COVID-19: ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

УДК 616.98-079.3:578.834.1(045)

Аннотация. Изложен алгоритм осуществления этиологической лабораторной диагностики COVID-19 на основе использования современных подходов, методов и технологий с учетом накопленного опыта мировой медицинской практики. Описаны особенности развития инфекционного процесса и формирования гуморального иммунного ответа. Даны рекомендации по осуществлению гено- и серодиагностики, лабораторное сопровождение которой может быть полностью обеспечено линейкой созданных отечественных наборов реагентов для обнаружения коронавируса SARS-CoV-2 и выявления противовирусных антител.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, лабораторная диагностика, метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), антитела.

Для цитирования: Амвросьева Т., Поклонская Н. SARS-CoV-2: лабораторная диагностика // Наука и инновации. 2020. №7. С. 22–27. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2020-7-22-27>

Тамара Амвросьева,
завлабораторией инфекций с природным резервуаром РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, доктор медицинских наук, профессор;
amvrosieva@gmail.com

Наталья Поклонская,
ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, кандидат биологических наук;
labsanvir@gmail.com

Семейство коронавирусов включает 4 рода – *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, способных заражать различные виды животных, а также человека (КВЧ). Среди последних – HCoV-229E, HCoV-NL63 (род *Alfacoronavirus*), HCoV-OC43, HCoV-NKU1 (суб-род *Embecovirus*, род *Betacoronavirus*) [1]. К КВЧ относится и появившийся в 2002 г. SARS-CoV (суб-род *Sarbecovirus*, род *Betacoronavirus*), вызвавший серьезную вспышку тяжелого респираторного заболевания (известного как ТОРС, или атипичная пневмония) [2], а также MERS-CoV (род *Betacoronavirus*, суб-род *Merbecovirus*), который распространился от верблюдов к человеку и вызвал инфекцию со сходными клиническими проявлениями, но еще более высокой летальностью (известен как ближневосточный респираторный синдром) [3].

Метод	Мишень	Условия выполнения	Время выполнения	Вид исследуемого материала	Число одновременно исследуемых образцов
ОТ-ПЦР	Вирусная РНК	В лаборатории	3–4 часа	Назофарингеальный мазок, мокрота	До 96
LAMP*	- // -	УПБ**	2–3 часа	- // -	1–4
ИХА***	Антитела	- // -	15–20 мин	Кровь	1
ИФА	- // -	В лаборатории	1–3 часа	- // -	До 96 образцов

LAMP* – метод петлевой изотермальной амплификации
 УПБ** – «у постели больного», не требует оборудованной лаборатории
 ИХА*** – иммунохроматографический анализ, экспресс-тест

Таблица 1. Характеристика основных методов диагностики COVID-19

В конце 2019 г. человечество столкнулось с новым представителем семейства *Coronaviridae* – SARS-CoV-2 (суб-род *Sarbecovirus*, род *Betacoronavirus*) [4], который, как и SARS-CoV, наиболее близкородственен к вирусам летучих мышей (88% сходства нуклеотидных последовательностей), но при этом обладает меньшей степенью сходства с SARS-CoV – 79% [5–7]. Появление данного вируса привело к тяжелым последствиям для человечества, вызвав пандемию тяжелого респираторного заболевания COVID-19, которая охватила все страны и континенты, унесла и продолжает уносить сотни тысяч человеческих жизней.

В ходе эффективного противостояния этой беспрецедентной биологической угрозе мировое медицинское сообщество стремится разработать различные стратегии лечения и профилактики COVID-19, успех реализации которых напрямую зависит от эффективности применяемых подходов, методов и технологий лабораторной диагностики инфекции.

На сегодняшний день разработаны и применяются 2 основные группы методов лабораторной диагностики [8], направленных на установление этиологии COVID-19 (табл. 1). Они включают методы генодиагностики для обнаружения РНК возбудителя и методы серодиагностики, выявляющие вирусспецифические антигены и анти-SARS-CoV-2 антитела. В зависимости от требований к условиям их выполнения, данные методы делятся на экспресс-тесты («у постели больного») и требующие исполь-

зования оборудования в специализированной лаборатории. В целом их можно охарактеризовать следующим образом. Метод полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени направлен на детекцию РНК-вируса и требует оборудованной лаборатории. Метод петлевой изотермальной амплификации также применяется для детекции РНК вируса, но может выполняться «у постели больного». Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет детектировать антитела к коронавирусу SARS-CoV-2 и проводится в условиях оборудованной лаборатории. Иммунохроматографический метод в виде экспресс-тестов может использоваться для обнаруже-

Рис. 1. Схема появления основных диагностических маркеров инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2 [9]

ния противовирусных антител и вирусспецифических антигенов «у постели больного».

Успешное применение тех или иных методов лабораторной диагностики определяется в первую очередь знаниями об особенностях инфекционного процесса и биологии самого возбудителя. На *рис. 1* представлена схема появления основных диагностических маркеров инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2 [9].

РНК вируса присутствует в образцах биологического материала в первые дни после заражения, включая период до возникновения клинических симптомов, и может быть обнаружена с помощью методов генодиагностики вплоть до 14 суток с момента заражения. С 3–4 дня от начала заболевания начинается выработка антител к возбудителю, концентрация которых в крови достигает детектируемых уровней после 5–8 суток с момента появления клинических симптомов. В этот период, когда выявление РНК уже гораздо менее эффективно, определенная роль отводится серологическим методам. Таким образом, данные две группы методов являются взаимодополняющими, и их сочетанное использование позволяет получать наилучшие результаты.

Метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени признается золотым стандартом лабораторной диагностики инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Основные его преимущества: высокая чувствительность, специфичность и то, что реакция и анализ проводятся одновременно, в закрытой системе, что минимизирует вероятность получения

ложноположительных результатов вследствие контаминации продуктами амплификации.

Лабораторная диагностика с ОТ-ПЦР может быть использована для получения лабораторного подтверждения клинического диагноза COVID-19; при принятии решения о помещении/снятии пациента с самоизоляции; для скрининга асимптоматических лиц среди контактов пациентов с COVID-19; с целью проведения дифференциальной диагностики у людей с неясными респираторными симптомами.

В геноме коронавирусов идентифицировано достаточное количество регионов, способных выступать мишенями для ОТ-ПЦР, – гены, кодирующие структурные белки, в том числе белок шипа, оболочка, трансмембранный протеин, хеликазу и нуклеокапсид, РНК-зависимую РНК-полимеразу, гемагглютинин-эстеразу, фрагменты открытой рамки считывания 1a и 1b. Существуют разные подходы к выбору диагностически значимой мишени. Так, CDC предлагает использовать в качестве таковой фрагменты гена нуклеокапсида (N1, N2), тогда как ВОЗ – фрагмент гена E, а для подтверждения специфичности – фрагмент РНК-полимеразы [10, 11]. Следует отметить, что чувствительность и специфичность реакции зависят не только от используемых мишеней, но в большей степени – от оптимизации условий реакции и дизайна применяемых праймеров и зондов. Убедительных доказательств предпочтительности определенных регионов-мишеней пока нет. Однако существует общий принцип повышения надежности путем выбора двух из них: одной – в пределах консервативного для всех коронавирусов региона, другой – в высокоспецифичном для SARS-CoV-2 участке. Это позволяет избежать ложноположительных результатов при взаимодействии с эндемичными коронавирусами и предотвратить получение ложноотрицательного результата вследствие генетического дрейфа коронавируса SARS-CoV-2.

Биологическим материалом для проведения ОТ-ПЦР могут служить пробы из верхних (назофарингеальный и орофарингеальный мазки, назофарингеальный смыв, слюна) и нижних (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) дыхательных путей пациента [10]. Наиболее эффективно при взятии анализа из верхних дыхательных путей объединять назофарингеальный и орофарингеальный мазки в одной пробирке с транспортной средой [11]. Особое значение имеют сроки получения биологического материала. Образцы должны быть взяты в первые 5 дней с момента появления клинических симптомов, тогда как в мокроте и бронхоальвеолярном лаваже можно обнаружить РНК возбудителя в течение

Рис. 2. Частота выявления антител классов М и G в ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка шипа rS и нуклеокапсида rN [16]

Рис. 3. Кинетика обнаружения у пациентов противовирусных IgM и IgG в ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка нуклеокапсида rN (a) и шипа rS (b) [16]

ние 14 дней [12]. Принимая во внимание значительную вариабельность вирусной нагрузки, особенно в образцах из верхних дыхательных путей, отрицательный результат ПЦР не указывает на 100% отсутствие COVID-19 у пациента. Он может быть обусловлен погрешностями в процессе взятия материала, низкой вирусной нагрузкой или мутациями в геноме возбудителя. Поэтому при отрицательном результате в ОТ-ПЦР у пациентов с типичной клинической симптоматикой COVID-19 и/или наличием эпидемиологической связи с подтвержденным случаем заболевания в дополнение к генодиагностике целесообразно использовать серологическое тестирование.

К сожалению, в настоящее время четкого понимания механизмов развития иммунного ответа организма на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, нет. Вместе с тем необходимость применения дополнительных к ОТ-ПЦР методов диагностики COVID-19 очевидна, что обуславливает активные исследования особенностей и кинетики сероконверсии у пациентов, разработки и валидации различных диагностических наборов, направленных на выявление серологических маркеров инфекции. Это имеет важнейшее значение не только в качестве дополнительного/уточняющего метода лабораторной диагностики в случае неэффективности ОТ-ПЦР, но играет основную роль в изучении коллективного иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2.

Разработка серологических тестов для выявления различных классов антител к коронавирусу SARS-CoV-2 основана на их взаимодействии с различными рекомбинантными вирусспецифическими белками, обладающими выраженными антигенными свойствами. В настоящее время в качестве основных

антигенных компонентов в диагностических тестах используют два основных вирусных белка – белок шипа S и нуклеокапсида N. Проводимые исследования базируются на результатах, полученных ранее при исследовании коронавируса SARS-CoV, потому что этот вирус и вызвавший пандемию вирус SARS-CoV-2 обладают чрезвычайно высокой степенью сходства и имеют общие основные биологические свойства. Так, показано, что рекомбинантный белок нуклеокапсида N легко может быть наработан в прокариотической системе экспрессии, так как обладает небольшим размером и не имеет сайтов гликозилирования [13]. Вместе с тем получение рекомбинантного белка шипа S и его фрагментов (S1, RBD) технически более сложно, но использование этих антигенов в диагностике может давать некоторые преимущества [14]. Например, установлено, что большинство вируснейтрализующих антител вырабатывается к антигену RBD, который представляет собой фрагмент белка S, непосредственно обеспечивающий связывание с рецептором ACE2. Кроме того, Nisreen et. al показали, что применение полипептида S1 коронавируса SARS-CoV-2 в ИФА позволяло достичь более высокой специфичности по сравнению с белком S, тогда как нуклеокапсид N обеспечивал более высокую чувствительность метода [15]. На рис. 2 представлены результаты детекции двух основных классов антител IgM и IgG в ИФА с использованием рекомбинантных белков N и S коронавируса SARS-CoV-2 [16].

Применение в качестве антигена белка шипа S позволяло увеличить чувствительность детекции IgM к коронавирусу SARS-CoV-2. При выявлении IgG или суммарных антител (IgM/IgG/IgA) доля проб,

Рис. 4. Иммунологический ответ (IgM, IgG) на инфекцию, вызванную коронавирусом SARS-CoV-2 [17]

в которых они детектировались, не имела достоверных отличий вне зависимости от использования в ИФА в качестве антигена белка N или S [16].

Аналогичные результаты были получены при изучении кинетики сероконверсии у пациентов (рис. 3) [16]. Вне зависимости от антигена (рекомбинантный N или S-белок) доля пациентов, у которых регистрировалась сероконверсия в конкретный момент времени, не имела достоверных отличий. Кроме того, образование IgM больных не опережало по времени сероконверсию IgG [16].

В целом применение рекомбинантных вирус-специфических белков при разработке серологиче-

ских методов диагностики предпочтительно в связи с их более высокой иммуногенностью, низкой степенью кросс-реактивности и возможностью получения стандартного очищенного антигенного компонента.

Научным сообществом исследуются кинетика, качественные и количественные характеристики иммунного ответа при инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Необходимость этого очевидна для корректной интерпретации результатов серологической диагностики и изучения коллективного иммунитета на популяционном уровне. Несмотря на то, что отдельные исследования про-

водятся на ограниченных выборках пациентов, их результаты постепенно складываются в общую картину сероконверсии.

Установлено, что появление антител классов M и G происходит практически одновременно (аналогичная особенность сероконверсии ранее была показана для коронавируса SARS-CoV) или последовательно, с небольшим, в 2–3 дня, интервалом (рис. 4) [17]. Причем у части пациентов сначала обнаруживаются IgM, у других – IgG, а спустя 17–23 дня они выявляются у 100%. В течение 3 недель с момента появления клинических симптомов наблюдается постепенное количественное нарастание IgM и IgG. После 3 недель имеет место снижение титров IgM, тогда как IgG остаются высокими. С учетом этих особенностей максимальную диагностическую чувствительность обеспечивает выявление в крови суммарных антител [18].

Параллельно с изучением иммунного ответа на инфекцию проводились исследования, направленные на изучение кинетики выделения вируса в течение инфекционного процесса (рис. 5) [19].

Установлено, что сероконверсия IgM и IgG, происходящая практически синхронно, не связана с прекращением выделения вируса: у большинства пациентов, в крови которых присутствуют IgM и IgG к коронавирусу SARS CoV-2, в респираторном тракте обнаруживается РНК данного возбудителя [19].

В большинстве стран придерживаются тактики осуществления этиологической лабораторной диагностики COVID-19, алгоритм которой включает 2 этапа. Первый из них направлен на выявление у пациента РНК-возбудителя и проводится в 0–5 сутки с момента появления клинических симпто-

Рис. 5. Детекция РНК коронавируса SARS-CoV-2 и противовирусных антител [19]

мов. Основным методом является ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Материалом для исследования служат объединенные назофарингеальный и орофарингеальный мазки, помещенные в 1 пробирку с транспортной средой. При отрицательном результате и в более поздние сроки взятия материала для исследования лучше использовать образцы мокроты или бронхоальвеолярный лаваж у пациентов с тяжелым течением болезни. Отсутствие положительного результата в ОТ-ПЦР на фоне типичных клинических признаков новой коронавирусной инфекции не позволяет достоверно исключить этиологическую роль коронавируса SARS-CoV-2, и в этом случае целесообразны методы серодиагностики.

При осуществлении серодиагностических исследований необходимо применять самые чувствительные и специфичные диагностические средства, к которым относятся в первую очередь тесты на суммарные (общие) противовирусные антитела (IgM/IgG/IgA), а также IgG (с 8–14 дня после клинических проявлений). Раздельное определение IgM и IgG считается менее оправданным, так как результативность обнаружения суммарных антител к SARS-CoV-2 превышает таковую при выявлении отдельных классов противовирусных иммуноглобулинов [20]. Обнаружение изолированных IgM у пациентов характеризуется более низкой чувствительностью [19], а также может приводить к ложноположительным результатам [21] в связи с их лабильностью и относительно более низкой специфичностью по сравнению с другими классами противовирусных антител. Экспресс-тесты могут иметь низкую чувствительность [22], являются скрининговыми и не рекомендуются для этиологической лабораторной диагностики COVID-19 [23].

Используя серологическое тестирование, нужно иметь в виду, что его результаты не могут быть единственным основанием (критерием) для установления диагноза COVID-19. В то же время они имеют определенную диагностическую значимость при отрицательном результате ПЦР и положительных результатах методов лучевой визуализации (КТ) [24]. Данные серодиагностики нецелесообразно использовать в качестве единственно определяющих для трактовки состояния инфекционного статуса контактных лиц (острая или перенесенная инфекция), так как кинетика сероконверсии не коррелирует с прекращением выделения вируса [19, 25]. Результаты серологического обследования (отрицательные или положительные) без подкрепления их данными ОТ-ПЦР не являются достаточным основанием для принятия решения о снятии режима самоизоляции и/или возвращении пациентов на работу [11].

В рамках лабораторного сопровождения этиологической диагностики COVID-19 на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии создана линейка диагностических средств. Она включает набор реагентов для детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также 3 набора для выявления суммарных антител (M/G/A), иммуноглобулинов M и G к коронавирусу SARS-CoV-2 методом ИФА. В качестве антигенного компонента в наборах для серодиагностики использован рекомбинантный вирусспецифический белок, полученный исследователями на основе применения современных биоинформационных и генно-инженерных технологий. В клинической практике наборы показали высокие диагностические характеристики и рекомендуются для широкого использования в учреждениях здравоохранения. ■

■ **Summary.** The article presents the algorithm for the implementation of etiological laboratory diagnosis of COVID-19 based on the use of modern approaches, methods and technologies, taking into account the accumulated experience of world medicine and practice. Features of the development of the infectious process and the formation of a humoral immune response are described. The article contains specific recommendations for the implementation of molecular and serologic methods, the laboratory support of which can be fully ensured by the line of created domestic reagent kits for the detection of SARS-CoV-2 coronavirus and detection of antiviral antibodies.

■ **Keywords:** coronavirus SARS-CoV-2, laboratory diagnosis, RT-PCR, ELISA, antibody.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2020-7-22-27>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Su S. [et al.]. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses // *Trends in Microbiology*. 2016. Vol. 24. №6. P. 490–502.
2. Ksiazek T.G. [et al.]. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome // *N Engl J Med*. 2003. Vol. 348. №20. P. 1953–1966.
3. Peiris J.S.M. [et al.]. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory // *Lancet*. 2003. Vol. 361.
4. Arabi Y.M. [et al.]. Middle East Respiratory Syndrome // *N Engl J Med*. 2017. Vol. 376. №6. P. 584–594.
5. Lu, H. [et al.]. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle // *J Med Virol*. 2020. Vol. 92. №4. P. 401–402.
6. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nat Microbiol*. 2020. Vol. 5. №4. P. 536–544.
7. Lu R. [et al.]. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *The Lancet*. 2020. Vol. 395. №10224. P. 565–574.
8. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 // *Viruses*. 2020. Vol. 12, №6.

Полный список использованных источников

SEE <http://innosfera.by/2020/07/sars-cov-2>

Статья поступила в редакцию 09.07.2020 г.