси ОТ-ПЦР, а также в обязательном использовании в каждом исследовании набора необходимых контролей – контроля выделения РНК, контроля прохождения обратной транскрипции и амплификации, для исключения ошибок, связанных с забором, транспортированием проб и выделением РНК из них.

Цифровая ПЦР для диагностики коронавирусов

Выявление единичных копий мишеней, включая их точную количественную оценку (что весьма важно), производится с помощью цифровой ПЦР и эта технология для SARS-CoV-2 довольно активно используется и уже опубликовано большое число работ, подчеркивающих ее преимущество при работе с образцами, характеризующимися низкой

имей они лучшую чувствительность, об этом было бы широко известно.

вирусной нагрузкой. Так, сообщается, что цифровая монокапельная ПЦР, проведенная в приборе QX200 Droplet Digital PCR System фирмы Bio-Rad Laboratories (США), позволила детектировать коронавирус у пациентов с негативным диагнозом, полученным с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени [Alteri et al., 2020]. В одной работе показано, что для 63 обследованных пациентов с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени был получен лишь 21 позитивный тест, тогда как при проведении цифровой монокапельной ПЦР таковых оказалось уже 49 [Suo et al., 2020]. Сравнение аналитической чувствительности ОТ-ПЦР в реальном времени и цифрового варианта этой реакции с использованием 8 комплектов праймеров с гибридизационными пробами показало значительное превосходство последней [Liu et al., 2020a]. В одной из работ сообщено, что цифровая монокапельная ОТ-ПЦР способна осуществлять детекцию SARS-CoV-2 в грубых лизатах, не прибегая к выделению РНК [Vasudevan et al., 2020]. При анализе выписанных из больницы 18 пациентов, излечившихся от COVID-19 и негативных по данным ОТ-ПЦР в реальном времени, 12 оказались позитивными при использовании цифровой монокапельной ПЦР, причем в этой работе использовалась другая модель Droplet Digital PCR System производства китайской фирмы Pilot Gene Technologies [Liu et al., 2020a].

Однако серьезным недостатком цифровой ПЦР служит высокая стоимость подобных ДНК-термоциклеров, приблизительно на порядок превышающая таковую для приборов, обеспечивающих контроль за наработкой ампликонов в режиме реального времени. Таким образом, цифровая ПЦР для массовой диагностики мало приемлема притом, что детекция SARS-CoV-2 ведется очень интенсивно и пока ей «конца-края» не видно.

Геномные мутации нового коронавируса и ОТ-ПЦР диагностика

Несмотря на то, что коронавирусы обладают в своем реплицирующем механизме редактирующей активностью, снижающей число замен, тем не менее, таковые происходят, и в одной из работ была оценена скорость мутаций, составившая приблизительно от 1,19 до $1,31 \times 10^{-3}$ замен на сайт в год [Li et al., 2020]. По всему миру активно ведется секвенирование полных геномов SARS-CoV-2, и по состоянию на начало декабря 2020 г. в базу данных GISAID 123 странами внесены полные геномные последовательности почти 250 тысяч изолятов нового коронавируса. Лидером по числу секвенированных геномов SARS-CoV-2 является Великобритания (112194 генома) и за ней с довольно большим отрывом располагаются еще несколько десятков

стран, в которых секвенированы тысячи и сотни геномов - США (45662), Австралия (14587), Дания (11726), Испания (5251), Канада (3373), Индия (3346), Швейцария (3301), Нидерланды (3099), Франция (2368), Южная Африка (2337), Бельгия (1657), Португалия (1578), КНР (1470), Сингапур (1425), Япония (1128), Швеция (1053), Новая Зеландия (983), Бразилия (965), Россия (964), Италия (951), Саудовская Аравия (898), Ирландия (865), Южная Корея (843), Германия (791), Австрия (719), Норвегия (633), Исландия (505), Израиль (462), Бангладеш (408), Польша (392), Перу (385) и др.

Конечно же, секвенирование полных геномов вируса не является самоцелью, а необходимо для отслеживания появляющихся *de novo* мутаций, которые могут оказывать влияние и на детекцию вируса SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР, поскольку подобранные праймеры по ранее известным последовательностям (считавшимися в тот момент консервативными) могут перестать работать на новых штаммах, в том числе вытесняющих старые, причем известно, что это имеет место быть. Это уже произошло с европейской мутацией D614G. Сейчас у SARS-CoV-2 новая английская мутация N501Y становится превалирующей ввиду большей контагиозности такого вируса [Leung et al., 2021]. В целом известно более 22 тысяч вариаций в геноме SARS-CoV-2, размер которого всего около 29900 нуклеотидов. Однако большинство мутаций носят единичный характер и в популяции вирусов не закрепляются, лишь около двух десятков мутаций можно считать мажорными или условно мажорными. Считается, что изоляты SARS-CoV-2 отличаются один от другого приблизительно 3 - 30 заменами, что составляет меньше 0,1% от всего генома.

В целом ряде статей прямо в заголовки вынесены замеченные в нескольких странах возникающие проблемы с ОТ-ПЦР детекций из-за встречающихся с разной частотой мутаций в геноме вируса, приходящихся или на места отжига праймеров или гибридизационных зондов [Kuchinski et al., 2020; Rana, Pokhrel, 2020; Vanaerschot et al., 2020; Ziegler et al., 2020]. При этом довольно значительная часть мутаций приходится на ген нуклеокапсидного белка N, вследствие чего некоторые праймеро-зондовые системы при диагностике SARS-CoV-2 дают сбой. Немалое число мутаций, негативно влияющих на ОТ-ПЦР амплификацию локализованы и в других генах-мишенях, в частности в генах RdRp и E [Artesi et al., 2020; Kuchinski et al., 2020; Rana, Pokhrel, 2020]. Еще одними авторами был проведен анализ комплектов праймеров и зондов к ним, еще в начале пандемии рекомендованных для детекции SARS-CoV-2 ВОЗ, CDC (США), NMDC (КНР) и ряда других организаций, показавший, что практически во всех

мишенях произошли мутации, по крайней мере ухудшающие протекание ОТ-ПЦР или даже делающие эту реакцию невозможной [Peñarrubia et al., 2020]. Так, в частности, для одной из мишеней из набора CDC нежелательная мутация в гене N встречается в более чем 1% случаев, а в наборе NMDC такая нежелательная мутация также в гене N обнаруживается у почти четверти образцов. В одной из недавних работ был проведен анализ широко используемых в настоящее время для диагностики коронавируса 132 праймеров и гибридизационных зондов к ним и обнаружено, что 5862 известные мутации по крайней по одной приходятся на эти участки генома вируса [Jain et al., 2021]. При этом в данной статье сообщается, что удалось выявить 286 участков вирусного генома, длиной 20 и более нуклеотидов, характеризующихся низкой вариабельностью, что позволяет их рассматривать в качестве потенциальных мишеней.

В целом ситуация складывается так, что в обязательном порядке мишени в диагностических наборах и системы праймеров и зондов к ним должны периодически пересматриваться с учетом данных полногеномного секвенирования кДНК SARS-CoV-2. Необходимо использовать мультиплексные (на несколько наиболее консервативных участков разных генов) системы детекции РНК SARS-CoV-2, вызывающей COVID-19.

Заключение

Завершая рассмотрение проблемных моментов ОТ-ПЦР диагностики новой коронавирусной инфекции, нельзя отделаться от мысли, что есть некоторая нестыковка большого процента ложноотрицательных результатов при диагностике SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР с вирусной нагрузкой у человека, достигающей, как уже говорилось выше, в пике 10^9 - 10^{11} вирионов во всем организме, из которых на верхние дыхательные пути и ротовую полость приходится до 10^8 вирусных частиц. Так где же «зарыта собака», или точнее новый коронавирус? Возможно, при ОТ-ПЦР диагностике РНК SARS-CoV-2 мы имеем дело с некими системными ошибками, связанными с недостаточной чувствительностью одних тест-систем и более высокой других, включая неодинаковую работу лаборантов и применение отличающихся расходных материалов, а также использование или неиспользование автоматических экстракторов РНК вкупе с оптимизированными или не очень подходящими ДНК-термоциклерами.

Для подтверждения этого стоит обратить внимание на еще одну краткую заметку, в которой сравнивалась эффективность детекции коронавирусной РНК в слюне и в носоглоточных

мазках, совпавшую на 97,4% [Iwasaki et al., 2002]. Но в данном контексте эта публикация интересна другим. Так, в ней сообщается, что при анализе больных COVID-19 в пробах слюны в течение двух недель после излечения детектировался вирус (возможно, его исключительно неактивная форма или некие обломки РНК - неважно). После двух недель проводимые тесты оказывались уже отрицательными. При этом авторы замечают, что пробы слюны переставали быть положительными по сравнению с носоглоточными мазками раньше. И в этом нет ничего странного. Удивительно другое. Почему же в других исследованиях у только болеющих и даже у болеющих COVID-19, неважно, на какой стадии людей не всегда удается выявить наличие РНК SARS-CoV-2? Ведь диагностируют не инфекционно способный вирус, а присутствие молекул РНК, которые должны генерироваться постоянно при размножении и затухании размножения вируса, в том числе во время фазы болезни. Конечно, можно допустить, что все люди в этом исследовании (66 человек) излечились и все частицы вируса в них, перестав размножаться, стали массово разрушаться, и только поэтому их остатки стали накапливаться в слюне и носоглоточных мазках в большем количестве. Но так ли это на самом деле? Причем ведь это не единичные случаи постковидной детекции SARS-CoV-2, а они имеют место по всему миру. А как расценить результаты другой группы авторов, показавших, что у значительной части людей (152 из 405), уже излечившихся от COVID-19 (протекавшего в мягкой форме) или перенесших его бессимптомно, после отрицательного теста через сутки наблюдался положительный [Kim et al., 2020]. Неужели так резко меняется динамика разрушения коронавируса? Причем у большого числа людей одинаково. Верится в это с трудом. Наверное, «виновата» в таких нестыкующихся результатах все же ОТ-ПЦР диагностика, под которой нужно понимать разные стадии этого процесса.

С коронавирусом SARS-CoV-2, по всей видимости, нам придется жить ещё долго. А потому вопросы, связанные с чувствительностью и специфичностью наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2, разработкой документов, регламентирующих стандартные операционные процедуры (СОПы), создание и внедрение новых технологий, лабораторного оборудования и расходных материалов, в том числе ориентированных на автоматизацию одного из наиболее сложных и значимых этапов диагностического процесса, ещё долго будут оставаться актуальными. Предпосылки для их успешного решения, как это было показано на примере увеличения количества мишеней в тесте на РНК SARS-CoV-2, детектируемых с помощью

усиливающего сигнал одинакового флуорохрома, имеются.

Литература

1. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р., Швец К.Ю., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Мавзютов А.Р., Иваненков Я.А., Чемерис А.В. Современные подходы к дифференциации живых и мертвых микроорганизмов путем избирательной амплификации их нуклеиновых кислот // Микробиология. 2020. Т.89(1). С. 17-33. DOI: 10.31857/S0026365620010036
2. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // Биомика. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7
3. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Мифтахов И.Ю., Халикова Е.Ю., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирус SARS-CoV-2, его геном, разнообразие генотипов и молекулярно-биологические меры борьбы с ним // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15
4. Момыналиев К.Т., Иванов И.В. О природе ложноотрицательных результатов при выявлении коронавируса SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот // Вестник Росздравнадзора. 2020. N.2. С.11-19. DOI: 10.35576/2070-7940-2020-2-11-19
5. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2012. Т. 8. С. 34-45.
6. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012. Т. 4. № 1. С. 31-47.
7. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
8. Abe T., Ikeda T., Tokuda Y., Ito J., Suzuki Y., Narahara C., Iriyama H., Sato K. A patient infected with SARS-CoV-2 over 100 days // QJM. 2020. doi: 10.1093/qjmed/hcaa296

9. Alcoba-Florez J., González-Montelongo R., Íñigo-Campos A., de Artola D.G., Gil-Campesino H., The Microbiology Technical Support Team, Ciuffreda L., Valenzuela-Fernández A, Flores C. Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 97. P. 66-68. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.099
10. Alteri C., Cento V., Antonello M., Colagrossi L., Merli M., Ughi N., Renica S., Matarazzo E., Di Ruscio F., Tartaglione L., Colombo J., Grimaldi C., Carta S., Nava A., Costabile V., Baiguera C., Campisi D., Fanti D, Vismara C., Fumagalli R., Scaglione F., Epis O.M., Puoti M., Perno C.F. Detection and quantification of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR in real-time PCR negative nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients // *PLoS One.* 2020. V. 15(9):e0236311. doi: 10.1371/journal.pone.0236311
11. Arora R., Goel R., Kumar S., Chhabra M., Saxena S., Manchanda V., Pumma P. Evaluation of SARS-CoV-2 in Tears of Patients with Moderate to Severe COVID-19 // *Ophthalmology.* 2020. S0161-6420(20)30847-2. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.08.029
12. Artesi M., Bontems S., Göbbels P, Franckh M., Maes P., Boreux R., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Bours V., Durkin K. A Recurrent Mutation at Position 26340 of SARS-CoV-2 Is Associated with Failure of the E Gene Quantitative Reverse Transcription-PCR Utilized in a Commercial Dual-Target Diagnostic Assay // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01598-20. doi: 10.1128/JCM.01598-20
13. Baldacci S., Giannico O.V., Giorgino A., Buccoliero G.B., Desiante F., Fragnelli G.R., Rizzi R., Loconsole D., Centrone F., Chironna M., Conversano M. 63 days detection of SARS-CoV-2 RNA from a recovered patient in Southern Italy: A Case Report // *Ann. Ig.* 2020. V. 32(5). P. 590-592. doi: 10.7416/ai.2020.2378
14. Barra G.B., Santa Rita T.H., Mesquita P.G., Jácomo R.H., Nery L.F.A. Analytical Sensitivity and Specificity of Two RT-qPCR Protocols for SARS-CoV-2 Detection Performed in an Automated Workflow // *Genes. (Basel).* 2020. V. 11(10):1183. doi: 10.3390/genes11101183
15. Becker M. G., Taylor T., Kiazay, S., Cabiles D. R., Meyers A. F., Sandstrom P. A. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert® system using the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay // *PLoS One.* 2020. V.15 (11):e0241959. doi.org/10.1371/journal.pone.0241959
16. Bruijns B. B., Tiggelaar R. M., Gardeniers H. The Extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different Types of Swabs // *J. Forensic Sci.* 2018. V. 63 (5). P. 1492-1499. doi.org/10.1111/1556-4029.13837
17. Butler J.M. Fundamentals of forensic DNA typing // Amsterdam, Academic Press/Elsevier. 2010. 500 P.
18. Chan R.W.Y., Chan K.C., Chan K.Y.Y., Lui G.C.Y., Tsun J.G.S., Wong R.Y.K., Yu M.W.L., Wang M.H.T., Chan P.K.S., Lam H.S., Li A.M. SARS-CoV-2 detection by nasal strips: a superior tool for surveillance of pediatric population // *J. Infect.* 2020. S0163-4453(20)30704-0. doi: 10.1016/j.jinf.2020.11.009
19. Dust K., Hedley A., Nichol, K., Stein D., Adam H., Karlowsky J. A., Bullard J., Van Caesele P., Alexander D. C. Comparison of commercial assays and laboratory developed tests for detection of SARS-CoV-2 // *J. Virol. Methods.* 2020. V. 285. 113970. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113970
20. Freire-Paspuel B., Garcia-Bereguain M. A. Analytical sensitivity and clinical performance of a triplex RT-qPCR assay using CDC N1, N2, and RP targets for SARS-CoV-2 diagnosis // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 102. P 14-16. doi: org/10.1016/j.ijid.2020.10.047
21. Fukumoto, T., Iwasaki, S., Fujisawa, S., Hayasaka, K., Sato, K., Oguri, S., Taki K., Nakakubo S., Kamada K., Yamashita Y., Konno S., Nishida M., Sugita J., Teshima T. Efficacy of a novel SARS-CoV-2 detection kit without RNA extraction and purification // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 98. P. 16-17. doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.074
22. Garg A., Ghosha U., Patel S. S., Singh D. V., Arya A. K., Vasanth S., Pandey A., Srivastava N.. Evaluation of seven commercial RT - PCR kits for COVID - 19 testing in pooled clinical specimens // *J. Med. Virol.* 2020. doi: 10.1002/jmv.26691
23. Haddar C., Verhoeven P. O., Bourlet T., Pozzetto B., Pillet, S. Brief comparative evaluation of six open one-step RT-qPCR mastermixes for the detection of SARS-CoV-2 RNA using a Taqman probe // *J. Clin. Virol.* 2020. 132. P. 104636. 10.1016/j.jcv.2020.104636
24. Iwasaki S., Fujisawa S., Nakakubo S., Kamada K., Yamashita Y., Fukumoto T., Sato K., Oguri S., Taki K., Senjo H., Sugita J., Hayasaka K., Konno S., Nishida M., Teshima T. J Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva // *Journal of Infection.* 2020. V. 81(2):e145-e147. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.071
25. Jacot D., Greub G., Jatou K., Opota O. Viral load of SARS-CoV-2 across patients and compared to other respiratory viruses // *Microbes Infect.* 2020. V. 22 (10). P. 617-621. doi.org/10.1016/j.micinf.2020.08.004
26. Jain A., Rophina M., Mahajan S., Krishnan B.B., Sharma M., Mandal S., Fernandez T., Sultanji S., Jolly B., Mathew .S, Sivasubbu S., Scaria V. Analysis of the potential impact of genomic variants in global SARS-CoV-2 genomes on molecular diagnostic assays // *Int. J.*

- Infect. Dis. 2020. V. 102. P. 460-462. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.086
27. Kandel C., Zheng J., McCready J., Serbanescu M.A., Racher H., Desaulnier M., Powis J.E., Vojdani K., Finlay L., Sheldrake E., Vermeiren C., Katz K, McGeer A, Kozak R, Goneau LW. Detection of SARS-CoV-2 from Saliva as Compared to Nasopharyngeal Swabs in Outpatients // *Viruses*. 2020. V. 12(11):1314. doi: 10.3390/v12111314
28. Kandetu T.B., Dziuban E.J., Sikuvi K., Beard R.S., Nghihpa R., van Rooyen G., Shiningavamwe A., Katjita I. Persistence of positive RT-PCR results for over 70 days in two travelers with COVID-19 // *Disaster Med Public Health Prep*. 2020. 1-7. doi: 10.1017/dmp.2020.450
29. Kim S.M., Hwang Y.J., Kwak Y. Prolonged SARS-CoV-2 detection and reversed RT-PCR results in mild or asymptomatic patients // *Infect. Dis. (Lond)*. 2020. doi: 10.1080/23744235.2020.1820076
30. Kim S.Y., Lee J., Sung H., Lee H., Han M.G., Yoo C.K., Lee S.W., Hong K. H. Pooling Upper Respiratory Specimens for Rapid Mass Screening of COVID-19 by Real-Time RT-PCR // *Emerg. Infect. Dis*. 2020a. V. 26 (10). P. 2469-2472. doi: 10.3201/eid2610.201955
31. Kuchinski K.S., Jassem A.N., Prystajecy N.A. Assessing oligonucleotide designs from early lab developed PCR diagnostic tests for SARS-CoV-2 using the PCR_strainer pipeline // *J. Clin. Virol*. 2020. V. 131:104581. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104581
32. Kucirka L.M., Lauer S.A., Laeyendecker O., Boon D., Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure // *Ann. Intern. Med*. 2020. V. 173(4). P. 262-267. doi: 10.7326/M20-1495
33. Kudo E., Israelow B., Vogels C. B., Lu P., Wyllie A. L., Tokuyama M., Venkataraman A., Brackney D.E., Ott I.M., Petrone M.E., Earnest R., Lapidus S., Muenker M.C., Moore A.J, Casanovas-Massana A., Omer S.B., Dela Cruz C.S., Farhadian S.F., Ko A.I., Grubaugh N.D., Iwasaki A. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR // *PLoS Biology*. 2020. V. 18(10). e3000867. doi: 10.1371/journal.pbio.3000867
34. Lampl B. M., Salzberger B. Changing epidemiology of COVID-19 // *GMS. Hyg. Infect. Control*. 2020. V.15. doi: 10.3205/dgkh000362
35. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020 // *Euro Surveill*. 2021. V.26(1). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106
36. Li X., Zai J., Zhao Q, Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2 // *J. Med. Virol*. 2020. V. 92(6). P. 602-611. doi: 10.1002/jmv.25731
37. Li, Y., Yan L.M., Wan L., Xiang T.X., Le A., Liu J.M., PeirisM., PoonL. L.M., ZhangW. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19 // *Lancet Infect. Dis*. 2020a. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2
38. Liotti F. M., Menchinelli G., Marchetti S., Morandotti G. A., Sanguinetti M., Posteraro B., Cattani, P. Evaluating the newly developed BioFire COVID-19 test for SARS-CoV-2 molecular detection // *Clin. Microbiol. Infect*. 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.026
39. Liu C., Shi Q., Peng M., Lu R., Li H., Cai Y., Chen J., Xu J., Shen B. Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 Virus in discharged COVID-19 patients // *Aging (Albany NY)*. 2020. V 12(21). P. 20997-21003. doi:10.18632/aging.104020
40. Liu M., Li Q., Zhou J., Ai W., Zheng X., Zeng J., Liu Y., Xiang X., Guo R., Li X., Wu X., Xu H., Jiang L., Zhang H., Chen J., Tian L., Luo J., Luo C. Value of swab types and collection time on SARS-COV-2 detection using RT-PCR assay // *J. Virol. Methods*. 2020. 286:113974. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113974
41. Liu X., Feng J., Zhang Q., Guo D., Zhang L., Suo T., Hu W, Guo M., Wang X., Huang Z., Xiong Y., Chen G., Chen Y., Lan K. Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets // *Emerg. Microbes Infect*. 2020a. V. 9(1). P. 1175-1179. doi: 10.1080/22221751.2020.1772679
42. Lübke N., Senff T., Scherger S., Hauka S., Andrée M., Adams O., Timm J., Walker A. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials // *J. Clin. Virol*. 2020. V. 130. P.104579. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104579
43. Mancini F., Barbanti F., Scaturro M., Errico G., Iacobino A., Bella A., Riccardo F., Marsili G., Stefanelli P., Pezzotti P., Rezza G., Ciervo A. Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing // *Emerg. Microbes Infect*. 2020. V. (1). P. 1393-1396. doi: 10.1080/22221751.2020.1775500
44. Mancini F., Barbanti F., Scaturro M., Fontana S., Di Martino A., Marsili G., Puzelli S., Calzoletti L., Facchini M., Di Mario G., Fabiani C., Bella A., RiccardoF., PezzottiP., StefanelliP., RezzaG., Ciervo A. Multiplex rt-Real Time PCR assays for diagnostic testing of SARS-CoV-2 and seasonal influenza viruses. A challenge of the phase 3 pandemic setting // *J. Infect. Dis*. 2020. doi: org/10.1093/infdis/jiaa658
45. Mavziutov A.R., Bondarenko V.M., Latkin A.T. Inhibitors of the Polymerase Chain Reaction // *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2003. № 3. C. 93-98

46. Medeiros da Silva R.C., Nogueira Marinho L.C., de Araújo Silva D.N., Costa de Lima K., Pirih F.Q., Luz de Aquino Martins A.R. Saliva as a possible tool for the SARS-CoV-2 detection: A review // *Travel Med. Infect. Dis.* 2020. 38:101920. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101920
47. Molina L.P., Chow S.K., Nickel A., Love J.E. Prolonged Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in an Obstetric Patient With Antibody Seroconversion // *Obstet. Gynecol.* 2020. V. 136(4). P. 838-841. doi: 10.1097/AOG.0000000000004086
48. Moore N. M., Li H., Schejbal D., Lindsley J., Hayden M. K. Comparison of two commercial molecular tests and a laboratory-developed modification of the CDC 2019-nCoV reverse transcriptase PCR assay for the detection of SARS-CoV-2 // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(8):e00938-20. doi: 10.1128/JCM.00938-20
49. Moreno-Contreras J., Espinoza M.A., Sandoval-Jaime C., Cantú-Cuevas M.A., Barón-Olivares H., Ortiz-Orozco O.D., Muñoz-Rangel A.V., Hernández-de la Cruz M., Eroza-Osorio C.M., Arias C.F., López S. Saliva Sampling and Its Direct Lysis, an Excellent Option To Increase the Number of SARS-CoV-2 Diagnostic Tests in Settings with Supply Shortages // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01659-20. doi: 10.1128/JCM.01659-20
50. Munblit D., Nekliudov N.A., Bugaeva P., Blyuss O., Kislova M., Listovskaya E., Gamirova A., Shikhaleva A., Belyaev V., Timashev P., Yavorovskiy A., Bulanova E., Tsareva N., Avdeev S., Kapustina V.A., Pigolkin Y.I., Dankwa E.A., Kartsonaki C., Pritchard M.G., Fomin V., Svistunov A.A., Butnaru D., Glybochko P. StopCOVID cohort: An observational study of 3,480 patients admitted to the Sechenov University hospital network in Moscow city for suspected COVID-19 infection // *Clin. Infect. Dis.* 2020. doi.org/10.1093/cid/ciaa1535
51. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., Meade-White K., Okumura A., Callison J., Brumbaugh B., Avanzato V.A., Rosenke R., Hanley P.W., Saturday G., Scott D., Fischer E.R., de Wit E. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 // *Nature.* 2020 Sep;585(7824):268-272. doi: 10.1038/s41586-020-2324-7
52. Pan Y., Long L., Zhang D., Yuan T., Cui S., Yang P., Wang Q., Ren S. Potential False-Negative Nucleic Acid Testing Results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Thermal Inactivation of Samples with Low Viral Loads // *Clin. Chem.* V. 202066(6). P. 794-801. doi:10.1093/clinchem/hvaa091
53. Peñarrubia L., Ruiz M., Porco R., Rao S.N., Juanola-Falgarona M., Manissero D., López-Fontanals M., Pareja J. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 97:225-229. doi:10.1016/j.ijid.2020.06.027
54. Radbel J., Jagpal S., Roy J., Brooks A., Tischfield J., Sheldon M., Bixby C., Witt D., Gennaro M.L., Horton D.B., Barrett E.S., Carson J.L., Panettieri R.A. Jr., Blaser M.J. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Is Comparable in Clinical Samples Preserved in Saline or Viral Transport Medium // *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(7). P. 871-875. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.04.209
55. Rana D.R., Pokhrel N. Sequence mismatch in PCR probes may mask the COVID-19 detection in Nepal // *Mol. Cell Probes.* 2020. V. 53:101599. doi:10.1016/j.mcp.2020.101599
56. Ransom E.M., Potter R.F., Wallace M.A., Mitchell K.F., Yarbrough M.L., Burnham C.A., Anderson N.W., Parikh B.A. Comparison of Extraction Methods and Thermocyclers for SARS-CoV-2 Molecular Detection Using Clinical Specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01622-20. doi: 10.1128/JCM.01622-20
57. Riediker M., Tsai D.H. Estimation of Viral Aerosol Emissions From Simulated Individuals With Asymptomatic to Moderate Coronavirus Disease 2019 // *JAMA Netw. Open.* 2020. V. 3(7):e2013807. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.13807
58. Rockx B, Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., de Meulder D., van Amerongen G., van den Brand J., Okba N.M.A., Schipper D., van Run P., Leijten L., Sikkema R., Verschoor E., Verstrepen B., Bogers W., Langermans J., Drosten C., Fentener van Vlissingen M., Fouchier R., de Swart R., Koopmans M., Haagmans B.L. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model // *Science.* 2020. V.368 (6494). P. 1012-1015. doi:10.1126/science.abb7314
59. Ryan D. J., Toomey S., Madden S. F., Casey M., Breathnach O. S., Morris P. G., Grogan L., Branagan P., Costello R.W., De Barra E., Hurley K., Gunaratnam C., McElvaney N.G., O'Brien M.E., Sulaiman I., Morgan R.K., Hennessy B.T. Use of exhaled breath condensate (EBC) in the diagnosis of SARS-COV-2 (COVID-19) // *Thorax.* 2020. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215705
60. Sawano M., Takeshita K., Ohno H., Oka H. A short perspective on a COVID-19 clinical study: 'diagnosis of COVID-19 by RT-PCR using exhale breath condensate samples' // *J. Breath Res.* 2020. V.14(4). 042003. doi:10.1088/1752-7163/abb99b
61. Sahajpal N.S., Mondal A.K., Njau A., Ananth S., Jones K., Ahluwalia P.K., Ahluwalia M., Jilani Y., Chaubey A., Hegde M., Kota V., Rojjiani A., Kolhe R. Proposal of RT-PCR-Based Mass Population Screening for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

- (Coronavirus Disease 2019) // *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(10). P. 1294-1299. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.07.001
62. Sakanashi D, Asai N, Nakamura A, Miyazaki N, Kawamoto Y, Ohno T, Yamada A, Koita I, Suematsu H, Hagihara M, Shiota A, Kurumiya A, Sakata M, Kato S, Muramatsu Y, Koizumi Y, Kishino T, Ohashi W, Yamagishi Y, Mikamo H. Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19 // *J. Infect. Chemother.* 2021. V. 27(1). P. 126-129. doi: 10.1016/j.jiac.2020.09.027
63. Sender R, Bar-On YM, Flamholz A, Gleizer S, Bernsthein B, Phillips R, Milo R. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions in an infected person // medRxiv. 2020. doi: 10.1101/2020.11.16.20232009
64. Sethuraman N., Jeremiah S.S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 // *JAMA.* 2020. V. 323(22). P. 2249-2251. doi: 10.1001/jama.2020.8259
65. Smith, E., Zhen, W., Manji, R., Schron, D., Duong, S., & Berry, G. J. (2020). Analytical and Clinical Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for SARS-CoV-2 Detection // *J Clin Microbiol.* 2020. V. 58(9):e01134-20. doi: 10.1128/JCM.01134-20
66. Srivatsan S., Han P. D., van Raay, K., Wolf C. R., McCulloch D. J., Kim A. E., Brandstetter E., Martin B., Gehring J., Chen W., Kosuri S., Konnick E. Q., Lockwood C. M., Rieder M. J., Nickerson D. A., Chu Y., Shendure J., Starita L. M. Preliminary support for a “dry swab, extraction free” protocol for SARS-CoV-2 testing via RT-qPCR // bioRxiv.2020. doi: 10.1101/2020.04.22.056283
67. Suo T., Liu X., Feng J., Guo M., Hu W., Guo D., Ullah H., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Huang Z., Deng L., Chen T., Liu F., Xu K., Liu Y., Zhang Q., Liu Y., Xiong Y., Chen G., Lan K., Chen Y. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1080/22221751.2020.1772678
68. Trypsteen W., Van Cleemput J., Snippenberg W.V., Gerlo S., Vandekerckhove L. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review // *PLoS Pathog.* 2020. V. 16(10):e1009037. doi: 10.1371/journal.ppat.1009037
69. Ulloa S., Bravo C., Parra B., Ramirez E., Acevedo A., Fauce R., Fernandez J. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit // *J. Virol. Methods.* 2020. V. 285. 113960. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113960
70. Uwamino Y., Nagata M., Aoki W., Fujimori Y, Nakagawa T., Yokota H., Sakai-Tagawa Y., Iwatsuki-Horimoto K., Shiraki T., Uchida S., Uno S., Kabata H., Ikemura S., Kamata H., Ishii M., Fukunaga K., Kawaoka Y., Hasegawa N., Murata M. Accuracy and stability of saliva as a sample for reverse transcription PCR detection of SARS-CoV-2 // *J. Clin. Pathol.* 2020. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206972
71. Vanaerschot M., Mann S.A., Webber J.T., Kamm J., Bell S.M., Bell J., Hong S.N., Nguyen M.P., Chan L.Y., Bhatt K.D., Tan M., Detweiler A.M., Espinosa A., Wu W., Batson J., Dynerman D., Wadford D.A., Puschnik A.S., Neff N., Ah Yong V., Miller S., Ayscue P., Tato C.M., Paul S., Kistler A.L., DeRisi J.L., Crawford E.D. Identification of a Polymorphism in the N Gene of SARS-CoV-2 That Adversely Impacts Detection by Reverse Transcription-PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 59(1):e02369-20. doi:10.1128/JCM.02369-20
72. Vasudevan H., Xu P., Servellita V., Miller S., Liu L., Gopez A., Chiu C.Y., Abate A.R. Digital droplet PCR accurately quantifies SARS-CoV-2 viral load from crude lysate without nucleic acid purification // medRxiv [Preprint]. 2020. doi: 10.1101/2020.09.02.20186023
73. Waked R., Makhoul J., Saliba G., Chehata N., Mortada S., Zoghbi A., Choucair J., Haddad E. Are two consecutive negative RT-PCR results enough to rule out COVID-19? // *New Microbes New Infect.* 2020. 37:100750. doi:10.1016/j.nmni.2020.100750
74. Wang Y., Song W., Zhao Z., Chen P., Liu J., Li C. The impacts of viral inactivating methods on quantitative RT-PCR for COVID-19 // *Virus Res.* 2020. 285:197988. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197988
75. Williamson BN, Feldmann F, Schwarz B, Meade-White K, Porter DP, Schulz J, van Doremalen N, Leighton I, Kwe Yinda C, Pérez-Pérez L, Okumura A, Lovaglio J, Hanley PW, Saturday G, Bosio CM, Anzick S, Barbian K, Cihlar T, Martens C, Scott DP, Munster VJ, de Wit E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2 // bioRxiv. 2020 Apr 22:2020.04.15.043166. doi: 10.1101/2020.04.15.043166
76. Yang S., Stanzione N., Uslan D.Z., Garner O.B., de St Maurice A. Clinical and Epidemiologic Evaluation of Inconclusive COVID-19 PCR Results Using a Quantitative Algorithm // *Am. J. Clin. Pathol.* 2020. 4:aqa251. doi: 10.1093/ajcp/aqa251
77. Yee R., Truong T., Pannaraj P.S., Eubanks N., Gai E., Jumarang J., Turner L., Peralta A., Lee Y., Dien Bard J. Saliva is a Promising Alternative Specimen for the Detection of SARS-CoV-2 in Children and Adults // *J. Clin. Microbiol.* 2020. doi: 10.1128/JCM.02686-20
78. Zhang Y., Wang C., Han M., Ye J., Gao Y., Liu Z., He T., Li T., Xu M., Zhou J., Zou G., Lu M., Zhang Z. Discrimination of False Negative Results in RT-PCR Detection of SARS-CoV-2 RNAs in Clinical Specimens by Using an Internal Reference // *Virol Sin.* 2020. doi: 10.1007/s12250-020-00273-8
79. Zhen W., Berry G. J. Development of a New Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

Detection // *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(12). P. 1367-1372. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.09.004

80. Ziegler K., Steininger P., Ziegler R., Steinmann J., Korn K., Ensser A. SARS-CoV-2 samples may escape detection because of a single point mutation in the N gene // *Euro Surveill.* 2020. V. 25(39):2001650. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.39.2001650

References

1. Abe T., Ikeda T., Tokuda Y., Ito J., Suzuki Y., Narahara C., Iriyama H., Sato K. A patient infected with SARS-CoV-2 over 100 days. *QJM.* 2020. doi: 10.1093/qjmed/hcaa296

2. Alcoba-Florez J., González-Montelongo R., Íñigo-Campos A., de Artola D.G., Gil-Campesino H., The Microbiology Technical Support Team, Ciuffreda L., Valenzuela-Fernández A, Flores C. Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples. *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 97. P. 66-68. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.099

3. Alteri C., Cento V., Antonello M., Colagrossi L., Merli M., Ughi N., Renica S., Matarazzo E., Di Ruscio F., Tartaglione L., Colombo J., Grimaldi C., Carta S., Nava A., Costabile V., Baiguera C., Campisi D., Fanti D, Vismara C., Fumagalli R., Scaglione F., Epis O.M., Puoti M., Perno C.F. Detection and quantification of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR in real-time PCR negative nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients. *PLoS One.* 2020. V. 15(9):e0236311. doi: 10.1371/journal.pone.0236311

4. Arora R., Goel R., Kumar S., Chhabra M., Saxena S., Manchanda V., Pumma P. Evaluation of SARS-CoV-2 in Tears of Patients with Moderate to Severe COVID-19. *Ophthalmology.* 2020. S0161-6420(20)30847-2. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.08.029

5. Artesi M., Bontems S., Göbbels P, Franckh M., Maes P., Boreux R., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Bours V., Durkin K. A Recurrent Mutation at Position 26340 of SARS-CoV-2 Is Associated with Failure of the E Gene Quantitative Reverse Transcription-PCR Utilized in a Commercial Dual-Target Diagnostic Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01598-20. doi: 10.1128/JCM.01598-20

6. Baldacci S., Giannico O.V., Giorgino A., Buccoliero G.B., Desiante F., Fragnelli G.R., Rizzi R., Loconsole D., Centrone F., Chironna M., Conversano M. 63 days detection of SARS-CoV-2 RNA from a recovered patient in Southern Italy: A Case Report. *Ann. Ig.* 2020. V. 32(5). P. 590-592. doi: 10.7416/ai.2020.2378

7. Barra G.B., Santa Rita T.H., Mesquita P.G., Jácomo R.H., Nery L.F.A. Analytical Sensitivity and Specificity of Two RT-qPCR Protocols for SARS-CoV-2 Detection Performed in an Automated Workflow.

Genes. (Basel). 2020. V. 11(10):1183. doi: 10.3390/genes11101183

8. Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Kuluev B.R., Shvets K.Yu., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Zubov V.V., Alekseev Ya.I., Mavzyutov A.R., Ivanenkov Ya.A., Chemeris A.V. Modern approaches to differentiation of live and dead bacteria using selective amplification of nucleic acids. *Microbiology.* 2020. V. 89, No. 1. P. 13–27. DOI: 10.1134/S0026261720010038

9. Becker M.G., Taylor T., Kiazay, S., Cabiles D.R., Meyers A.F., Sandstrom P.A. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert® system using the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay. *PLoS One.* 2020. V.15 (11):e0241959. doi.org/10.1371/journal.pone.0241959

10. Bruijns B.B., Tiggelaar R.M., Gardeniers H. The Extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different Types of Swabs. *J. Forensic Sci.* 2018. V. 63 (5). P. 1492-1499. doi.org/10.1111/1556-4029.13837

11. Butler J.M. Fundamentals of forensic DNA typing. Amsterdam, Academic Press/Elsevier. 2010. 500 P.

12. Chan R.W.Y., Chan K.C., Chan K.Y.Y., Lui G.C.Y., Tsun J.G.S., Wong R.Y.K., Yu M.W.L., Wang M.H.T., Chan P.K.S., Lam H.S., Li A.M. SARS-CoV-2 detection by nasal strips: a superior tool for surveillance of pediatric population. *J. Infect.* 2020. S0163-4453(20)30704-0. doi: 10.1016/j.jinf.2020.11.009

13. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and how to avoid some of them. *Biomics.* 2012. V.4. P.31-47. (In Russian)

14. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to avoid the appearance of false-positive results in a polymerase chain reaction? *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology.* 2012. V. 8(3). P. 34-45. (In Russian)

15. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Hot start or time-release PCR. *Biomics.* 2011. V.2(1). P.1-8. (In Russian)

16. Dust K., Hedley A., Nichol, K., Stein D., Adam H., Karlowsky J. A., Bullard J., Van Caesele P., Alexander D. C. Comparison of commercial assays and laboratory developed tests for detection of SARS-CoV-2. *J. Virol. Methods.* 2020. V. 285. 113970. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113970

17. Freire-Paspuel B., Garcia-Bereguain M. A. Analytical sensitivity and clinical performance of a triplex RT-qPCR assay using CDC N1, N2, and RP targets for SARS-CoV-2 diagnosis. *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 102. P. 14-16. doi: org/10.1016/j.ijid.2020.10.047

18. Fukumoto, T., Iwasaki, S., Fujisawa, S., Hayasaka, K., Sato, K., Oguri, S., Taki K., Nakakubo S., Kamada K., Yamashita Y., Konno S., Nishida M., Sugita J., Teshima T. Efficacy of a novel SARS-CoV-2 detection kit without RNA extraction and purification. *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 98. P. 16-17. doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.074
19. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobiev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baimiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection using PCR and other amplification methods. *Biomics.* 2020. V.12 (1). P. 121-179. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7 (In Russian)
20. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Miftakhov I.Yu., Khalikova E.Yu., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Betacoronavirus SARS-CoV-2, its genome, variety of genotypes and molecular-biological approaches to combat it. *Biomics.* 2020. V.12(2). P. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15 (In Russian)
21. Garg A., Ghosha U., Patel S. S., Singh D. V., Arya A. K., Vasanth S., Pandey A., Srivastava N.. Evaluation of seven commercial RT - PCR kits for COVID - 19 testing in pooled clinical specimens. *J. Med. Virol.* 2020 doi: 10.1002/jmv.26691
22. Haddar C., Verhoeven P. O., Bourlet T., Pozzetto B., Pillet, S. Brief comparative evaluation of six open one-step RT-qPCR mastermixes for the detection of SARS-CoV-2 RNA using a Taqman probe. *J. Clin. Virol.* 2020. 132. P. 104636. 10.1016/j.jcv.2020.104636.
23. Iwasaki S., Fujisawa S., Nakakubo S., Kamada K., Yamashita Y., Fukumoto T., Sato K., Oguri S., Taki K., Senjo H., Sugita J., Hayasaka K., Konno S., Nishida M., Teshima T.J Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *Journal of Infection.* 2020. V. 81(2):e145-e147. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.071
24. Jacot D., Greub G., Jatton K., Opota O. Viral load of SARS-CoV-2 across patients and compared to other respiratory viruses. *Microbes Infect.* 2020. V. 22 (10). P. 617-621. doi.org/10.1016/j.micinf.2020.08.004
25. Jain A., Rophina M., Mahajan S., Krishnan B.B., Sharma M., Mandal S., Fernandez T., Sultanji S., Jolly B., Mathew .S, Sivasubbu S., Scaria V. Analysis of the potential impact of genomic variants in global SARS-CoV-2 genomes on molecular diagnostic assays. *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 102. P. 460-462. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.086
26. Kandel C., Zheng J., McCreedy J., Serbanescu M.A., Racher H., Desaulnier M., Powis J.E., Vojdani K., Finlay L., Sheldrake E., Vermeiren C., Katz K, McGeer A, Kozak R, Goneau LW. Detection of SARS-CoV-2 from Saliva as Compared to Nasopharyngeal Swabs in Outpatients. *Viruses.* 2020. V. 12(11):1314. doi: 10.3390/v12111314
27. Kandetu T.B., Dziuban E.J., Sikuvi K., Beard R.S., Nghihepa R., van Rooyen G., Shiningavamwe A., Katjita I. Persistence of positive RT-PCR results for over 70 days in two travelers with COVID-19. *Disaster Med Public Health Prep.* 2020. 1-7. doi: 10.1017/dmp.2020.450
28. Kim S.M., Hwang Y.J., Kwak Y. Prolonged SARS-CoV-2 detection and reversed RT-PCR results in mild or asymptomatic patients. *Infect. Dis. (Lond).* 2020. doi: 10.1080/23744235.2020.1820076
29. Kim S.Y., Lee J., Sung H., Lee H., Han M.G., Yoo C.K., Lee S.W., Hong K. H. Pooling Upper Respiratory Specimens for Rapid Mass Screening of COVID-19 by Real-Time RT-PCR. *Emerg. Infect. Dis.* 2020a. V. 26 (10). P. 2469-2472. doi: 10.3201/eid2610.201955
30. Kuchinski K.S., Jassem A.N., Prystajec N.A. Assessing oligonucleotide designs from early lab developed PCR diagnostic tests for SARS-CoV-2 using the PCR_strainer pipeline. *J. Clin. Virol.* 2020. V. 131:104581. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104581.
31. Kucirka L.M., Lauer S.A., Laeyendecker O., Boon D., Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann. Intern. Med.* 2020. V. 173(4). P. 262-267. doi: 10.7326/M20-1495
32. Kudo E., Israelow B., Vogels C. B., Lu P., Wyllie A. L., Tokuyama M., Venkataraman A., Brackney D.E., Ott I.M., Petrone M.E., Earnest R., Lapidus S., Muenker M.C., Moore A.J, Casanovas-Massana A., Omer S.B., Dela Cruz C.S., Farhadian S.F., Ko A.I., Grubaugh N.D., Iwasaki A. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. *PLoS Biology.* 2020. V. 18(10). e3000867. doi: 10.1371/journal.pbio.3000867
33. Lampl B. M., Salzberger B. Changing epidemiology of COVID-19. *GMS. Hyg. Infect. Control.* 2020. V.15. doi: 10.3205/dgkh000362
34. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill.* 2021. V.26(1). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106
35. Li X., Zai J., Zhao Q, Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(6). P. 602-611. doi: 10.1002/jmv.25731
36. Li, Y., Yan L.M., Wan L., Xiang T.X., Le A., Liu J.M., Peiris M., Poon L. L.M., Zhang W. Viral dynamics

- in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* 2020a. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2
37. Liotti F. M., Menchinelli G., Marchetti S., Morandotti G. A., Sanguinetti M., Posteraro B., Cattani P. Evaluating the newly developed BioFire COVID-19 test for SARS-CoV-2 molecular detection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.026
38. Liu C., Shi Q., Peng M., Lu R., Li H., Cai Y., Chen J., Xu J., Shen B. Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 Virus in discharged COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*. 2020. V 12(21). P. 20997-21003. doi:10.18632/aging.104020
39. Liu M., Li Q., Zhou J., Ai W., Zheng X., Zeng J., Liu Y., Xiang X., Guo R., Li X., Wu X., Xu H., Jiang L., Zhang H., Chen J., Tian L., Luo J., Luo C. Value of swab types and collection time on SARS-COV-2 detection using RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2020. 286:113974. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113974
40. Liu X., Feng J., Zhang Q., Guo D., Zhang L., Suo T., Hu W., Guo M., Wang X., Huang Z., Xiong Y., Chen G., Chen Y., Lan K. Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. *Emerg. Microbes Infect.* 2020a. V. 9(1). P. 1175-1179. doi: 10.1080/22221751.2020.1772679
41. Lübke N., Senff T., Scherger S., Hauka S., André M., Adams O., Timm J., Walker A. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. *J. Clin. Virol.* 2020. V. 130. P.104579. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104579
42. Mancini F., Barbanti F., Scaturro M., Errico G., Iacobino A., Bella A., Riccardo F., Marsili G., Stefanelli P., Pezzotti P., Rezza G., Ciervo A. Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. (1). P. 1393-1396. doi: 10.1080/22221751.2020.1775500
43. Mancini F., Barbanti F., Scaturro M., Fontana S., Di Martino A., Marsili G., Puzelli S., Calzoletti L., Facchini M., Di Mario G., Fabiani C., Bella A., Riccardo F., Pezzotti P., Stefanelli P., Rezza G., Ciervo A. Multiplex rt-Real Time PCR assays for diagnostic testing of SARS-CoV-2 and seasonal influenza viruses. A challenge of the phase 3 pandemic setting. *J. Infect. Dis.* 2020. doi: org/10.1093/infdis/jiaa658
44. Mavziutov A.R., Bondarenko V.M., Latkin A.T. Inhibitors of the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2003. № 3. P. 93-98.
45. Medeiros da Silva R.C., Nogueira Marinho L.C., de Araújo Silva D.N., Costa de Lima K., Pirih F.Q., Luz de Aquino Martins A.R. Saliva as a possible tool for the SARS-CoV-2 detection: A review. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020. V.38:101920. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101920
46. Molina L.P., Chow S.K., Nickel A., Love J.E. Prolonged Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in an Obstetric Patient With Antibody Seroconversion. *Obstet. Gynecol.* 2020. V. 136(4). P. 838-841. doi: 10.1097/AOG.0000000000004086
47. Momynaliev K.T., Ivanov I.V. The nature of false negative results in the detection of SARS-CoV-2 coronavirus by nucleic acid amplification methods. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2020. N.2. C.11-19. DOI: 10.35576/2070-7940-2020-2-11-19 (In Russian)
48. Moore N. M., Li H., Schejbal D., Lindsley J., Hayden M. K. Comparison of two commercial molecular tests and a laboratory-developed modification of the CDC 2019-nCoV reverse transcriptase PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(8):e00938-20. doi: 10.1128/JCM.00938-20
49. Moreno-Contreras J., Espinoza M.A., Sandoval-Jaime C., Cantú-Cuevas M.A., Barón-Olivares H., Ortiz-Orozco O.D., Muñoz-Rangel A.V., Hernández-de la Cruz M., Eroza-Osorio C.M., Arias C.F., López S. Saliva Sampling and Its Direct Lysis, an Excellent Option To Increase the Number of SARS-CoV-2 Diagnostic Tests in Settings with Supply Shortages. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01659-20. doi: 10.1128/JCM.01659-20
50. Munblit D., Nekliudov N.A., Bugaeva P., Blyuss O., Kislova M., Listovskaya E., Gamirova A., Shikhaleva A., Belyaev V., Timashev P., Yavorovskiy A., Bulanova E., Tsareva N., Avdeev S., Kapustina V.A., Pigolkin Y.I., Dankwa E.A., Kartsonaki C., Pritchard M.G., Fomin V., Svistunov A.A., Butnaru D., Glybochko P. StopCOVID cohort: An observational study of 3,480 patients admitted to the Sechenov University hospital network in Moscow city for suspected COVID-19 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2020. doi.org/10.1093/cid/ciaa1535
51. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., Meade-White K., Okumura A., Callison J., Brumbaugh B., Avanzato V.A., Rosenke R., Hanley P.W., Saturday G., Scott D., Fischer E.R., de Wit E. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020 Sep;585(7824):268-272. doi: 10.1038/s41586-020-2324-7
52. Pan Y., Long L., Zhang D., Yuan T., Cui S., Yang P., Wang Q., Ren S. Potential False-Negative Nucleic Acid Testing Results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Thermal Inactivation of Samples with Low Viral Loads. *Clin. Chem.* 2020. V. 202066(6). P. 794-801. doi:10.1093/clinchem/hvaa091

53. Peñarrubia L., Ruiz M., Porco R., Rao S.N., Juanola-Falgarona M., Manissero D., López-Fontanals M., Pareja J. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 97:225-229. doi:10.1016/j.ijid.2020.06.027
54. Radbel J., Jagpal S., Roy J., Brooks A., Tischfield J., Sheldon M., Bixby C., Witt D., Gennaro M.L., Horton D.B., Barrett E.S., Carson J.L., Panettieri R.A. Jr., Blaser M.J. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Is Comparable in Clinical Samples Preserved in Saline or Viral Transport Medium. *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(7). P. 871-875. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.04.209
55. Rana D.R., Pokhrel N. Sequence mismatch in PCR probes may mask the COVID-19 detection in Nepal. *Mol. Cell Probes.* 2020. V. 53:101599. doi:10.1016/j.mcp.2020.101599
56. Ransom E.M., Potter R.F., Wallace M.A., Mitchell K.F., Yarbrough M.L., Burnham C.A., Anderson N.W., Parikh B.A. Comparison of Extraction Methods and Thermocyclers for SARS-CoV-2 Molecular Detection Using Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(10):e01622-20. doi:10.1128/JCM.01622-20
57. Riediker M., Tsai D.H. Estimation of Viral Aerosol Emissions From Simulated Individuals With Asymptomatic to Moderate Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw. Open.* 2020. V. 3(7):e2013807. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.13807
58. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., de Meulder D., van Amerongen G., van den Brand J., Okba N.M.A., Schipper D., van Run P., Leijten L., Sikkema R., Verschoor E., Verstrepen B., Bogers W., Langermans J., Drosten C., Fentener van Vlissingen M., Fouchier R., de Swart R., Koopmans M., Haagmans B.L. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020. V.368 (6494). P. 1012-1015. doi:10.1126/science.abb7314
59. Ryan D. J., Toomey S., Madden S. F., Casey M., Breathnach O. S., Morris P. G., Grogan L., Branagan P., Costello R.W., De Barra E., Hurley K., Gunaratnam C., McElvaney N.G., OBrien M.E., Sulaiman I., Morgan R.K., Hennessy B.T. Use of exhaled breath condensate (EBC) in the diagnosis of SARS-COV-2 (COVID-19). *Thorax.* 2020. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215705
60. Sawano M., Takeshita K., Ohno H., Oka H. A short perspective on a COVID-19 clinical study: 'diagnosis of COVID-19 by RT-PCR using exhale breath condensate samples'. *J. Breath Res.* 2020. V.14(4). 042003. doi:10.1088/1752-7163/abb99b
61. Sahajpal N.S., Mondal A.K., Njau A., Ananth S., Jones K., Ahluwalia P.K., Ahluwalia M., Jilani Y., Chaubey A., Hegde M., Kota V., Rojjani A., Kolhe R. Proposal of RT-PCR-Based Mass Population Screening for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Coronavirus Disease 2019). *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(10). P. 1294-1299. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.07.001
62. Sakanashi D, Asai N, Nakamura A, Miyazaki N, Kawamoto Y, Ohno T, Yamada A, Koita I, Suematsu H, Hagihara M, Shiota A, Kurumiya A, Sakata M, Kato S, Muramatsu Y, Koizumi Y, Kishino T, Ohashi W, Yamagishi Y, Mikamo H. Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. *J. Infect. Chemother.* 2021. V. 27(1). P. 126-129. doi: 10.1016/j.jiac.2020.09.027
63. Sender R, Bar-On YM, Flamholz A, Gleizer S, Bernsthein B, Phillips R, Milo R. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions in an infected person. *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.11.16.20232009
64. Sethuraman N., Jeremiah S.S., Ryo A.. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020. V. 323(22). P. 2249-2251. doi: 10.1001/jama.2020.8259
65. Smith, E., Zhen, W., Manji, R., Schron, D., Duong, S., & Berry, G. J. (2020). Analytical and Clinical Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for SARS-CoV-2 Detection // *J Clin .Microbiol.* 2020. V. 58(9):e01134-20. doi: 10.1128/JCM.01134-20
66. Srivatsan S., Han P. D., van Raay, K., Wolf C. R., McCulloch D. J., Kim A. E., Brandstetter E., Martin B., Gehring J., Chen W., Kosuri S., KonnickE. Q., LockwoodC. M., RiederM. J., NickersonD. A., ChuY., ShendureJ., Starita L. M. Preliminary support for a “dry swab, extraction free” protocol for SARS-CoV-2 testing via RT-qPCR. *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.22.056283
67. Suo T., Liu X., Feng J., Guo M., Hu W., Guo D., Ullah H., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Huang Z., Deng L., Chen T., Liu F., Xu K., Liu Y., Zhang Q., Liu Y., Xiong Y., Chen G., Lan K., Chen Y. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1080/22221751.2020.1772678
68. Trypsteen W., Van Cleemput J., Snippenberg W.V., Gerlo S., Vandekerckhove L. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLoS Pathog.* 2020. V. 16(10):e1009037. doi: 10.1371/journal.ppat.1009037
69. Ulloa S., Bravo C., Parra B., Ramirez E., Acevedo A., Fasce R., Fernandez J. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. *J. Virol. Methods.* 2020. V. 285. 113960. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113960
70. Uwamino Y., Nagata M., Aoki W., Fujimori Y, Nakagawa T., Yokota H., Sakai-Tagawa Y., Iwatsuki-

- Horimoto K., Shiraki T., Uchida S., Uno S., Kabata H., Ikemura S., Kamata H., Ishii M., Fukunaga K., Kawaoka Y., Hasegawa N., Murata M. Accuracy and stability of saliva as a sample for reverse transcription PCR detection of SARS-CoV-2. *J. Clin. Pathol.* 2020. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206972
71. Vanaerschot M., Mann S.A., Webber J.T., Kamm J., Bell S.M., Bell J., Hong S.N., Nguyen M.P., Chan L.Y., Bhatt K.D., Tan M., Detweiler A.M., Espinosa A., Wu W., Batson J., Dynerman D., Wadford D.A., Puschnik A.S., Neff N., Ah Yong V., Miller S., Ayscue P., Tato C.M., Paul S., Kistler A.L., DeRisi J.L., Crawford E.D. Identification of a Polymorphism in the N Gene of SARS-CoV-2 That Adversely Impacts Detection by Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 59(1):e02369-20. doi:10.1128/JCM.02369-20
72. Vasudevan H., Xu P., Servellita V., Miller S., Liu L., Gopez A., Chiu C.Y., Abate A.R. Digital droplet PCR accurately quantifies SARS-CoV-2 viral load from crude lysate without nucleic acid purification. *medRxiv* [Preprint]. 2020. doi: 10.1101/2020.09.02.20186023
73. Waked R., Makhoul J., Saliba G., Chehata N., Mortada S., Zoghbi A., Choucair J., Haddad E. Are two consecutive negative RT-PCR results enough to rule out COVID-19? *New Microbes New Infect.* 2020. 37:100750. doi:10.1016/j.nmni.2020.100750
74. Wang Y., Song W., Zhao Z., Chen P., Liu J., Li C. The impacts of viral inactivating methods on quantitative RT-PCR for COVID-19. *Virus Res.* 2020. 285:197988. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197988
75. Williamson BN, Feldmann F, Schwarz B, Meade-White K, Porter DP, Schulz J, van Doremalen N, Leighton I, Kwe Yinda C, Pérez-Pérez L, Okumura A, Lovaglio J, Hanley PW, Saturday G, Bosio CM, Anzick S, Barbian K, Cihlar T, Martens C, Scott DP, Munster VJ, de Wit E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020 Apr 22:2020.04.15.043166. doi: 10.1101/2020.04.15.043166
76. Yang S., Stanzione N., Uslan D.Z., Garner O.B., de St Maurice A. Clinical and Epidemiologic Evaluation of Inconclusive COVID-19 PCR Results Using a Quantitative Algorithm. *Am. J. Clin. Pathol.* 2020. 4:aqaa251. doi: 10.1093/ajcp/aqaa251
77. Yee R., Truong T., Pannaraj P.S., Eubanks N., Gai E., Jumarang J., Turner L., Peralta A., Lee Y., Dien Bard J. Saliva is a Promising Alternative Specimen for the Detection of SARS-CoV-2 in Children and Adults. *J. Clin. Microbiol.* 2020. doi: 10.1128/JCM.02686-20
78. Zhang Y., Wang C., Han M., Ye J., Gao Y., Liu Z., He T., Li T., Xu M., Zhou L, Zou G., Lu M., Zhang Z. Discrimination of False Negative Results in RT-PCR Detection of SARS-CoV-2 RNAs in Clinical Specimens by Using an Internal Reference. *Virol Sin.* 2020. doi: 10.1007/s12250-020-00273-8
79. Zhen W., Berry G. J. Development of a New Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Detection. *J. Mol. Diagn.* 2020. V. 22(12). P. 1367-1372. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.09.004
80. Ziegler K., Steininger P., Ziegler R., Steinmann J., Korn K., Ensser A. SARS-CoV-2 samples may escape detection because of a single point mutation in the N gene. *Euro Surveill.* 2020. V. 25(39):2001650. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.39.2001650