

DOI: 10.32364/2587-6821-2021-5-7-497-502

Современные молекулярно-генетические технологии в диагностике вирусных заболеваний

К.Ш. Арнаудова, А.Л. Ясенявская, Г.А. Ростовили, М.А. Сомотруева, О.А. Башкина

ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России, Астрахань, Россия

РЕЗЮМЕ

Высокая контагиозность и стремительное распространение вирусных инфекций обуславливают важность своевременной постановки точного клинического диагноза заболевания. На сегодняшний день существует необходимость получать всесторонние знания о происхождении, путях распространения и эволюции возбудителей вирусных инфекций для дальнейшего прогнозирования и предупреждения заболеваний. Благодаря внедрению передовых молекулярно-генетических методов это стало возможным. С целью создания доступных, точных и быстрых методов для выявления вирусных патогенов лабораториями во всем мире успешно разрабатываются и производятся крайне необходимые тестовые наборы для скринингового выявления инфекции, т. к. именно бессимптомные случаи способствуют ее дальнейшему распространению. За последний год активная разработка диагностических наборов для выявления вируса SARS-CoV-2, являющегося возбудителем новой коронавирусной инфекции (COVID-19), способствовала совершенствованию молекулярно-генетических методов, особенно для тестирования в местах оказания помощи, при массовых и скрининговых исследованиях. Активно применяется метод ОТ-ПЦР при детекции вирусной РНК, тогда как другие исследования нуклеиновых кислот, такие как изотермическая ПЦР, анализы на гибридных микрочипах, метагеномное секвенирование на основе ампликонов и передовые технологии, связанные с CRISPR, все еще находятся в стадии внедрения в практическое здравоохранение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирусы, диагностика, молекулярно-генетические методы, полимеразно-цепная реакция, РНК.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Арнаудова К.Ш., Ясенявская А.Л., Ростовили Г.А. и др. Современные молекулярно-генетические технологии в диагностике вирусных заболеваний. РМЖ. Медицинское обозрение. 2021;5(7):497–502. DOI: 10.32364/2587-6821-2021-5-7-497-502.

State-of-the-art molecular genetic testing for the diagnosis of viral infections

K.Sh. Arnaudova, A.L. Yasenyavskaya, G.A. Rostoshvili, M.A. Samotrueva, O.A. Bashkina

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

ABSTRACT

High contagiousness and rapid spread of viral infections highlight the importance of their timely clinical diagnosis. There is a current need to gain in-depth knowledge of viral agents' origin, routes, and evolution to predict and prevent viral diseases. The introduction of advanced molecular genetic testing made this possible. Laboratories worldwide develop and manufacture urgently needed test kits for rapidly detecting infections since asymptomatic cases favor further dissemination of these diseases. Over the last year, the active development of diagnostic kits for COVID-19 contributed to the improvement of molecular genetic testing, particularly for mass and screening testing. RT-PCR is widely applied to detect viral RNA. Meanwhile, other tests for nucleic acids, e.g., isothermal amplification, microarray hybridization, amplicon metagenome sequencing, and CRISPR, are now introduced into daily practice.

KEYWORDS: viruses, diagnostics, molecular genetic testing, polymerase chain reaction, RNA.

FOR CITATION: Arnaudova K.Sh., Yasenyavskaya A.L., Rostoshvili G.A. et al. State-of-the-art molecular genetic testing for the diagnosis of viral infections. Russian Medical Inquiry. 2021;5(7):497–502 (in Russ.). DOI: 10.32364/2587-6821-2021-5-7-497-502.

ВВЕДЕНИЕ

Начало XXI в. ознаменовалось появлением ряда потенциально опасных для человека вирусов [1], сопровождающихся высокой летальностью и являющихся глобальной проблемой для здравоохранения [2]. Так, за последние 20 лет выявлено 3 новых вируса, относящихся к семейству коронавирусов, а именно вирусы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и новая коронавирусная инфекция COVID-19 (SARS-CoV-2) [3].

Известно, что коронавирусы (CoV) — это одноцепочечные РНК-содержащие вирусы, относящиеся к подсемейству *Coronavirinae*, семейству *Coronaviridae*, отряду *Nidovirales* [5]. CoV легко мутируют, что дает им возмож-

ность быстро адаптироваться к новым условиям [6]. Эволюция возбудителя была не только следствием филогенеза, но и результатом взаимодействия между вирусом и хозяином [7].

До эпидемии атипичной пневмонии было известно около 10 CoV с полными последовательностями генома, разделенные на три группы, но в 2011 г. Международным комитетом по таксономии вирусов группы переименовали в три рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* и *Gammacoronavirus* [8]. Филогенетический анализ генома SARS-CoV определил уникальное положение в роде β-коронавирусов, который впоследствии был помещен в подрод *Sarbecovirus*. Типичные представители β-коронавирусов (например, вирус гепатита мыши, CoV OC43 человека, CoV крупного рогатого

скота) были классифицированы как *Embecovirus*. После эпидемии SARS было обнаружено беспрецедентное количество новых CoV [9, 10]. Это привело к описанию линии *C Betacoronavirus*, которая включает коронавирусы летучих мышей (*Tylonycteris HKU4*, *Pipistrellus HKU5*, *Hypsugo HKU25*) и вирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром CoV [11], а также линии *D Betacoronavirus* [12] и новый род *Deltacoronavirus* [13, 14]. Затем линия *C* и линия *D Betacoronavirus* были переименованы в подроды *Merbecovirus* и *Nobecovirus*.

На сегодняшний день установлено, что 7 видов CoV передаются от человека к человеку. Среди них HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 и HCoV-229E, вызывающие заболевания верхних дыхательных путей [15–19]. С 1960-х годов были хорошо известны HCoV-OC43 и HCoV-229E. Впоследствии SARS-CoV, HCoV-NL63 и HCoV-NKU1 детектировались в 2003, 2004 и 2005 гг. соответственно [20–22]. MERS-CoV, выделенный в 2012 г., аналогичен SARS-CoV. Вирусы MERS-CoV и SARS-CoV поражают в большей степени нижние дыхательные пути и потенциально могут вызывать острый респираторный синдром.

В декабре 2019 г. в Китае выявлена новая коронавирусная инфекция у пациентов с пневмонией [20]. 7 января 2020 г. ВОЗ представила данный коронавирус как 2019-nCoV, позднее вирус был переименован в SARS-CoV-2 [23]. Заболевание сопровождается поражением, прежде всего, легочной ткани и, как правило, у лиц пожилого возраста и с сопутствующими заболеваниями с тяжелым течением, что приводит к полиорганной недостаточности, острому респираторному дистресс-синдрому, поражению желудочно-кишечного тракта и пневмонии [24, 25]. По состоянию на январь 2021 г. количество заболевших COVID-19 по всему миру достигло 92,3 млн человек, летальных исходов — 1,97 млн. Количество проводимых тестов на выявление SARS-CoV-2 в России существенно возросло с начала 2020 г. На июнь 2021 г. проведено более 100 млн тестов на выявление новой коронавирусной инфекции [26].

ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Высокая контагиозность и стремительное распространение вирусных инфекций обуславливают важность своевременной постановки точного клинического диагноза заболевания. На сегодняшний день существует необходимость получать данные о происхождении [27, 28], путях распространения [29] и эволюции возбудителей для дальнейшего прогнозирования и предупреждения заболевания [30, 31]. Благодаря внедрению передовых молекулярно-генетических методов это стало возможным [32].

С целью создания доступных, точных и быстрых методов для выявления SARS-CoV-2 лабораториями по всему миру успешно разрабатываются и производятся крайне необходимые тестовые наборы для скринингового выявления инфекции, т. к. именно бессимптомные случаи способствуют ее дальнейшему распространению.

Современные коммерчески доступные тесты на COVID-19 основаны на молекулярных анализах для обнаружения вирусной РНК SARS-CoV-2 с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации нуклеиновых кислот.

Методы молекулярной диагностики, основным критерием эффективности которых является высокая чувствительность, позволяют избежать ложноотрицательных результатов

и используются для постановки диагноза, а также для выявления бессимптомных форм и носительства SARS-CoV-2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) считается «золотым стандартом» для идентификации вируса SARS-CoV-2 [33]. ОТ-ПЦР основана на способности амплифицировать небольшое количество генетического вирусного материала в образце. В качестве стандартного исследуемого материала используют мазки, взятые из верхних дыхательных путей. Кроме того, было проведено несколько исследований с использованием сыворотки крови, кала, слезной жидкости и слюны [34]. ОТ-ПЦР начинается с преобразования вирусной геномной РНК в ДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). В этой реакции используются праймеры (синтетические олигонуклеотиды) для последовательностей ДНК, предназначенные для специфического распознавания комплементарных последовательностей в вирусном геноме РНК и обратной транскриптазы с целью создания короткой комплементарной ДНК-копии (кДНК) вирусной РНК. В ОТ-ПЦР амплификация ДНК отслеживается в реальном времени по мере развития реакции с использованием флуоресцентного красителя или ДНК-зонда, специфичного для последовательности, меченного флуоресцентной молекулой и молекулой гасителя [35]. ОТ-ПЦР проводится как одно- и как двухэтапная процедура. В одноэтапной ОТ-ПЦР в реальном времени используется одна пробирка, содержащая необходимые праймеры для проведения всей реакции ОТ-ПЦР. Двухэтапная ОТ-ПЦР в реальном времени включает более одной пробирки для проведения отдельных реакций обратной транскрипции и амплификации, но обеспечивает более высокую чувствительность и требует меньшего исходного материала, чем одноэтапная процедура, а также позволяет хранить кДНК для количественной оценки нескольких мишеней. Несмотря на это, одноэтапная процедура является предпочтительным методом для обнаружения SARS-CoV-2 благодаря сокращению времени на лабораторное тестирование, что снижает вероятность ошибок при дозировании и контаминации на этапах ПЦР в реальном времени.

В большинстве молекулярных диагностических тестов используется технология ОТ-ПЦР в реальном времени, нацеленная на различные области генома SARS-CoV-2, включая области ORF1b или ORF8, а также нуклеокапсид (N), белок-шип (S), РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP) или гены оболочки (E) [36].

Тесты ОТ-ПЦР постоянно совершенствуются и автоматизируются. Например, в тесте ePlex SARS-CoV-2, разработанном GenMark Diagnostics, Inc. [37], для обнаружения SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки используется прибор ePlex. Каждый тестовый картридж содержит реагенты для магнитной твердофазной экстракции вирусной РНК, амплификации кДНК и детекции, сочетающие электросмачивание и технологию GenMark eSensor. ДНК-мишень смешивается с сигнальными зондами, мечеными ферроцеконом, комплементарными конкретным мишеням. Целевая ДНК гибридизируется с сигнальным и захватывающим зондами, которые связаны с позолоченными электродами. Присутствие мишени определяется с помощью вольтамперометрии, которая генерирует определенные электрические сигналы от сигнального зонда.

Несмотря на широкое применение ОТ-ПЦР для детекции SARS-CoV-2, метод имеет ряд ограничений: длительность анализа, необходимость наличия дорогостоящего лабораторного оборудования и высококвалифицирован-

ного персонала. В связи с этим существует необходимость совершенствования этого метода и разработки других методов идентификации.

Одним из таких альтернативных методов является изотермическая амплификация нуклеиновых кислот. В отличие от метода ОТ-ПЦР, требующего многократных изменений температуры для каждого цикла с использованием сложного оборудования для термоциклирования [37], изотермическая амплификация проводится при постоянной температуре, таким образом, устраняется необходимость в термоциклере.

Изотермическая амплификация, опосредованная обратной транскрипцией (RT-LAMP), является быстрым и экономически выгодным методом для тестирования на SARS-CoV-2. Для RT-LAMP требуется набор из четырех праймеров, специфичных для целевого гена/области, что повышает чувствительность теста, и сочетает LAMP с этапом обратной транскрипции для обнаружения РНК. Продукт амплификации может быть обнаружен с помощью фотометрии, измерения мутности, вызванной осадком пирофосфата магния в растворе в качестве побочного продукта амплификации. За реакцией также можно следить в реальном времени путем измерения флуоресценции с использованием интеркалирующих красителей. Поскольку для диагностического тестирования RT-LAMP в реальном времени требуется только нагревание и визуальный осмотр, его простота и чувствительность делают его многообещающим методом для обнаружения вирусов.

Некоторые из доступных в настоящее время молекулярных анализов для обнаружения SARS-CoV-2 используют технологию RT-LAMP в реальном времени, например тест ID NOW COVID-19 от Abbott Diagnostics. Этот тест можно проводить у постели больного, он является быстрым (≤ 13 мин) и используется для обнаружения вирусной РНК SARS-CoV-2 в мазках из верхних дыхательных путей, но ограничен использованием только одного образца за цикл [38]. Тест RT-LAMP, разработанный Zhang et al. [39], основан на применении обратной транскриптазы (WarmStart RTx от BioLabs) для преобразования вирусной РНК в кДНК, которая впоследствии амплифицируется ДНК-полимеразой (Bst2.0 WarmStart), для колориметрического обнаружения с помощью ДНК-связывающего красителя (SYTO-9, ThermoFisher). Фермент представляет собой уникальную *in silico* РНК-направленную ДНК-полимеразу, связанную с обратимо связанным аптамером, который ингибирует активность RTx при температуре ниже 40 °С. Было показано, что колориметрический LAMP эффективен при обнаружении вирусной РНК в клеточных лизатах на уровне примерно 480 копий РНК, обеспечивая альтернативу ОТ-ПЦР для быстрого и простого обнаружения РНК SARS-CoV-2.

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

К числу внедряемых в практику молекулярно-генетических методов относится опосредованная транскрипцией амплификация (ТМА), являющаяся запатентованной технологией изотермической амплификации с одной пробиркой. ТМА смоделирована на основе репликации ретровирусов, которую можно использовать для амплификации определенных участков РНК или ДНК, и имеет более высокую чувствительность, чем ОТ-ПЦР. В методе используют обратную транскриптазу и РНК-полимеразу T7. На основе

данного метода разработана платформа Hologic Panther Fusion, на которой возможно проводить как ОТ-ПЦР, так и ТМА; она отличается высокой пропускной способностью (до 1000 тестов за 24 ч) и возможностью одновременно скрининга на другие распространенные респираторные вирусы, клинически схожие с COVID-19. На начальной стадии происходит гибридизация вирусной РНК-мишени со специфическим улавливающим зондом и дополнительным олигонуклеотидом, содержащим промоторный праймер T7, которые захватываются магнитными микрочастицами при воздействии магнитного поля. Затем захваченная РНК-мишень, гибридизованная с праймером промотора T7, подвергается обратной транскрипции в комплементарную кДНК. Активность РНКазы Н обратной транскриптазы впоследствии приводит к разрушению цепи РНК-мишени из гибридного дуплекса РНК-кДНК, оставляя одноцепочечную кДНК, которая включает промотор T7. Дополнительный праймер используется для создания двухцепочечной ДНК, которая транскрибируется в РНК-ампликоны с помощью РНК-полимеразы T7. Эти новые ампликоны РНК затем повторно входят в процесс ТМА, что способствует экспоненциальной амплификации генерировать миллиарды ампликонов РНК менее чем за 1 ч.

Анализы на основе CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками) также активно внедряются в диагностику вирусных заболеваний. CRISPR представляют собой семейство последовательностей нуклеиновых кислот, обнаруженных в прокариотических организмах. Эти последовательности могут быть распознаны и разрезаны набором бактериальных ферментов, называемых CRISPR-ассоциированными ферментами, примером которых являются Cas9, Cas12 и Cas13. Некоторые ферменты семейств Cas12 и Cas13 запрограммированы для нацеливания и разрезания вирусных последовательностей РНК [40]. На сегодняшний день две компании — Mammoth Biosciences и Sherlock Biosciences — независимо друг от друга изучают возможность использования методологии редактирования генов CRISPR для обнаружения SARS-CoV-2. Метод SHERLOCK, разработанный Sherlock Biosciences, использует Cas13, который способен разрезать последовательности репортерной РНК в ответ на активацию направляющей РНК, специфичной для SARS-CoV-2 [41]. Анализ DETECTR, разработанный Mammoth Biosciences, основан на расщеплении репортерной РНК с помощью Cas12a для специфического обнаружения вирусных последовательностей РНК генов E и N с последующей изотермической амплификацией мишени, приводящей к визуальному считыванию с помощью флуорофора [42]. Эти основанные на CRISPR методы не требуют сложной аппаратуры, проводятся быстро (анализ занимает не более 1 ч) и являются экономически выгодными. Результаты могут визуализироваться с помощью бумажных полосок, не происходит снижения чувствительности и специфичности [43].

Альтернативный метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот, известный как амплификация по типу катящегося кольца (RCA), привлек значительное внимание как метод обнаружения нуклеиновых кислот, поскольку в изотермических условиях происходит 109-кратное усиление сигнала каждого круга в течение 90 мин. RCA выгодна тем, что ее можно проводить с минимальным количеством реагентов, она позволяет избежать получения ложноположительных результатов, часто встречающихся в анализах на основе ПЦР [44].

Для быстрого обнаружения вирусных нуклеиновых кислот используют высокопроизводительные тесты на микрочипах, основанные на генерации кДНК из вирусной РНК с использованием обратной транскрипции и последующего мечения кДНК специфическими зондами. Меченые кДНК загружают в лунки лотков для микрочипов, содержащих твердофазные олигонуклеотиды, закрепленные на их поверхности [45]. Анализ на микроматрицах способствует выявлению мутаций, связанных с SARS-CoV, используется для обнаружения до 24 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с мутациями в гене spike (S) SARS-CoV, с 100% точностью [45]. Способность обнаруживать различные появляющиеся штаммы SARS-CoV-2 может стать очень востребованной по мере развития пандемии COVID-19, а анализы на микроматрицах обеспечивают платформу для быстрого обнаружения новых штаммов в результате мутационной изменчивости. Одним из недостатков тестирования на микроматрицах была его высокая стоимость, однако позднее был разработан более дешевый нефлуоресцентный тест, содержащий набор олигонуклеотидов с низкой плотностью, для обнаружения нескольких штаммов коронавируса [45]. Кроме того, портативная диагностическая платформа на основе микроматричного чипа использовалась и для идентификации нуклеиновых кислот, специфичных для коронавируса MERS, а также для вирусов гриппа и др. [46].

Наиболее прогрессивным методом идентификации вирусов является метагеномное секвенирование ампликонов. Диагностическое тестирование, основанное на секвенировании вирусного генома, — важный инструмент для определения скорости и степени мутационной изменчивости, связанной с SARS-CoV-2, и для выявления вновь появляющихся штаммов вируса с целью более эффективной разработки вакцины. Метод основан на двойном подходе, включающем использование секвенирования ампликонов в дополнение к метагеномному секвенированию. Метагеномное секвенирование используется в первую очередь для устранения фонового микробиома в образцах от инфицированных людей. Это позволяет быстро идентифицировать как вирус SARS-CoV-2, так и другие патогены, приводящие к развитию вторичных инфекций, влияющих на тяжесть протекания COVID-19. Секвенирование SARS-CoV-2 и других вирусов на основе ампликонов позволяет отслеживать молекулярную эпидемиологию и эволюцию возбудителей. Метагеномные подходы, такие как SISPA (не зависящая от последовательности амплификация с одним праймером), обеспечивают дополнительный анализ расхождения последовательностей. Этот двойной метод особенно актуален для SARS-CoV-2 при оценке скорости его мутации и обнаружении возможной рекомбинации с другими коронавирусами, что имеет значение для разработки вакцин и оценки эффективности противовирусной терапии.

В своем исследовании Moore et al. (2020) [47] использовали секвенирование на основе ампликона и метагеномного секвенирования MinION для быстрого (в течение 8 ч) секвенирования генома SARS-CoV-2 и другого микробиома в мазках из носоглотки, полученных от пациентов с COVID-19. При этом были определены 16 сайтов связывания праймеров из консервативных областей в геноме SARS-CoV-2 для последовательной амплификации фрагментов размером примерно 1000 пар нуклеотидов (п.н.) с перекрывающейся областью примерно 200 п.н.

Эти наборы праймеров затем использовали для создания 30 ампликонов из кДНК, которые впоследствии секвенировали с помощью MinION.

Компания Illumina, Inc. (NASDAQ: ILMN) разработала платформу для метагеномного секвенирования нового поколения, позволяющую не только обнаруживать наличие нескольких штаммов коронавируса, но и всесторонне изучать другие патогенные организмы, присутствующие в образце. Исследование включает в себя подготовку образцов с помощью набора для истощения рРНК TruSeq Ribo-Zero Gold, подготовку библиотеки с использованием полной цепочечной РНК TruSeq, секвенирование с применением настольной системы секвенирования Illumina и окончательный анализ данных с помощью модуля LRM Resequencing или платформы IDbyDNA Explayfy.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последний год активная разработка наборов для диагностики вирусных инфекций способствовала совершенствованию молекулярно-генетических методов, особенно для тестирования в местах оказания помощи, при массовых и скрининговых исследованиях. Метод ОТ-ПЦР активно применяется во всем мире при детекции вирусной РНК, тогда как другие исследования нуклеиновых кислот, такие как изотермическая ПЦР, анализы на гибридационных микрочипах, метагеномическое секвенирование на основе ампликонов и передовые технологии, связанные с CRISPR, все еще находятся на стадии внедрения в клиническую практику. На сегодняшний день сверхбыстрые тест-наборы и тесты в местах оказания медицинской помощи являются основным направлением разработок, что ускорит постановку диагноза и, соответственно, обеспечит своевременное лечение, снизит процент вторичных инфекций и развития осложнений.

Литература/References

1. Long C., Xu H., Shen Q. et al. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? Eur J Radiol. 2020;126:108961. DOI: 10.1016/j.ejrad.2020.108961.
2. Vogels C.B.F., Brito A.F., Wyllie A.L. et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. Nat Microbiol. 2020;5(10):1299–1305. DOI: 10.1038/s41564-020-0761-6.
3. Tian B., Gao F., Fock J. et al. Homogeneous circle-to-circle amplification for real-time optomagnetic detection of SARS-CoV-2 RdRp coding sequence. Biosens Bioelectron. 2020;165:112356. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112356.
4. Ge C., Li M., Li M. et al. Au-decorated BN nanotube as a breathalyzer for potential medical applications. J Mol Liq. 2020;312:113454. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113454.
5. Payne S. Family Coronaviridae. Viruses. 2017;149–158. DOI: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9.
6. Longdon B., Brockhurst M.A., Russell C.A. et al. The evolution and genetics of virus host shifts. PLoS Pathog. 2014;10(11):e1004395. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004395.
7. Graham R.L., Baric R.S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. J Virol. 2010;84(7):3134–3146. DOI: 10.1128/JVI.01394-09.
8. Lau S.K., Tsang A.K., Shakeel Ahmed S. et al. First genome sequences of buffalo coronavirus from water buffaloes in Bangladesh. New Microbes New Infect. 2016;11:54–56. DOI: 10.1016/j.nmni.2016.02.011.
9. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S. et al. Discovery of a novel coronavirus, China Rattus coronavirus HKU24, from Norway rats supports the murine origin of Betacoronavirus 1 and has implications for the ancestor of Betacoronavirus lineage A. J Virol. 2015;89(6):3076–3092. DOI: 10.1128/JVI.02420-14.

10. Woo P.C., Lau S.K., Wernery U. et al. Novel betacoronavirus in dromedaries of the Middle East, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(4):560–572. DOI: 10.3201/eid2004.131769.
11. Lau S.K., Zhang L., Luk H.K.H. et al. Receptor Usage of a Novel Bat Lineage C Betacoronavirus Reveals Evolution of Middle East Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Spike Proteins for Human Dipeptidyl Peptidase 4 Binding. *J Infect Dis.* 2018;218(2):197–207. DOI: 10.1093/infdis/jiy018.
12. Lau S.K., Poon R.W., Wong B.H. et al. Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Roussettus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. *J Virol.* 2010;84(21):11385–113894. DOI: 10.1128/JVI.01121-10.
13. Lau S.K.P., Wong E.Y.M., Tsang C.C. et al. Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal Interspecies Jumping with Recombination as a Potential Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission. *J Virol.* 2018;92(15):e00265-18. DOI: 10.1128/JVI.00265-18.
14. Woo P.C., Lau S.K., Tsang C.C. et al. Coronavirus HKU15 in respiratory tract of pigs and first discovery of coronavirus quasispecies in 5'-untranslated region. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(6):e53. DOI: 10.1038/emi.2017.37.
15. Khan F., Ghaffar A., Khan N. et al. An Overview of Signal Processing Techniques for Remote Health Monitoring Using Impulse Radio UWB Transceiver. *Sensors (Basel).* 2020;20(9):2479. DOI: 10.3390/s20092479.
16. Bemtgen X., Krüger K., Supady A. et al. First Successful Treatment of Coronavirus Disease 2019 Induced Refractory Cardiogenic Plus Vasoplegic Shock by Combination of Percutaneous Ventricular Assist Device and Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Case Report. *ASAIO J.* 2020;66(6):607–609. DOI: 10.1097/MAT.0000000000001178.
17. Lv D.F., Ying Q.M., Weng Y.S. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-CoV-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clin Chim Acta.* 2020;506:172–175. DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.032.
18. Xu Y.H., Dong J.H., An W.M. et al. Clinical and computed tomographic imaging features of novel coronavirus pneumonia caused by SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020;80(4):394–400. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.02.017.
19. Seo G., Lee G., Kim M.J. et al. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano.* 2020;14(4):5135–5142. DOI: 10.1021/acsnano.0c02823.
20. Vogels C.B.F., Brito A.F., Wyllie A.L. et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol.* 2020;5(10):1299–1305. DOI: 10.1038/s41564-020-0761-6.
21. Zhong Q., Li Z., Shen X. et al. CT imaging features of patients with different clinical types of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *2020;49(1):198–202.* DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.03.05.
22. Pandey L.M. Design of engineered surfaces for prospective detection of SARS-CoV-2 using quartz crystal microbalance-based techniques. *Expert Rev Proteomics.* 2020;17(6):425–432. DOI: 10.1080/14789450.2020.1794831.
23. Bemtgen X., Krüger K., Supady A. et al. First Successful Treatment of Coronavirus Disease 2019 Induced Refractory Cardiogenic Plus Vasoplegic Shock by Combination of Percutaneous Ventricular Assist Device and Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Case Report. *ASAIO J.* 2020;66(6):607–609. DOI: 10.1097/MAT.0000000000001178.
24. Falzone L., Musso N., Gattuso G. et al. Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. *Int J Mol Med.* 2020;46(3):957–964. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4673.
25. Loforte A., Gliozzi G., Martin Suarez S. et al. Contributory Role of Positron Emission Tomography in a Left Ventricular Assist Device Recipient at the Time of COVID-19 Pandemic. *ASAIO J.* 2020;66(6):599–602. DOI: 10.1097/MAT.0000000000001176.
26. Оперативные данные «стопкоронавирус.рф». URL: <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--plai/> (Электронный ресурс.) (дата обращения: 27.01.2021).
[Operational data of "stopkoronavirus.rf". (Electronic resource). URL: <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--plai/> (access date: 27.01.2021) (in Russ.).]
27. Gao J., Tian Z., Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci Trends.* 2020;14(1):72–73. DOI: 10.5582/bst.2020.01047.
28. Freire-Paspuel B., Vega-Mariño P., Velez A. et al. Analytical and clinical comparison of Viasure (CerTest Biotec) and 2019-nCoV CDC (IDT) RT-qPCR kits for SARS-CoV2 diagnosis. *Virology.* 2021;553:154–156. DOI: 10.1016/j.virol.2020.10.010.
29. Pokhrel P., Hu C., Mao H. Detecting the Coronavirus (COVID-19). *ACS Sens.* 2020;5(8):2283–2296. DOI: 10.1021/acssensors.0c01153.
30. Greiwe J., Nyenhuis S.M. Wearable Technology and How This Can Be Implemented into Clinical Practice. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020;20(8):36. DOI: 10.1007/s11882-020-00927-3.
31. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–280. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
32. Zhu N., Zhang D., Wang W. et al. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
33. Pan A., Kraschel K.L. CRISPR diagnostics: Underappreciated uses in perinatology. *Semin Perinatol.* 2018;42(8):525–530. DOI: 10.1053/j.semperi.2018.09.016.
34. Kujawski S.A., Wong K.K., Collins J.P. COVID-19 Investigation Team. Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nat Med.* 2020;26(6):861–868. DOI: 10.1038/s41591-020-0877-5.
35. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008;44(5):619–626. DOI: 10.2144/000112776.
36. Venter M., Richter K. Towards effective diagnostic assays for COVID-19: a review. *J Clin Pathol.* 2020;73(7):370–377. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206685.
37. Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol.* 2019;63(10):407–412. DOI: 10.1111/1348-0421.12734.
38. Basu A., Zinger T., Inglima K. et al. Performance of Abbott ID Now COVID-19 Rapid Nucleic Acid Amplification Test Using Nasopharyngeal Swabs Transported in Viral Transport Media and Dry Nasal Swabs in a New York City Academic Institution. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):e01136-20. DOI: 10.1128/JCM.01136-20.
39. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J. et al. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. *medRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.02.26.20028373.
40. Gupta D., Bhattacharjee O., Mandal D. et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci.* 2019;232:116636. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116636.
41. Joung J., Ladha A., Saito M. et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv.* 2020; 8. DOI: 10.1101/2020.05.04.20091231.
42. Broughton J.P., Deng X., Yu G. et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020;38(7):870–874. DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.
43. Taleghani N., Taghipour F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosens Bioelectron.* 2021;174:112830. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112830.
44. Guo X., Geng P., Wang Q. et al. Development of a single nucleotide polymorphism DNA microarray for the detection and genotyping of the SARS coronavirus. *J Microbiol Biotechnol.* 2014;24(10):1445–1454. DOI: 10.4014/jmb.1404.04024.
45. de Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N. et al. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):1049–1052. DOI: 10.1128/JCM.02426-06.
46. Hardick J., Metzgar D., Risen L. et al. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;91(3):245–247. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.011.
47. Moore S. C., Penrice-Randal R., Alruwaili M. et al. Amplicon based MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomics characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19. *medRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.03.05.20032011.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Арнаудова Кристина Шотаевна — к.м.н., заместитель руководителя НИЦ ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121; ORCID iD 0000-0002-0786-73.

Ясенявская Анна Леонидовна — к.м.н., руководитель НИЦ ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121; ORCID iD 0000-0003-2998-286.

Ростошвили Георгий Александрович — научный сотрудник НИЦ ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121; ORCID iD 0000-0001-7296-4798.

Самотруева Марина Александровна — д.м.н., профессор, проректор по научной и инновационной работе ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121; ORCID iD 0000-0001-5336-4455.

Башкина Ольга Александровна — д.м.н., профессор, ректор ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121; ORCID iD 0000-0003-4168-485.

Контактная информация: Арнаудова Кристина Шотаевна, e-mail: arnaudova@mail.ru

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Статья поступила 25.05.2021.

Поступила после рецензирования 15.06.2021.

Принята в печать 02.07.2021.

ABOUT THE AUTHORS:

Kristina Sh. Arnaudova — C. Sc. (Med.), Deputy Head of the Research Center, Astrakhan State Medical University; 121, Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation; ORCID iD 0000-0002-0786-73.

Anna L. Yasenevskaya — C. Sc. (Med.), Head of the Research Center, Astrakhan State Medical University; 121, Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-2998-286.

Georgiy A. Rostoshvili — researcher of the Research Center, Astrakhan State Medical University; 121, Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation; ORCID iD 0000-0001-7296-4798.

Marina A. Samotrueva — Dr. Sc. (Med.), Professor, Prorector for Scientific and Innovative Work, Astrakhan State Medical University; 121, Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation; ORCID iD 0000-0001-5336-4455.

Olga A. Bashkina — Dr. Sc. (Med.), Professor, Rector, Astrakhan State Medical University; 121, Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-4168-485.

Contact information: Kristina Sh. Arnaudova, e-mail: arnaudova@mail.ru.

Financial Disclosure: no authors have a financial or property interest in any material or method mentioned.

There is no conflict of interests.

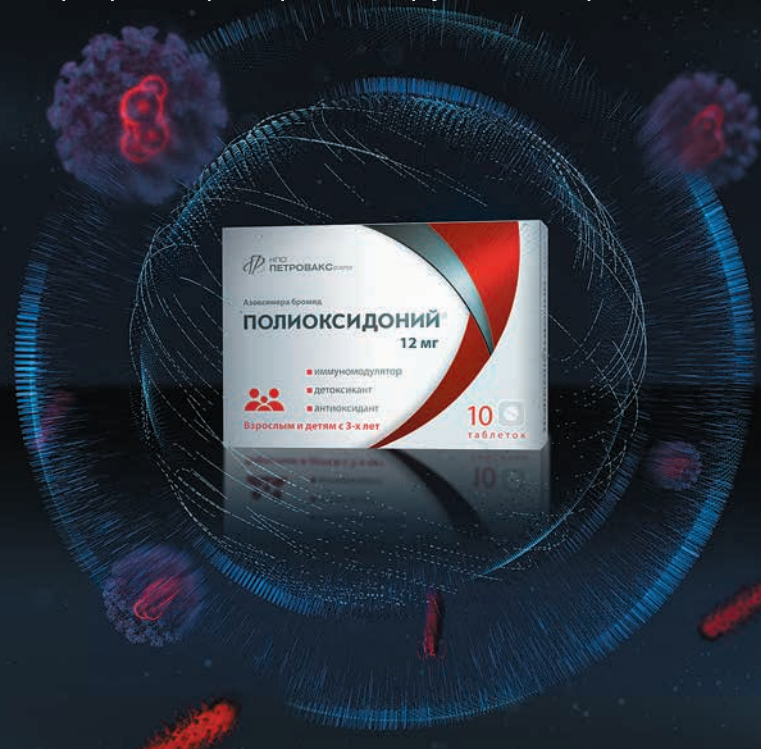
Received 25.05.2021.

Revised 15.06.2021.

Accepted 02.07.2021.

ПОЛИОКСИДОНИЙ®

при респираторных вирусных инфекциях



ПОЛИОКСИДОНИЙ® СПОСОБСТВУЕТ:

- Активации собственного иммунного ответа организма на борьбу с вирусами¹
- Увеличению резистентности организма в отношении вирусных, бактериальных и грибковых инфекций¹
- Уменьшению длительности и тяжести течения заболевания^{2,3}
- Укреплению иммунитета и снижению рисков повторного заражения⁴

¹ Инструкция по медицинскому применению препарата Полиоксидоний®

² Маланичева Т.Г., Агафонова Е.В. Эффективность иммуномодулирующей терапии внебольничной пневмонии у часто болеющих детей. // Детские инфекции. - 2018. - 17 (4). - с. 38-43

³ Караулов А.В., Горелов А.В. Применение азоксимера бромид в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний органов дыхания у детей: мета-анализ контролируемых клинических исследований. Журнал инфектологии, Том 11, №4, 2019, с. 31-41

⁴ Харит С.М., Галустян А.Н. Азоксимера бромид — безопасный и эффективный препарат при лечении острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей у детей: обзор результатов двойных слепых плацебо-контролируемых рандомизированных клинических исследований II и III фазы. Педиатрия (Прил. к журн. Consilium Medicum). 2017; 2

Петровакс

тел.: 8 495 730-75-45
www.polyoxidonium.ru

реклама

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ.
НЕОБХОДИМО ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТА ИЛИ
ПОЛУЧИТЬ КОНСУЛЬТАЦИЮ СПЕЦИАЛИСТА.