



Разработка тест-системы для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных методом полимеразной цепной реакции

А. М. Тимина, А. С. Яковлева, М. В. Тиманов, М. В. Бирюченкова, Е. С. Орлова
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Сегодня внимание всего мирового сообщества приковано к одной общей проблеме – распространению новой коронавирусной инфекции (COVID-19). С конца декабря 2019 г. коронавирус SARS-CoV-2 охватил большинство стран мира, и 11 марта 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения была объявлена пандемия. Глобальное распространение COVID-19 не ограничилось человеческой популяцией, и возникла необходимость тестирования домашних и сельскохозяйственных животных, находящихся в контакте с человеком. Появляется все больше сообщений о выявлении SARS-CoV-2 у норок, хорьков, собак, кошек, тигров, львов и других животных. Основным методом диагностики COVID-19 на сегодняшний день является полимеразная цепная реакция, однако все существующие в настоящее время тест-системы предназначены для выявления вируса у людей. В статье представлены данные по разработке метода обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. В процессе проведенных исследований выбрана оптимальная система праймеров и зонд, отработаны условия реакции, определены основные валидационные характеристики метода (чувствительность, специфичность, воспроизводимость). В результате проведения валидации установлено, что он отвечает требованиям, предъявляемым к качественным методам измерений/испытаний, и может применяться в диагностических исследованиях. На основе разработанного метода создана тест-система для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных, которая внедрена в ветеринарную практику. Проведены скрининговые исследования популяций животных из различных регионов Российской Федерации с целью выявления генома нового коронавируса. Показано, что среди травоядных животных Российской Федерации вирус SARS-CoV-2 не встречается. Среди домашних животных-компаньонов специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» был зафиксирован лишь один положительный случай.

Ключевые слова: новый коронавирус SARS-CoV-2, полимеразная цепная реакция в реальном времени, тест-система, биоматериал от животных

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие». Авторы благодарят сотрудников ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородиной» Минздрава России за предоставленные образцы биоматериала, полученного от людей.

Для цитирования: Тимина А. М., Яковлева А. С., Тиманов М. В., Бирюченкова М. В., Орлова Е. С. Разработка тест-системы для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных методом полимеразной цепной реакции. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (1): 45–51. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-45-51.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Тимина Анна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрвец, e-mail: timina@arriah.ru.

Development of polymerase chain reaction kit for detection of SARS-CoV-2 RNA in biological samples collected from animals

А. М. Timina, А. S. Yakovleva, М. V. Timanov, М. V. Biryuchenkova, Ye. S. Orlova
FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Today, global attention is drawn to the same common problem – spread of the novel COVID-19 infection. From the end of December 2019 novel SARS-CoV-2 virus spread over the majority of the countries and on 11 March 2020 the World Health Organization announced pandemic. Global spread of COVID-19 was not limited to the human population and there was a need to test pets and farm animals, who were in contact with the humans. There are more and more reports on SARS-CoV-2 detected in minks, ferrets, dogs, cats, tigers, lions and other animals. Today the key method of COVID-19 diagnosis is polymerase chain reaction, but all currently available test-kits are intended for the virus detection in humans. The paper demonstrates data on the development of the real-time PCR-based method for SARS-CoV-2 RNA detection in the biological samples collected from animals. During the research, an optimal system of primers and a probe were selected, reaction conditions were tested, basic validation specifications (sensitivity, specificity, reproducibility) were set. The validation results demonstrated that the method met

all the criteria of the high-quality measurement/test methods and it can be used for diagnostic tests. The test-kit was based of the method intended for SARS-CoV-2 RNA detection in animal biological samples and it was put into the veterinary practice. Animal populations in different regions of the Russian Federation were subjected to the screening tests in order to detect the novel coronavirus genome. No SARS-CoV-2 was reported in herbivorous animals in the Russian Federation. The FGBI "ARRIAH" experts detected only one positive pet animal.

Keywords: novel SARS-CoV-2, real-time polymerase chain reaction, test-kit, animal biological sample

Acknowledgements: The work was funded by the FGBI "ARRIAH" as a part of the research activities "Animal Health and Welfare". The authors are grateful to the specialists of the Smorodintsev Research Institute of Influenza (Ministry of Health of the Russian Federation) for the kindly provided human biological samples.

For citation: Timina A. M., Yakovleva A. S., Timanov M. V., Biryuchenkova M. V., Orlova Ye. S. Development of polymerase chain reaction kit for detection of SARS-CoV-2 RNA in biological samples collected from animals. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (1): 45–51. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-45-51.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Anna M. Timina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: timina@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Новый коронавирус SARS-CoV-2 вызывает тяжелую форму пневмонии у людей (COVID-19), подобную MERS-CoV и SARS-CoV. Он относится к РНК-содержащим вирусам семейства *Coronaviridae* линии Beta-CoV B.

Первые случаи заболевания человека пневмонией неизвестного происхождения были зарегистрированы в декабре 2019 г. в городе Ухань китайской провинции Хубэй [1]. Новый коронавирус был выделен из эпителиальных клеток дыхательных путей человека и идентифицирован как возбудитель заболевания [2]. В 2020 г. подавляющее большинство стран мира сообщили о случаях заболевания людей, и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила COVID-19 пандемией [3, 4].

У пациентов COVID-19 проявляется такими ярко выраженными клиническими симптомами, как лихорадка, сухой кашель, одышка, ринорея, ангина, интерстициальные инфильтраты в легких [5].

Считается, что предшественником SARS-CoV-2 является коронавирус летучих мышей (*Rhinolophus sinicus*). От летучих мышей к человеку вирус перешел через промежуточного хозяина, установить которого пока не удалось [6–10]. Глобальное распространение SARS-CoV-2 не ограничилось человеческой популяцией. В настоящее время имеется много сообщений о случаях обнаружения нового коронавируса у животных: норки, собак, кошек, тигров и львов. Опыты по экспериментальному заражению показали, что хорьки и кошки очень восприимчивы к SARS-CoV-2 и могут передавать вирус от инфицированных здоровым животным контактным или воздушно-капельным путем [11–17].

Восприимчивость животных к SARS-CoV-2, вероятно, объясняется тем, что рецептором связывания с вирусом является клеточный ангиотензинпревращающий фермент типа 2 (ACE2), который почти идентичен или похож у человека и таких видов животных, как куны, кошачьи, свиньи и обезьяны [16, 18, 19]. Таким образом, существует потенциальная возможность формирования резервуара SARS-CoV-2 в популяции домашних животных, следовательно, эпидемиологический надзор за COVID-19 должен предусматривать диагности-

ческие и мониторинговые исследования животных-компаньонов.

Рекомендованным методом специфической лабораторной диагностики COVID-19 является выявление РНК SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Благодаря высокой чувствительности и специфичности данный метод идеален для первичного скрининга [20–23].

На сегодняшний день разработано достаточное количество тест-систем для выявления возбудителя SARS-CoV-2 у людей, однако они не предназначены для анализа образцов биоматериала от животных [24–27]. Таким образом, разработка надежного чувствительно-го и специфичного метода для диагностики COVID-19 у животных является актуальной задачей.

Целью данной работы являлось создание тест-системы для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в биоматериале от животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоматериал. Первоначальный изолят вируса SARS-CoV-2, выделенный от человека, был любезно предоставлен ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. В работе использовали пробы биоматериала, полученные от людей (смывы из носовой и ротовой полости) и животных (нососмывы, легкие). Объектами исследования служили как домашние (свиньи, крупный рогатый скот (КРС), овцы, козы), так и дикие (кабаны, лоси, олени, изюбри, косули, яки, антилопы, зубры, туры, маралы, сайгаки, горные козлы, кабарги, дзерены) животные. При анализе продуктов питания отбирали смывы с поверхностей мясной продукции и полуфабрикатов, а также с упаковки.

Референтные штаммы. Для проверки специфичности метода были использованы вирусы, принадлежащие к семейству *Coronaviridae*: SARS-CoV-2, трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС), эпизоотической диареи свиней (ЭДС), респираторный коронавирус свиней, коронавирус КРС, инфекционного бронхита кур (ИБК), а также гетерологичные вирусы: репродуктивно-респираторного синдрома

свиней (PPCC), парвовирус свиней (ПВС), цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2), болезни Ауески (ВБА), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), гриппа А, инфекционного ринотрахеита КРС (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3).

Выделение РНК из 10%-й суспензии биоматериала осуществляли с использованием 6 М гуанидин тиоцианата и стекловолкнистых фильтров GF/F [28]. Работу с нуклеиновой кислотой проводили в условиях, регламентированных МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Полимеразная цепная реакция. Условия и режимы реакции описаны далее. Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ Mg²⁺, 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы, по 5 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала обратную транскрипцию при 42 °С 15 мин и 35 циклов амплификации при следующем температурном режиме: 30 с денатурации при 94 °С, 30 с отжиг праймеров при 55 °С и 40 с элонгации при 72 °С. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Молекулярное клонирование участка гена N вируса SARS-CoV-2 осуществляли с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Нуклеотидные последовательности. В работе использовали имеющиеся в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности вируса SARS-CoV-2. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета прикладных программ BioEdit.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). Условия и режимы реакции описаны далее. Все реакции проводили на термоциклере C1000 Touch™ с измерительным модулем CFX96 (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки данных использовали методы валидации аналитических методик [29, 30]. Были определены такие характеристики, как чувствительность и специфичность метода, прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн праймеров. К моменту начала работы над созданием тест-системы на сайте ВОЗ было опубликовано несколько протоколов лабораторной диагностики COVID-19. В результате их анализа из обширного перечня олигонуклеотидов, рекомендуемых для обнаружения COVID-19, были выбраны праймеры и зонд, предложенные Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США):

праймер 1 – GACCCCAAAATCAGCGAAAT;

праймер 2 – TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG;

зонд – ROX ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC BHQ2.

Выбранные олигонуклеотиды комплементарны N-гену вируса SARS-CoV-2.

Разработка и валидация метода обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР-РВ. В ходе оптимизации были определены состав реакционной смеси и температурно-временной режим реакции.

Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей по 0,5 мкл (5 пм) прямого и обратного праймеров, 0,5 мкл (5 пм) зонда, 2,5 мкл 10× буфера для ПЦР, 4 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,7 мкл 25 мМ dNTPs, 0,2 мкл (1 ед.) Taq-ДНК-полимеразы, 0,4 мкл (20 ед.) M-MLV-ревертазы, 1 мкл воды без нуклеаз и 5 мкл РНК.

Программа амплификации включала в себя этапы обратной транскрипции при 42 °С 15 мин с последующей денатурацией при 95 °С 5 мин и 40 циклов собственно ПЦР (денатурация при 95 °С 15 с, отжиг при 55 °С 15 с и элонгация при 60 °С 20 с).

В качестве порогового значения реакции, при котором проба считается положительной, было принято считать Ct ≤ 35.

Специфичность метода была проверена на нескольких видах вирусов, принадлежащих к семейству *Coronaviridae* (SARS-CoV-2, респираторный коронавирус свиней, коронавирус КРС, вирусы ТГС, ЭДС, ИБК), и других возбудителях болезней сельскохозяйственных животных (ПВС, ЦВС-2, ВБА, вирусы РРСС, ИББ, гриппа А, ИРТ, ПГ-3), а также на РНК/ДНК, выделенной из тканей свиней, КРС, кур. Положительная реакция наблюдалась только с РНК вируса SARS-CoV-2, что свидетельствует о специфичности метода (рис. 1).

Для определения чувствительности исследовали серию последовательных 10-кратных разведений РНК вируса SARS-CoV-2.

Чувствительность определяли как процентное отношение положительных результатов, полученных при использовании валидируемой тест-системы, к общему количеству исследований по формуле:

$$Se = (ИП / (ИП + ЛО)) \times 100\%,$$

где ИП – истинно положительный результат;

ЛО – ложноотрицательный результат.

Все исследованные пробы с наличием РНК вируса SARS-CoV-2 показали в валидируемой тест-системе положительный результат (табл. 1). Таким образом, рассчитанная чувствительность валидируемой тест-системы составила 100%.

Оценка воспроизводимости тест-системы. При определении воспроизводимости исследовали одну положительную и одну отрицательную пробы в 10 повторностях, выполненных при измененных условиях измерения: одним исследователем в параллельных исследованиях в течение разных дней (10 дней) и двумя разными исследователями в параллельных исследованиях (в 10 повторностях). Для определения сходимости учитывали степень близости результатов последовательных измерений одной и той же пробы. Для валидируемой тест-системы воспроизводимость была абсолютна, т. е. положительная проба всегда показывала положительный результат, а отрицательная проба – отрицательный.

Таким образом, было установлено, что ОТ-ПЦР-РВ по своим характеристикам отвечает требованиям, предъявляемым к качественным методам измерений/испытаний, и может применяться в диагностических исследованиях.

По результатам валидации метода разработаны методические указания по обнаружению РНК вируса

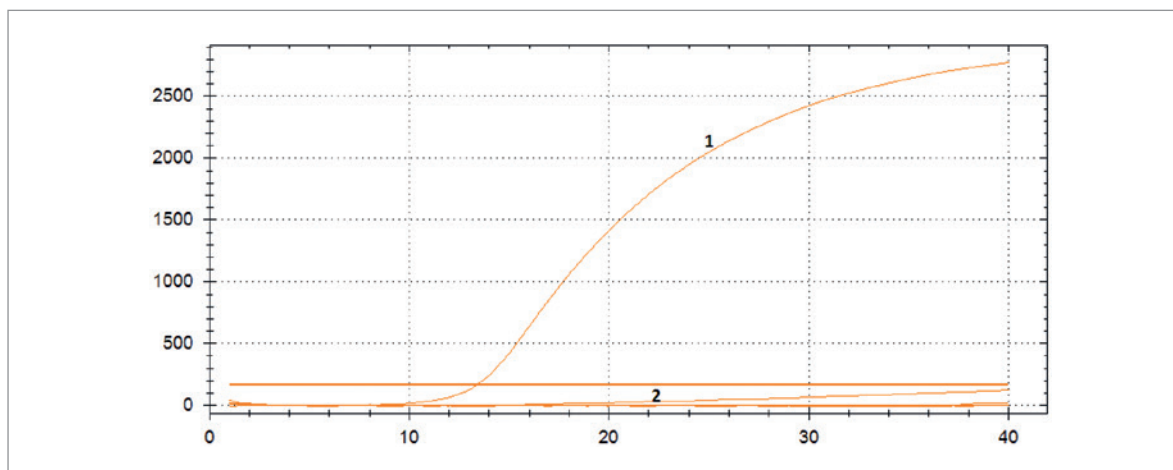


Рис. 1. Обнаружение SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ в биоматериале от животных:

1 – проба назального мазка, содержащая SARS-CoV-2;

2 – пробы, отрицательные в отношении SARS-CoV-2 (вирус ТГС, вирус ЭДС, респираторный коронавирус свиней, коронавирус КРС, вирус ИБК, вирус РРСС, ПВС, ЦВС-2, ВБА, вирус ИББ, вирус гриппа А, вирус ИПТ, вирус ПГ-3, тканевая РНК неинфицированных свиней, КРС, кур)

Fig. 1. Detection of SARS-CoV-2 in animal biological samples using real-time PCR:

1 – SARS-CoV-2-containing nasal swab;

2 – SARS-CoV-2-negative sample (TGEV, PEDV, PRCoV, BCoV, IBV, PRRSV, PPV, PCV-2, ADV, IBDV, influenza A virus, BHV-1, bPIV-3, tissue RNA of non-infected pigs, cattle, chickens)

SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, которые применялись в дальнейшем для диагностики COVID-19 у животных.

Разработка тест-системы для обнаружения РНК коронавируса «SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР-РВ». Получение рекомбинантной плазмиды, содержащей участок гена N вируса SARS-CoV-2. Тест-система для широкого употребления должна удовлетворять требованиям безопасности, поэтому в качестве положительного контроля решено было использовать рекомбинантную плазмиду.

Участок гена N вируса SARS-CoV-2 амплифицировали методом ПЦР, используя РНК коронавируса, полученную в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. В реакции применяли праймеры, рассчитанные на консервативный участок генома. В результате трансформации лигазной смесью из вектора pJET1.2/blunt и амплифицированного фрагмента вирусного гена компетентных клеток *Escherichia coli* JM109 получили клоны, содержащие участок гена N вируса SARS-CoV-2. Наличие специфического участка ДНК в рекомбинантной плазмиде было проверено с помощью нуклеотидного секвенирования.

Физическая карта рекомбинантной плазмиды представлена на рисунке 2.

На следующем этапе была создана тест-система ОТ-ПЦР-РВ, содержащая специфичные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченый олигонуклеотидный зонд, а также осуществлен подбор условий проведения исследований с помощью разработанного диагностикума, обеспечивающих минимальный риск контаминации тестируемых образцов и исключающих субъективности при оценке результатов.

Для удобства пользователя набор для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в ОТ-ПЦР-РВ состоит из следующих компонентов:

- № 1 – ОТ-ПЦР-смесь;
- № 2 – фермент Taq-ДНК-полимераза;
- № 3 – фермент M-MLV-ревертаза;
- № 4 – положительный контроль;
- № 5 – отрицательный контроль.

В качестве отрицательного контроля используется деионизованная вода, а в качестве положительно – плазмидная ДНК, содержащая вставку фрагмента гена N вируса SARS-CoV-2. Каждый набор снабжается инструкцией (рис. 3).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией проводится в программируемом амплификаторе любой модели в одну

Таблица 1
Пробы, использованные для оценки чувствительности разработанной тест-системы

Table 1
Samples used to test sensitivity of the developed test-kit

Номер пробы	Описание пробы	Статус пробы	Результат, полученный в валидируемой тест-системе, Ct (трактовка результата)
1	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	14,21 (положительный)
2	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	14,47 (положительный)
3	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	16,16 (положительный)
4	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	18,49 (положительный)
5	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	21,81 (положительный)
6	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	19,56 (положительный)
7	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	23,33 (положительный)
8	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	24,04 (положительный)
9	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	22,98 (положительный)
10	образец РНК вируса SARS-CoV-2	положительная	23,21 (положительный)

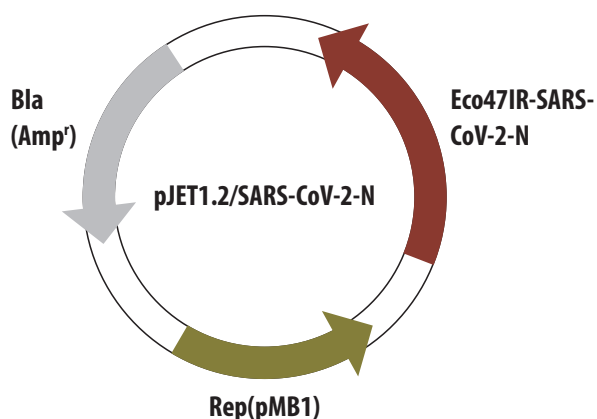


Рис. 2. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pJET1.2/SARS-CoV-2-N

Fig. 2. Physical map of the recombinant plasmid pJET1.2/SARS-CoV-2-N

стадию с использованием смеси реактивов для ПЦР и ферментов. Выделение РНК из анализируемых проб осуществляют любым удобным способом или коммерческим набором. В соответствующие пробы вносят образцы отрицательного и положительного контролей.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линии, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов. Результат считают положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную сигмовидную форму и пересекает пороговую линию.

В настоящее время имеется много сообщений о случаях обнаружения вируса SARS-CoV-2 у животных (норки, хорьки, кошки, собаки и др.), появляю-



Рис. 3. Тест-система для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР-РВ»

Fig. 3. "SARS-CoV-2 real-time RT-PCR test kit" for detection of SARS-CoV-2 RNA in animal biological samples using real-time polymerase chain reaction

Таблица 2
Исследование биоматериала от травоядных животных на наличие SARS-CoV-2 с использованием набора «SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР-РВ»

Table 2
Testing biological samples collected from herbivorous animals for SARS-CoV-2 using "SARS-CoV-2 real-time RT-PCR test kit"

Вид животных	Количество исследованных проб	Количество положительных проб
свиньи	980	0
кабаны	174	0
крупный рогатый скот	220	0
мелкий рогатый скот	20	0
дикие парнокопытные (лоси, олени, изюбры, косули, яки, антилопы, зубры, туры, маралы, сайгаки, горные козлы, кабарги, дзерены и др.)	638	0

ся сведения о выявлении вируса среди травоядных животных (олени). При внедрении разработанного метода был использован имеющийся в обширных количествах биоматериал (носовые смывы, пищеводно-глоточная жидкость, внутренние органы, кровь) от свиней, крупного и мелкого рогатого скота, диких парнокопытных, но ни в одном случае выявить SARS-CoV-2 у представителей данных видов не удалось (табл. 2). Не удалось также обнаружить РНК вируса в образцах мясной продукции, полуфабрикатах и смывах с их упаковки.

С использованием разработанной тест-системы в 2020–2021 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводились скрининговые исследования в популяциях животных из 20 регионов РФ с целью выявления РНК вируса SARS-CoV-2. Как показали полученные результаты, опубликованные ранее [11], из 1466 проб биоматериала от различных видов животных только в одном случае в ротоглоточном мазке, отобранном у домашней кошки в г. Тюмени, была выявлена РНК SARS-CoV-2. Ни в одной из проб биологического материала от травоядных животных геном нового коронавируса обнаружен не был. Таким образом, использование разработанной тест-системы «SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР-РВ» показало, что у домашних животных-компаньонов есть вероятность обнаружения SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработан метод обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 с помощью ПЦР-РВ, определены валидационные характеристики метода, на его основе разработана тест-система «SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР-РВ» и оформлена в виде набора. С использованием данной тест-системы проанализирован большой объем образцов от животных разных видов. Предлагаемая тест-система внедрена в ветеринарную практику для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биоматериале от животных с целью постановки и уточнения диагноза, для решения научно-исследовательских задач, проведения мониторинга распространения вируса SARS-CoV-2 у животных. Полученные характеристики тест-системы соответствуют критериям, предъявляемым к качественным лабораторным методам исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhou P, Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579 (7798): 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Gorbalenya A. E., Baker S. C., Baric R. S., de Groot R. J., Drosten C., Gulyaeva A. A. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5 (4): 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- Kiros M., Andualem H., Kiros T., Hailemichael W., Getu S., Geteneh A., et al. COVID-19 pandemic: current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission. *Viol. J.* 2020; 17 (1):143. DOI: 10.1186/s12985-020-01416-9.
- Ciotti M., Ciccozzi M., Terrinoni A., Jiang W. C., Wang C. B., Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2020; 57 (6): 365–388. DOI: 10.1080/10408363.2020.1783198.
- Hsieh W. H., Cheng M. Y., Ho M. W., Chou C. H., Lin P. C., Chi C. Y., et al. Featuring COVID-19 cases via screening symptomatic patients with epidemiologic link during flu season in a medical center of central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53 (3): 459–466. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.008.
- do Vale B., Lopes A. P., Fontes M. D. C., Silvestre M., Cardoso L., Coelho A. C. Bats, pangolins, minks and other animals – villains or victims of SARS-CoV-2? *Vet. Res. Commun.* 2021; 45 (1): 1–19. DOI: 10.1007/s11259-021-09787-2.
- Cui J., Li F., Shi Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17 (3): 181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- Ning S., Yu B., Wang Y., Wang F. SARS-CoV-2: origin, evolution, and targeting inhibition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:676451. DOI: 10.3389/fcimb.2021.676451.
- Wang M. Y., Zhao R., Gao L. J., Gao X. F., Wang D. P., Cao J. M. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:587269. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- Farag E. A., Islam M. M., Enan K., El-Hussein A. M., Bansal D., Haroun M. SARS-CoV-2 at the human-animal interphase: A review. *Heliyon*. 2021; 7 (12):e08496. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08496.
- Никонова З. Б., Овчинникова Е. В., Щербакова Л. О., Козлов А. А., Жестков П. Д., Зиняков Н. Г. и др. Выявление возбудителя COVID-19 у животных в 2020–2021 гг. *Молекулярная диагностика: X Юбилейная международная научно-практическая конференция (9–11 ноября, 2021 г.)*. М.: Юлиус; 2021; 2: 379–380. eLIBRARY ID: 47983412.
- Акимова Т. П., Семкина В. П., Митрофанова М. Н., Жильцова М. В., Выставкина Е. С., Исакова Д. Г. и др. Распространение коронавируса SARS-CoV-2 среди людей и животных. *Ветеринария сегодня*. 2021; (2): 88–96. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-88-96.
- Parolin C., Virtuoso S., Giovanetti M., Angeletti S., Ciccozzi M., Borsetti A. Animal hosts and experimental models of SARS-CoV-2 infection. *Chemotherapy*. 2021; 66 (1–2): 8–16. DOI: 10.1159/000515341.
- Meekins D. A., Gaudreault N. N., Richt J. A. Natural and experimental SARS-CoV-2 infection in domestic and wild animals. *Viruses*. 2021; 13 (10):1993. DOI: 10.3390/v13101993.
- Michelitsch A., Wernike K., Ulrich L., Mettenleiter T. C., Beer M. SARS-CoV-2 in animals: From potential hosts to animal models. *Adv. Virus. Res.* 2021; 110: 59–102. DOI: 10.1016/bs.aivir.2021.03.004.
- Sharun K., Dhama K., Pawde A. M., Gortázar C., Tiwari R., Bonilla-Aldana D. K., et al. SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Vet. Q.* 2021; 41 (1): 181–201. DOI: 10.1080/01652176.2021.1921311.
- Prince T., Smith S. L., Radford A. D., Solomon T., Hughes G. L., Patterson E. I. SARS-CoV-2 infections in animals: reservoirs for reverse zoonosis and models for study. *Viruses*. 2021; 13 (3):494. DOI: 10.3390/v13030494.
- Maurin M., Fenollar F., Mediannikov O., Davoust B., Devaux C., Raoult D. Current status of putative animal sources of SARS-CoV-2 infection in humans: wildlife, domestic animals and pets. *Microorganisms*. 2021; 9 (4):868. DOI: 10.3390/microorganisms9040868.
- Hossain M. G., Javed A., Akter S., Saha S. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2021; 54 (2): 175–181. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.06.006.
- Dhar B. C. Diagnostic assay and technology advancement for detecting SARS-CoV-2 infections causing the COVID-19 pandemic. *Anal. Bioanal. Chem.* 2022; 414 (9): 2903–2934. DOI: 10.1007/s00216-022-03918-7.
- Kabir M. A., Ahmed R., Iqbal S. M. A., Chowdhury R., Paulmurugan R., Demirci U., Asghar W. Diagnosis for COVID-19: current status and future prospects. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2021; 21 (3): 269–288. DOI: 10.1080/14737159.2021.1894930.
- Chen Q., He Z., Mao F., Pei H., Cao H., Liu X. Diagnostic technologies for COVID-19: a review. *RSC Adv.* 2020; 10 (58): 35257–35264. DOI: 10.1039/d0ra06445a.
- Filchakova O., Dossym D., Ilyas A., Kuanysheva T., Abdizhamil A., Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022; 244:123409. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123409.
- Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. K., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25 (3):2000045. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- Long C., Xu H., Shen Q., Zhang X., Fan B., Wang C., 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.
- Kevadiya B. D., Machhi J., Herskovitz J., Oleynikov M. D., Blomberg W. R., Bajwa N., et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat. Mater.* 2021; 20 (5): 593–605. DOI: 10.1038/s41563-020-00906-z.
- Smyrlaki I., Ekman M., Lentini A., Rufino de Sousa N., Papanicolaou N., Vondracek M., et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat. Commun.* 2020; 11 (1):4812. DOI: 10.1038/s41467-020-18611-5.
- Грибанов О. Г., Щербаков А. В., Перевозчикова Н. А., Гусев А. А. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид и РНК. *Биохимия*. 1996; 61 (6): 1064–1070. Режим доступа: https://biochemistry.moscow.com/ru/archive/1996/61-06-1064/#_pdf.
- Носырев П., Носырева М., Расказова Т., Корнеева Н. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория и практика. *Ремедиум*. 2003; 10: 69–71; 11: 62–64.
- Поляков И. В., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике. М.: Медицина; 1975. 151 с.

REFERENCES

- Zhou P, Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579 (7798):270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Gorbalenya A. E., Baker S. C., Baric R. S., de Groot R. J., Drosten C., Gulyaeva A. A. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5 (4): 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- Kiros M., Andualem H., Kiros T., Hailemichael W., Getu S., Geteneh A., et al. COVID-19 pandemic: current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission. *Viol. J.* 2020; 17 (1):143. DOI: 10.1186/s12985-020-01416-9.
- Ciotti M., Ciccozzi M., Terrinoni A., Jiang W. C., Wang C. B., Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2020; 57 (6): 365–388. DOI: 10.1080/10408363.2020.1783198.
- Hsieh W. H., Cheng M. Y., Ho M. W., Chou C. H., Lin P. C., Chi C. Y., et al. Featuring COVID-19 cases via screening symptomatic patients with epidemiologic link during flu season in a medical center of central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53 (3): 459–466. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.008.
- do Vale B., Lopes A. P., Fontes M. D. C., Silvestre M., Cardoso L., Coelho A. C. Bats, pangolins, minks and other animals – villains or victims of SARS-CoV-2? *Vet. Res. Commun.* 2021; 45 (1): 1–19. DOI: 10.1007/s11259-021-09787-2.
- Cui J., Li F., Shi Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17 (3): 181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- Ning S., Yu B., Wang Y., Wang F. SARS-CoV-2: origin, evolution, and targeting inhibition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:676451. DOI: 10.3389/fcimb.2021.676451.
- Wang M. Y., Zhao R., Gao L. J., Gao X. F., Wang D. P., Cao J. M. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:587269. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- Farag E. A., Islam M. M., Enan K., El-Hussein A. M., Bansal D., Haroun M. SARS-CoV-2 at the human-animal interphase: A review. *Heliyon*. 2021; 7 (12):e08496. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08496.
- Nikonova Z. B., Ovchinnikova E. V., Scherbakova L. O., Kozlov A. A., Zhestkov P. D., Zinyakov N. G., et al. Vyyavlenie vozбудitelya COVID-19 u zhivotnykh v 2020–2021 gg. = COVID-19 agent detection in animals in 2020–2021. *Молекулярная диагностика: X Юбилейная международная научно-практическая конференция (9–11 ноября, 2021 г.)*. = *Molecular Diagnosis: X Anniversary International Research-to-Practice Conference (9–11 November 2021)*. Moscow: Yulius; 2021; 2: 379–380. eLIBRARY ID: 47983412. (in Russ.)
- Акимова Т. П., Семкина В. П., Митрофанова М. Н., Жильцова М. В., Выставкина Е. С., Исакова Д. Г., et al. SARS-CoV-2 spread in humans and animals. *Veterinary Science Today*. 2021; (2): 88–96. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-88-96.
- Parolin C., Virtuoso S., Giovanetti M., Angeletti S., Ciccozzi M., Borsetti A. Animal hosts and experimental models of SARS-CoV-2 infection. *Chemotherapy*. 2021; 66 (1–2): 8–16. DOI: 10.1159/000515341.

14. Meekins D. A., Gaudreault N. N., Richt J. A. Natural and experimental SARS-CoV-2 infection in domestic and wild animals. *Viruses*. 2021; 13 (10):1993. DOI: 10.3390/v13101993.
15. Michelitsch A., Wernike K., Ulrich L., Mettenleiter T. C., Beer M. SARS-CoV-2 in animals: From potential hosts to animal models. *Adv. Virus Res.* 2021; 110: 59–102. DOI: 10.1016/bs.aivir.2021.03.004.
16. Sharun K., Dhama K., Pawde A. M., Gortázar C., Tiwari R., Bonilla-Aldana D. K., et al. SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Vet. Q.* 2021; 41 (1): 181–201. DOI: 10.1080/01652176.2021.1921311.
17. Prince T., Smith S. L., Radford A. D., Solomon T., Hughes G. L., Patterson E. I. SARS-CoV-2 infections in animals: reservoirs for reverse zoonosis and models for study. *Viruses*. 2021; 13 (3):494. DOI: 10.3390/v13030494.
18. Maurin M., Fenollar F., Mediannikov O., Davoust B., Devaux C., Raoult D. Current status of putative animal sources of SARS-CoV-2 infection in humans: wildlife, domestic animals and pets. *Microorganisms*. 2021; 9 (4):868. DOI: 10.3390/microorganisms9040868.
19. Hossain M. G., Javed A., Akter S., Saha S. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2021; 54 (2): 175–181. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.06.006.
20. Dhar B. C. Diagnostic assay and technology advancement for detecting SARS-CoV-2 infections causing the COVID-19 pandemic. *Anal. Bioanal. Chem.* 2022; 414 (9): 2903–2934. DOI: 10.1007/s00216-022-03918-7.
21. Kabir M. A., Ahmed R., Iqbal S. M. A., Chowdhury R., Paulmurugan R., Demirci U., Asghar W. Diagnosis for COVID-19: current status and future prospects. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2021; 21 (3): 269–288. DOI: 10.1080/14737159.2021.1894930.
22. Chen Q., He Z., Mao F., Pei H., Cao H., Liu X. Diagnostic technologies for COVID-19: a review. *RSC Adv.* 2020; 10 (58): 35257–35264. DOI: 10.1039/d0ra06445a.
23. Filchakova O., Dossym D., Ilyas A., Kuanysheva T., Abdizhamil A., Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022; 244:123409. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123409.
24. Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. K., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25 (3):2000045. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
25. Long C., Xu H., Shen Q., Zhang X., Fan B., Wang C., 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.
26. Kevadiya B. D., Machhi J., Herskovitz J., Oleynikov M. D., Blomberg W. R., Bajwa N., et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat. Mater.* 2021; 20 (5): 593–605. DOI: 10.1038/s41563-020-00906-z.
27. Smyrlaki I., Ekman M., Lentini A., Rufino de Sousa N., Papanicolaou N., Vondracek M., et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat. Commun.* 2020; 11 (1):4812. DOI: 10.1038/s41467-020-18611-5.
28. Gribanov O. G., Shcherbakov A. V., Perevozchikova N. A., Gusev A. A. The use of Aerosil A-300 and GF/F (GF/C) filters for purification of DNA fragments, plasmid DNA and RNA. *Biochemistry (Moscow)*. 1996; 61 (6): 1064–1070. Available at: https://biochemistry.moscow.com/ru/archive/1996/61-06-1064/#_pdf. (in Russ.)
29. Nosyrev P., Nosyreva M., Rasskazova T., Korneeva N. Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika = GMP Workshop. Validation of analytical methods: theory and practice. *Remedium*. 2003; 10: 69–71; 11: 62–64. (in Russ.)
30. Polyakov I. V., Sokolova N. S. Practical guide on medical statistics. Leningrad: Meditsina; 1975. 151 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 28.07.2022

Поступила после рецензирования / Revised 30.09.2022

Принята к публикации / Accepted 04.10.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимина Анна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru.

Яковлева Анастасия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva@arriah.ru.

Тиманов Максим Викторович, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7496-3043>, e-mail: timanov@arriah.ru.

Бирюченкова Марина Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9131-8839>, e-mail: biruchenkova@arriah.ru.

Орлова Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0568-2680>, e-mail: orlova@arriah.ru.

Anna M. Timina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru.

Anastasia S. Yakovleva, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva@arriah.ru.

Maksim V. Timanov, Leading Veterinarian, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7496-3043>, e-mail: timanov@arriah.ru.

Marina V. Biryuchenkova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9131-8839>, e-mail: biruchenkova@arriah.ru.

Yelena S. Orlova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0568-2680>, e-mail: orlova@arriah.ru.