

СТРАТЕГИИ ДИЗАЙНА РТ-ПЦР-СИСТЕМ И ОРГАНИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА SARS-COV-2

Н. А. Кузнецова¹✉, А. А. Почтовый^{1,2}, М. А. Никифорова¹, В. А. Гушчин^{1,2}¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Высокая плотность населения в городах с хорошо развитыми транспортными путями сообщения и туризмом может привести к распространению вирусных инфекций по всему миру в считанные дни. Новый коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной заболевания COVID-19 уже более 2 000 000 человек и унес жизни более 156 000 человек по всему миру. Одной из основных причин такого стремительного развития пандемии послужило отсутствие диагностических тест-систем для выявления SARS-CoV-2. Применение молекулярно-биологических методов дает возможность быстро обнаруживать РНК вируса SARS-CoV-2 в клинических образцах, что позволяет уточнять диагноз у пациентов с тяжелыми формами течения болезни, а также выявлять людей с бессимптомным течением заболевания или находящихся в инкубационном периоде. Наиболее доступным, высокочувствительным и специфичным методом идентификации НК SARS-CoV-2 в биологических образцах является ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Текущая вспышка COVID-19 в России требует наличия как можно большего количества ПЦР-РВ-тест-систем для проведения масштабных скрининговых исследований с целью выявления инфицированных лиц, своевременное выявление которых является крайне важным условием успешного предотвращения распространения вируса.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, диагностика, РТ-ПЦР, тест-системы, коронавирус**Вклад авторов:** авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.✉ **Для корреспонденции:** Надежда Анатольевна Кузнецова
ул. Гамалеи, д. 16, стр. 1, г. Москва, 123098; nadyakuznetsova0@gmail.com**Статья получена:** 21.04.2020 **Статья принята к печати:** 28.04.2020 **Опубликована онлайн:** 30.04.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.026

STRATEGIES OF RT-PCR-BASED ASSAY DESIGN AND SURVEILLANCE OF SARS-COV-2

Kuznetsova NA¹✉, Pochtovy AA^{1,2}, Nikiforova MA¹, Gushchin VA^{1,2}¹ Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow² Lomonosov Moscow State University, Moscow

High population density in the cities with bustling transportation systems and a thriving tourism industry can promote the global spread of a viral infection in a matter of days. The novel SARS-CoV-2 coronavirus has already infected over 2,000,000 people worldwide and caused upwards of 156,000 deaths. One of the factors driving the rapid unfolding of the pandemic is the absence of diagnostic tests for SARS-CoV-2 detection. Molecular techniques allow SARS-CoV-2 RNA to be quickly detected in clinical samples, aiding the differential diagnosis in severely ill patients and facilitating identification of asymptomatic carriers or presymptomatic individuals. Real-time PCR with fluorescent hybridization is the most available, highly sensitive and specific technique for SARS-CoV-2 RNA detection in biological samples. More RT-PCR assay kits are needed for mass screening, which will help to identify infected individuals and contain the current outbreak of COVID-19 in Russia.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnostics, RT-PCR, assay kits, coronavirus**Author contribution:** the authors equally contributed to the manuscript.✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda A. Kuznetsova
Gamalei, 16, str. 1, Moscow, 123098; nadyakuznetsova0@gmail.com**Received:** 21.04.2020 **Accepted:** 28.04.2020 **Published online:** 30.04.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.026

Появление и быстрое распространение нового коронавируса SARS-CoV-2 стало причиной пандемии заболевания COVID-19 [1]. Менее чем за три месяца с момента проникновения инфекции за пределы Китая подтверждено более 2 млн инфицированных и более 150 тыс. людей скончались [2]. В условиях полного отсутствия средств специфической профилактики и лечения изоляция и карантин стали единственно доступными средствами противодействия новой инфекции [3]. Способность коронавируса к передаче в инкубационном периоде сделала методы молекулярной диагностики на основе амплификации нуклеиновых кислот основным инструментом мониторинга и контроля над ситуацией [4]. Так, КНР, Сингапур, Южная Корея и Германия, сумевшие наладить широкое тестирование граждан и своевременное выявление носителей SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР), добились стабилизации эпидемической ситуации и сохранили резервы системы

здравоохранения для лечения наиболее тяжелобольных. В свою очередь Италия, Швеция и США, запоздавшие с внедрением массового скрининга или отрицавшие его действенность на первом этапе, в настоящий момент испытывают серьезные трудности.

Молекулярно-биологические методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и позволяют не только быстро обнаружить РНК вируса у тяжелобольных пациентов, но и выявлять людей с бессимптомным течением заболевания, что особенно важно для предотвращения распространения вируса [5, 6]. Китайские ученые и ВОЗ оперативно распространили свои рекомендации с указанием последовательностей праймеров и зондов для выявления SARS-CoV-2, разработанные на основе первых полногеномных сиквенсов, однако в последующие месяцы были получены тысячи полных геномов, благодаря которым уже разработано множество вариантов ПЦР-тест-систем. В этой работе рассмотрены основные подходы к

дизайну ПЦР систем и особенности их использования для обнаружения SARS-CoV-2.

Основой качественной диагностики является правильно собранный и информативный биологический материал. При выборе типа материала критичными являются знания тканевой тропности вируса. Так, на успешность выявления SARS-CoV-2 методом ПТ-ПЦР влияют источник и способ сбора биологического материала. Исследования показывают, что информативность биологического материала для выявления SARS-CoV-2 можно расположить по убыванию в следующем порядке: образцы жидкости бронхоальвеолярного лаважа, мокрота, мазки из носа, биопсия, мазки из глотки, кал и кровь (1% случаев) [7]. Однако для скрининговых исследований самым доступным и информативным типом материала являются мазки из носа и ротоглотки [8, 9]. Правильное взятие мазка не только позволяет получить качественный материал для исследования, но и обеспечивает безопасность медицинского персонала [10].

Основным методом молекулярно-генетического анализа, позволяющего выявлять SARS-CoV-2, является ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [6, 11, 12]. Это наиболее доступный, высокочувствительный и специфичный метод. Использование ПЦР-тест-систем помогает проводить масштабные скрининговые исследования с целью выявления инфицированных лиц, а также определять вирусную нагрузку у каждого пациента.

Подходы к созданию тест-систем

На сегодняшний день опубликовано уже несколько десятков работ исследователей разных стран с описанием олигонуклеотидов и ПЦР-РВ-тест-систем для идентификации SARS-CoV-2. Анализ данных работ показывает, что существуют разные подходы к созданию ПЦР-РВ-тест-систем для выявления SARS-CoV-2. Наиболее простой и доступный вариант дизайна — это моноплексные тесты, в которых олигонуклеотиды выбраны на один ген вируса. Более сложные модификации позволяют создавать мультиплексные варианты, в которых олигонуклеотиды

выбраны на разные гены. В последнем случае праймеры и зонды могут иметь разную специфичность или позволяют дискриминировать SARS-CoV-2 от родственных коронавирусов и других респираторных инфекций. Для выбора праймеров и зондов на SARS-CoV-2 чаще всего используют гены вирусного нуклеокапсида (*N1* и *N2*), ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (*RdRP*) и ген Е белка оболочки SARS-CoV-2. Так, для выявления пациентов с COVID-19 CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Центр по контролю и профилактике заболеваний США) рекомендует сначала провести скрининг на наличие гена Е, нуклеотидная последовательность которого не отличается от таковой у вируса SARS, а затем дифференцировать SARS от SARS-CoV-2 при помощи олигонуклеотидов на ген *RdRP* [13]. В соответствии с протоколом ВОЗ образцы тестируют на наличие генов *N* и *Orf1b*, но предлагаемые олигонуклеотиды не позволяют различать SARS-CoV-2 и SARS, поэтому для окончательной идентификации вирусов рекомендуется использовать секвенирование [14]. В табл. 1 приведены открытые для всех желающих последовательности праймеров и зондов, рекомендуемые ВОЗ и CDC.

Особенности использования существующих тест-систем

Высокая востребованность привела к появлению в России большого разнообразия различных коммерческих тест-систем, многие из которых уже получили регистрационное удостоверение изделия медицинского назначения (табл. 2). На сегодняшний день на российском рынке уже более десятка ПЦР-РВ-тестов и у каждого есть свои особенности. Так, для моноплексных вариантов характерна более высокая чувствительность (до 500 ГЭ/мл) по сравнению с мультиплексными вариантами (от 1000 до 10000 ГЭ/мл), тогда как мультиплексные наборы (несколько генов SARS-CoV-2) позволяют избежать появления ложноотрицательных результатов, обусловленных вариабельностью вируса (появление мутаций на месте посадки олигонуклеотидов). Необходимо также отметить, что иногда результаты, полученные при помощи тест-систем, выявляющих несколько

Таблица 1. Олигонуклеотиды, рекомендованные ВОЗ и CDC для диагностики COVID-19

	Локус	Олигонуклеотиды	Детектируют
ВОЗ	ORF1b-nsp14	HKU-ORF1b-nsp14F TGGGGYTTTACRGGTAACCT HKU-ORF1b-nsp14R AACRCGCTTAACAAGCACTC HKU-ORF1b-nsp14P FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	N gene	HKU-NF TAATCAGACAAGGAAGTATTA HKU-NR CGAAGGTGTGACTTCCATG HKU-NP FAM-GCAAATTGTGCAATTTGCGG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
CDC	envelope protein	E_Sarbeco_F ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT E_Sarbeco_R ATATTGCAGCAGTACGCACACA E_Sarbeco_P1 FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	N gene	N_Sarbeco_F CACATTGGCACCCGCAATC N_Sarbeco_R GAGGAACGAGAAGAGGCTTG N_Sarbeco_P FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	RdRP gene	RdRp_SARSr-F GTGARATGGTCATGTGTGGCGG RdRp_SARSr-R CARATGTTAAASACACTATTAGCATA RdRp_SARSr-P1 FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BHQ1 RdRp_SARSr-P2 FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 BetaCoV/bat

Таблица 2. Наборы для выявления РНК SARS-CoV-2

Регистрационный номер и дата регистрации	Наименование медицинского изделия	Производитель	Заявленная чувствительность (ГЭ/мл)	Длительность амплификации
РЗН 2020/10088 от 17.04.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени	ООО «ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС»	10 000	25 мин
РЗН 2020/10064 от 16.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX-SARS-CoV-2»	ООО «Система-БиоТех»	1000	1 ч 40 мин
РЗН 2020/9957 от 02.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»	АО «ГЕНЕРИУМ»	1000	25 мин
РЗН 2020/9948 от 01.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и РВ-ПЦР (SARS-CoV-2/SARS-CoV)	ООО «ДНК-Технология ТС»	1000	50 мин
РЗН 2020/10032 от 14.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SARS-CoV-2-ПЦР»	ООО «МедипалТех»	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9904 от 27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «ПОЛИВИР SARS-CoV-2»	ООО НПФ «Литех»	1000	1 ч 30 мин
РЗН 2020/9765 от 27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ПЦР «АмплиТест SARS-CoV-2»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9896 от 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»	1000	1 ч 20 мин
41956 РЗН 2014/1987 от 25.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov родственных вирусов (Severe acute respiratory syndrome coronavirus, Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2), в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CoVs-Bat-FL» по ТУ 9398-224-01897593-2013	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9845 от 20.03.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени	ООО «СМАРТЛАЙФКЕА»	10 000	25 мин
41390 РЗН 2020/9700 от 14.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS/COVID-19 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	нет данных	нет данных
41240 РЗН 2020/9677 от 11.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	нет данных	нет данных

вирусных генов, довольно сложно интерпретировать, что может быть связано с недостаточной оптимизацией олигонуклеотидного состава. Тем не менее заявленная чувствительность всех российских коммерческих наборов составляет 1000 ГЭ/мл. Кроме того, независимо от количества специфичных вирусных мишеней в тест-системе, обязательно наличие внутреннего контроля, он может быть как эндогенным (ДНК человека), так и экзогенным (например, РНК-фаг). Внутренний контроль позволяет контролировать все этапы протокола от экстракции нуклеиновых кислот до ПЦР.

Несмотря на очевидную необходимость внутреннего контроля не все системы его включают. По техническим причинам такого контроля лишены наборы, основанные на изотермической амплификации, например петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, или LAMP). Основные преимущества таких тестов — быстрота получения ответа (до 40 мин), отсутствие необходимости в хорошо оборудованной лаборатории и возможность проводить тестирование у постели больного (не требуется термоциклер). Чувствительность тестов на основе LAMP может достигать 1–3 копий РНК

в реакцию [15]. Однако существующие коммерческие образцы не «дотягивают» до заявленной чувствительности (см. табл. 2).

Полногеномное секвенирование

Наиболее информативным методом молекулярно-генетического анализа остается секвенирование. Особенностью пандемии, вызванной SARS-CoV-2, стало наличие самого большого количества последовательностей полного генома коронавируса, полученных за короткий период времени. Полногеномное секвенирование никогда не было так близко к клиническому применению, как в случае пандемии COVID-19. Существует несколько подходов для полногеномного секвенирования SARS-CoV-2. Классический метод — экстракция нуклеиновых кислот из носоглоточных и/или ротоглоточных мазков и дальнейшее истощение рибосомной РНК-хозяина с приготвлением библиотек и последующим секвенированием по стандартным протоколам производителя. Однако данный метод требует достаточного количества РНК вируса и большого количества прочтений. При малой вирусной

нагрузке возможна наработка вируса на культурах клеток. Для этого проводят пассирование вируса с использованием клеточных линий Vero V, Vero E6, LLC-MK2 и ряда других. Данный подход был успешно применен в некоторых лабораториях, в том числе в Референс-центре по коронавирусной инфекции (код доступа к базе GISAID: EPI_ISL_421275).

Подходом, альтернативным культивированию на клеточных линиях, является полногеномная амплификация вируса SARS-CoV-2. На сегодняшний день было разработано несколько целевых панелей, позволяющих проводить полногеномное секвенирование SARS-CoV-2. Одна из них — Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel (Thermo Fisher Scientific; США). Данная панель состоит из двух пулов праймеров для амплификации фрагментов длиной 125–275 пар оснований [16].

Другая панель была разработана Paragon Genomics Inc (США), она включает два пула праймеров и позволяет амплифицировать фрагменты длиной 99 пар оснований [17]. Потенциально эффективное обнаружение SARS-CoV-2 с помощью панели от Paragon Genomics Inc — 1,15 копии вируса (с вероятностью 95%). Совместное использование двух перекрывающихся пулов праймеров позволит обеспечить полное покрытие всего генома вируса, и расчетный предел обнаружения составляет 0,29 копии (с вероятностью 95%). Информация о пределе обнаружения SARS-CoV-2 с использованием панели AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel пока отсутствует.

Еще один из методов — протокол для пробоподготовки и биоинформатического анализа от ARTIC [18]. Он разработан для секвенирования на платформе Oxford Nanopore и позволяет получить результаты в течение 8 ч.

ВЫВОДЫ

Методы, основанные на молекулярно-генетическом анализе нуклеиновых кислот, позволяют организовать мониторинг и надзор за распространением SARS-CoV-2, что является важной составляющей борьбы с пандемией COVID-19. Главное их преимущество по сравнению с термометрией или выявлением симптомов — возможность выявлять бессимптомных носителей и инфицированных в инкубационный период. Несмотря на большое разнообразие дизайнов, классическая ПЦР-РВ остается наиболее предпочтительным методом. Совершенствование изотермических способов позволит сделать молекулярные методы анализа еще более доступными и эффективными для мониторинга и контроля над биологическими угрозами в будущем. Секвенирование генома вируса позволяет накопить информацию о его изменениях и использовать ее при оптимизации праймеров для ПЦР-РВ, разработки вакцин, изучения эволюции вируса, а также для реконструкции эпидемиологических процессов, способствующих развитию эпидемии. Используя различные платформы для секвенирования, можно проводить анализ не только в стенах лаборатории, но и непосредственно в клиниках и получать более оперативную информацию.

Литература

- Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020; 382: 1199–207.
- Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
- Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020; eabb5793.
- He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020; Apr 13: [Epub ahead of print]. DOI: 10.7326/M20-1301.
- Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-Maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*. 2020 Mar 1. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-pharmaceutical-analysis>.
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020 Mar 11.
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr; 20 (4): 411–2.
- Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19; 382 (12): 1177–9.
- Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen April 17, 2020. DOI: 10.1056/NEJMvcm2010260.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Apr; 13.
- Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Feb 26; 9 (3): pii E623.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan; 25 (3).
- Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4.
- R Lu, X Wu, Z Wan, Y Li, L Zuo, J Qin, et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica*. 2020; c. 1.
- Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/microbial-sequencing/microbial-identification-ion-torrent-next-generation-sequencing/viral-typing/coronavirus-research.html>.
- Li C, et al. High sensitivity detection of coronavirus SARS-CoV-2 using multiplex PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic method. *bioRxiv*. 2020.
- Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/article-network-provides-protocol-rapid-accurate-sequencing-novel-coronavirus-ncov-2019>.

References

1. Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020; 382: 1199–207.
2. Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
3. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020; eabb5793.
4. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
5. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020; Apr 13: [Epub ahead of print]. DOI: 10.7326/M20-1301.
6. Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-Maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*. 2020 Mar 1. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-pharmaceutical-analysis>.
7. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020 Mar 11.
8. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr; 20 (4): 411–2.
9. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19; 382 (12): 1177–9.
10. Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen April 17, 2020. DOI: 10.1056/NEJMvcm2010260.
11. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Apr; 13.
12. Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Feb 26; 9 (3): pii E623.
13. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan; 25 (3).
14. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4.
15. R Lu, X Wu, Z Wan, Y Li, L Zuo, J Qin, et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica*. 2020; c .1.
16. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/microbial-sequencing/microbial-identification-ion-torrent-next-generation-sequencing/viral-typing/coronavirus-research.html>.
17. Li C, et al. High sensitivity detection of coronavirus SARS-CoV-2 using multiplex PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic method. *bioRxiv*. 2020.
18. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/article-network-provides-protocol-rapid-accurate-sequencing-novel-coronavirus-ncov-2019>.