



Всемирная организация
здравоохранения

Европейское региональное бюро

Методы обнаружения и описания вариантов SARS-CoV-2 – первое обновление

20 декабря 2021 г.

Обновленная информация

- Обновлена библиография для имеющихся тест-систем.
- Включены сведения о тест-системах для анализа на варианты «дельта» и «омикрон».
- Глава об экспресс-тестах для выявления антигенов дополнена информацией о списке тестов, взаимно признаваемых в странах ЕС/ЕЭЗ, составленном Комитетом по безопасности в области здравоохранения.

Резюме

За последний год появилось несколько вариантов, вызывающих обеспокоенность (ВВО), и мониторинг их циркуляции во всех странах является ключевой задачей. Полногеномное секвенирование (ПГС) или как минимум полное или частичное секвенирование гена S – это наилучший метод описания конкретного варианта. Для раннего выявления и расчёта распространённости ВВО, вариантов, вызывающих интерес (ВВИ), и вариантов, требующих дальнейшего мониторинга, разработаны и другие методы, в т. ч. тест-системы для диагностического скрининга на основе методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК). Многие из этих методов также позволяют точно идентифицировать указанные варианты, а другие требуют подтверждения как минимум некоторого подмножества образцов путём секвенирования.

Стратегии тестирования должны быть гибкими и поддаваться быстрой адаптации с учётом изменений эпидемиологической ситуации в Европейском регионе ВОЗ, местной эпидемиологической ситуации, популяционной динамики и имеющихся ресурсов. Рациональный выбор образцов и методов является ключевым фактором успешной реализации стратегии тестирования и сильно зависит от конкретных целей общественного здравоохранения, которые призвана решить стратегия тестирования. К конкретным задачам относится оценка циркуляции различных вариантов SARS-CoV-2 среди местного населения, отбор репрезентативных выборок для секвенирования, определение генетических характеристик для мониторинга эволюции вируса и формирование доказательной базы для принятия решений о составе вакцин или анализа вспышек. При использовании тест-систем на основе ПЦР необходимо провести подтверждающее секвенирование как минимум некоторого подмножества вирусов, чтобы эти результаты анализа можно было использовать как показатели циркуляции ВВО среди населения. Перед внедрением нового метода тестирования или новой тест-системы необходимо провести валидацию и проверку, чтобы подтвердить, что лабораторная тест-система способна надёжно выявлять циркулирующие вирусы. Результаты необходимо своевременно (желательно еженедельно) передавать в Европейскую систему эпиднадзора (TESSy), последовательности – в Глобальную инициативу по обмену данными о гриппе (GISAID) или иную общедоступную базу данных, а исходные данные, если они доступны – в Европейский архив нуклеотидов (ENA).

Настоящий документ был разработан техническими экспертами ECDC и Европейского регионального бюро ВОЗ и прошел рецензирование экспертами специализированных лабораторий ВОЗ и Рабочей группы по характеристике SARS-CoV-2.

Изначально издано Европейским центром профилактики и контроля заболеваний / Европейским региональным бюро ВОЗ в Стокгольме/Копенгагене на английском языке под заглавием «Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants – first update. 20 December 2021».

Образец библиографической ссылки. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний / Европейское региональное бюро Всемирной организации здравоохранения. Методы обнаружения и описания вариантов SARS-CoV-2 – первое обновление. 20 декабря 2021 г. Стокгольм/Копенгаген: ECDC/Европейское региональное бюро ВОЗ: 2021 г.

© Всемирная организация здравоохранения и Европейский центр профилактики и контроля заболеваний, 2022. Некоторые права защищены. Эта работа доступна по лицензии Creative Commons Attribution-3.0 IGO (CC BY-3.0 IGO); Creative Commons — Attribution 3.0 IGO — CC BY 3.0 IGO). Европейское региональное бюро ВОЗ несет ответственность за точность перевода документа на русский язык.

Номер документа: WHO/EURO:2022-2148-41903-62834

Основные тезисы

- В последние месяцы появилось несколько новых ВВО, и мониторинг их циркуляции во всех странах является важнейшей задачей для предотвращения и контроля распространения этих ВВО.
- Полногеномное секвенирование SARS-CoV-2, или как минимум полное или частичное секвенирование гена S, следует использовать для подтверждения заражения конкретным вариантом и для описания этого варианта.
- Для раннего выявления и расчёта распространённости ВВО (или при ограниченности возможностей по секвенированию) следует использовать альтернативные методы, в т. ч. диагностические скрининговые тест-системы на основе МАНК. Для сдерживания ВВО или отсрочки его завоза желательно проводить скрининг положительных образцов с помощью тест-систем на основе МАНК, к преимуществам которых относится быстрое получение результатов.
- При использовании методик на основе МАНК для описания как минимум некоторого подмножества вариантов следует использовать секвенирование.
- При низкой распространённости ВВО среди населения, а также если необходимо отсрочить завоз и распространение ВВО, желательно подтверждать секвенированием все полученные с помощью МАНК результаты, указывающие на ВВО.
- Ключевое значение имеет выбор образцов и методов, который зависит от целей (например, оценка циркуляции различных вариантов SARS-CoV-2 с использованием выборок, репрезентативных для местного населения, или определение генетических характеристик для мониторинга эволюции вируса и обоснования решений, принимаемых о составе вакцин, или анализа вспышек).
- Валидация тест-системы необходима для подтверждения того, что работа лабораторной системы проведения анализов соответствует картине циркуляции вирусов.
- Лабораториям следует сохранять бдительность, чтобы обеспечить выявление снижения чувствительности или неспособности выявлять/идентифицировать циркулирующие варианты с помощью различных тест-систем на основе ПЦР или выявления антигенов.
- Если диагностический потенциал системы здравоохранения недостаточен, то приоритетными должны считаться тяжёлые случаи, смертельные случаи и случаи с подозрением на высокую контагиозность вызвавшего вспышку возбудителя, особенно среди привитых или переболевших COVID-19.
- Консенсусные последовательности SARS-CoV-2 следует передавать в GISAID или иные общедоступные базы данных. Кроме того, необработанные последовательности следует предоставлять в Европейский архив нуклеотидов (ENA).
- Уведомления об обнаружении новых ВВО или вспышек циркулирующих в настоящее время ВВО следует немедленно направлять посредством Системы раннего предупреждения и реагирования (EWRS), а сведения о случаях обнаружения вариантов следует направлять в TESSy еженедельно.

Введение

За последний год появилось несколько ВВО SARS-CoV-2, и мониторинг их циркуляции во всех странах является ключевой задачей [1]. Геномика – единственный способ идентифицировать и охарактеризовать новые варианты и однозначно типировать имеющиеся варианты. Чтобы подтвердить инфекцию конкретным вариантом, требуется секвенирование целого генома SARS-CoV-2 или как минимум всего гена S либо его части. Рекомендации по секвенированию SARS-CoV-2 приведены в техническом руководстве ECDC по секвенированию SARS-CoV-2, документе ВОЗ «Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health» [«Руководство по достижению максимальной эффективности геномного секвенирования SARS-CoV-2 в целях общественного здравоохранения»] и документе ВОЗ «SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals: Interim guidance» «Геномное секвенирование SARS-CoV-2 для целей общественного здравоохранения. Временные рекомендации» [2–4]. Кроме того, ECDC опубликовал документ Guidance on representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring [«Руководство по репрезентативному и целенаправленному мониторингу геномной информации SARS-CoV-2»], в котором приведены дополнительные сведения о стратегии отбора и секвенирования образцов [5].

В некоторых случаях задержка при получении результатов ПГС может препятствовать надлежащему реагированию системы общественного здравоохранения (например, отслеживанию контактов) и расчёту распространённости различных вариантов в местном сообществе в реальном

времени. Секвенирование гена S по Сэнгеру в некоторых ситуациях может быть более практичным и своевременным, чем ПГС.

Для раннего выявления и расчёта распространённости ВВО, ВВИ и вариантов, требующих дальнейшего мониторинга [1] ценны альтернативные методы, в т. ч. диагностические скрининговые тест-системы на основе МАНК, дающие результаты за несколько часов, с последующей проверкой/подтверждением путём секвенирования. Лабораториям следует сохранять бдительность, чтобы обеспечить выявление снижения чувствительности или неспособности зафиксировать циркуляцию новых вариантов из-за несоответствия последовательностей праймеров/зондов.

Область применения и цели

В настоящем техническом отчете приводятся рекомендации для лабораторий, специалистов по микробиологии и заинтересованных сторон относительно создания или наращивания возможностей и потенциала по обнаружению и идентификации циркулирующих вариантов SARS-CoV-2. Кроме того, они облегчат принятие решений относительно используемых технологий и целей их использования.

Цель данного документа – представить имеющиеся методы (скрининг и секвенирование) обнаружения и описания циркулирующих вариантов SARS-CoV-2. Кроме того, в этом документе вкратце описаны проблемы оценки качества, а также изложены соображения относительно выбора типа образцов и методов и представления результатов исходя из различных целей тестирования.

Настоящий документ дополнен ссылками на более актуальную библиографию и информацией об имеющихся тест-системах для выявления и описания новых ВВО (например, вариантов «дельта» и «омикрон» SARS-CoV-2).

Секвенирование

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование (ПГС) необходимо для идентификации, мониторинга и оценки вариантов вируса, которые могут быть более способны к распространению и сопряжены с более тяжелым течением заболевания либо оказывают отрицательное влияние на меры общественного здравоохранения и социальные меры контроля. При использовании подхода на основе расположенных «встык» ампликонов или метода дробного секвенирования можно отсекуировать весь геном вируса и сравнить его с другими циркулирующими штаммами [2]. ПГС можно эффективно использовать для выявления ВВО, так как оно представляет собой объективный метод, для которого не требуется информация о наличии определённых мутаций в вирусном геноме.

Эпидемиологический надзор за SARS-CoV-2 по образцам сточных вод можно проводить с помощью ПГС. Хотя оно может быть полезным инструментом для оценки распространённости SARS-CoV-2, извлечение информации на уровне варианта является сложной задачей и требует использования специализированных алгоритмов применения инструментов биоинформатики. Результаты следует интерпретировать с осторожностью, особенно в случае вариантов, выявляемых в малой доле случаев (менее 5%).

ПГС – относительно ресурсозатратный метод: для получения результатов, в зависимости от алгоритма, может потребоваться от нескольких часов до нескольких дней. Помимо прочего, необходимо учесть вопросы хранения данных и биоинформационной поддержки. Рекомендации по внедрению ПГС приведены в техническом руководстве ECDC по секвенированию SARS-CoV-2 и документах ВОЗ Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health [«Руководство по достижению максимальной эффективности геномного секвенирования SARS-CoV-2 в целях общественного здравоохранения»] и «Геномное секвенирование SARS-CoV-2 для целей общественного здравоохранения. Временные рекомендации» [2–4]. Дополнительные рекомендации относительно стратегии отбора и секвенирования образцов для обеспечения репрезентативности и надёжности результатов приведены также в документе ECDC Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2

monitoring [«Руководство по репрезентативному и целенаправленному мониторингу геномной информации SARS-CoV-2»] [5].

В вышеупомянутом руководстве ECDC указано, что для точного определения и мониторинга распространенности ВВО и для оценки уровня циркуляции известных ВВО в местном сообществе необходимо еженедельно секвенировать репрезентативное количество положительных образцов, обеспечивающее точность 1–2,5%. При появлении ВВО, который необходимо сдержать или завоз которого в Европу необходимо отсрочить, ECDC рекомендует странам активизировать деятельность по секвенированию и секвенировать количество образцов, позволяющее выявлять такой вариант при уровне распространенности 1%. В подобной ситуации (раннее выявление ВВО, сдерживание и отсрочка распространения) также важно повысить приоритетность целевого отбора образцов у случаев, связанных с поездками, или как минимум у всех лиц, которые ранее совершали поездки (в течение 14 дней до положительного результата теста) в регионы с подозрением на широкомасштабное распространение ВВО или с неясной эпидемиологической ситуацией. Тем не менее это должно лишь дополнять вышеописанный репрезентативный отбор образцов. Кроме того, секвенирование следует проводить в случае тяжелого течения заболевания, при реинфекциях и вспышках.

Иногда некоторые ампликоны конкретных тест-систем могут не позволить выявить определённые циркулирующие ВВО из-за несовпадения праймеров и целевых участков. Это может привести к ложноотрицательным результатам для остатков шиповидного белка. Так, анализ *in silico* показал, что ампликон 76 протокола ARTIC v4 потенциально не подходит для выявления ВВО «омикрон» из-за несовпадения праймера и целевой последовательности, что может приводить к ложноотрицательным результатам для остатков шиповидного белка 417, 440 и 446. Если этот участок не охвачен, то для идентификации упомянутого варианта могут использоваться другие характерные мутации. Уже выпущена обновленная версия протокола ARTIC – версия 4.1, призванная устранить проблему несовпадения праймеров и целевых участков варианта «омикрон» (ARTIC v4.1).

Секвенирование по Сэнгеру или методы частичного секвенирования нового поколения на основе ампликонов

Учитывая множество характерных мутаций некоторых ВВО, их можно идентифицировать на основании частичных последовательностей S-гена. Желательно, чтобы такие последовательности включали в себя рецептор-связывающий домен (RBD), однако для заключения о том, что вирус относится к конкретному варианту, можно использовать любой участок, охватывающий достаточное количество характерных мутаций. Особое внимание следует уделять наличию однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) известных мутаций, приводящих к изменению биологических характеристик вируса. Альтернативными методами идентификации ВВО могут служить секвенирование по Сэнгеру и метод секвенирования нового поколения (СНП) на основе ампликонов, применяемый к избранным фрагментам вирусного генома. Благодаря этим методам можно провести целевое секвенирование всего или части гена S. Этот метод СНП сопряжён с теми же сложностями доступа к оборудованию и биоинформационного анализа, что и ПГС. Разработаны алгоритмы специфичной ОТ-ПЦР для маркерных фрагментов участка гена S, указывающих на различные ВВО, с последующим секвенированием [6]. Такие алгоритмы (в т. ч. и для варианта «омикрон») опубликованы на платформе ВОЗ EZCollab и доступны для скачивания национальными лабораториями общественного здравоохранения [22]. Если предпочтительным методом является секвенирование по Сэнгеру, то подлежащий секвенированию участок должен охватывать как минимум весь N-конечный участок и RBD (аминокислоты 1–541, 1623 п. н.), чтобы можно было надёжно отличить циркулирующие варианты друг от друга. В секвенируемом участке должны иметься характеристические мутации, позволяющие идентифицировать вариант. Желательно отсеквенировать аминокислоты 1–800 гена S (2400 п. н.) или весь ген S, чтобы захватить сайт рестрикции S1/S2 и другие значимые участки. Характерные для вариантов аминокислотные замены опубликованы в обновленном списке ВВО, ВВИ и ВТДМ, опубликованном ECDC [1].

ECDC и ВОЗ могут оказать странам поддержку в связи с проведением ПГС и биоинформационного анализа. За дополнительными сведениями обращайтесь по адресу covid.microbiology@ecdc.europa.eu или euinfluenza@who.int.

Скрининговые тест-системы для диагностики известных ВВО

Тест-системы на основе ОТ-ПЦР и несоответствие целевому гену S

В качестве золотого стандарта для выявления SARS-CoV-2 обычно используются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), основанные на ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). В таких тестах на основе ОТ-ПЦР для амплификации может использоваться один или несколько целевых генов.

Для некоторых ВВО SARS-CoV-2 (например, «альфа» [B.1.1.7] и «омикрон» [B.1.1.529]) в мультиплексных анализах методом ОТ-ПЦР характерен отрицательный или существенного более слабый результат для гена S при положительных результатах для других мишеней. Это использовалось в качестве индикаторного или скринингового метода для выявления данных конкретных вариантов. Ослабленный сигнал или полное несоответствие целевому гену S обусловлено делецией нуклеотидов 207–212 ($\Delta 69-70$) соответствующего гена и известно как несоответствие целевому гену S (S-gene target failure, НЦГ S). По случайному совпадению, это явление проявляется в некоторых тест-системах, в которые в качестве целевого включён ген S (например, ThermoFisher TaqPath), но не во всех [3,7–9]. В частности, вариант «альфа» и большинство представителей варианта «омикрон» дают положительный сигнал в ОТ-ПЦР, в которых целевыми являются ORF1 и ген N, но не ген S [10].

Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) выпустило список молекулярных тестов, на которые могут повлиять мутации варианта «омикрон» SARS-CoV-2 [11]. Аналогично, Объединённый исследовательский центр (ОИЦ) отслеживает рабочие характеристики тест-систем на основе ОТ-ПЦР и публикует сведения на информационной панели ОИЦ [17]. Лабораториям настоятельно рекомендуется проверять эффективность используемых протоколов по информационной панели, сведения которой основаны на анализе *in silico*. Следует отметить, что проблема НЦГ S актуальна не только для вариантов «альфа» и «омикрон». Поэтому наличие НЦГ S может как указывать на другие варианты, не относящиеся к ВВО, так и не позволять выявить некоторые другие ВВО (включая сублинию ВА.2 «омикрон»). Само по себе НЦГ S не позволяет идентифицировать конкретные варианты. Кроме того, в образцах с высокими значениями Ct картина НЦГ S может проявляться по случайности, сопровождаясь слабым сигналом и для других целевых участков. Образцы с более низкими Ct (т. е. менее 30) поддаются более надёжной оценке. Пороговое значение можно выбрать исходя из того, используется ли НЦГ S для скрининга с целью выявления отдельных случаев на ранней стадии (с последующим секвенированием всех положительных образцов) или в качестве косвенного критерия в условиях распространённости положительного на НЦГ S ВВО (например, «омикрон»). В первом случае следует максимизировать чувствительность, а во втором важнее специфичность, поэтому пороговое значение можно выбрать более консервативно. НЦГ S желательно использовать в качестве индикатора в тех случаях, когда конкретный ВВО уже циркулирует с высокой распространённостью в конкретных условиях, и необходимо быстро получить результаты лабораторного анализа, либо когда возможности по секвенированию ограничены. Настоятельно рекомендуется проводить подтверждение делеции нуклеотидов 207–212 ($\Delta 69/70$) путём секвенирования, особенно в условиях низкой распространённости. Однако вне зависимости от распространённости, как минимум некоторое подмножество образцов с НЦГ S (т. е. как минимум 10% или другую долю – исходя из имеющихся ресурсов) следует исследовать путём секвенирования. Это необходимо для повышения степени уверенности в результатах и их достоверности и требует тщательного мониторинга. В условиях циркуляции других вариантов с той же делецией, не относящихся, однако, к ВВО, необходимо секвенирование всех случаев НЦГ S.

Для оценки региональной корреляции между НЦГ S и конкретным ВВО можно рассмотреть возможность увеличения количества секвенируемых образцов, отбираемых по НЦГ S при скрининге, так как эта корреляция варьируется в зависимости от того, какие варианты циркулируют в данном регионе [12]. Если степень корреляции очень высока, то в качестве приблизительной характеристики встречаемости ВВО с делецией в гене S можно использовать НЦГ S.

Следует отметить, что описаны сублинии варианта «омикрон», у которых имеются общие мутации с сублинией ВА.1 «омикрон» [13]; однако вирусы сублинии ВА.2 не являются носителями мутации $\Delta 69-70$, поэтому их идентификация с помощью тест-систем, регистрирующих НЦГ S, невозможна. Кроме того, имеется очень малое число последовательностей вирусов, не относящихся к линии

«омикрон», но являющихся носителями мутации Δ69-70 и поэтому дающих положительный результат на НЦГ S. Вышеуказанные факты подчёркивают важность секвенирования для описания SARS-CoV-2.

Мультиплексная ОТ-ПЦР в сочетании с анализом на несоответствие целевому гену S

При использовании многоканального устройства для ОТ-ПЦР в реальном времени нормальные тесты на E и/или N и/или ORF-1 можно сочетать с анализами на ген S, чтобы скрининг на ВВО можно было включить в обычный алгоритм действий в рамках единого цикла [14].

Важно подчеркнуть, что результатам не следует придавать чрезмерно большое значение; их нужно проверять и постоянно подтверждать методами геномики.

Тест-системы скрининга на ОНП

Скрининг на специфичные для ВВО аминокислотные замены можно проводить с помощью специфических тест-систем на базе ОТ-ПЦР, нацеленных на однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), присутствующие у некоторых ВВО [14]. При этом потребуются соответствующие положительные контрольные образцы. Этот метод позволяет быстро оценить распространенность среди местного населения вариантов, положительных на специфические мутации.

Следует отметить, что существуют аминокислотные замены (например, N501Y), присутствующие сразу в нескольких линиях SARS-CoV-2, которые не относятся к циркулирующим в настоящее время ВВО. При этом несколько циркулирующих в настоящее время ВВО имеют общие мутации. Таким образом, как минимум некоторое подмножество образцов необходимо проверять путём секвенирования.

Важно подчеркнуть, что имеющиеся тест-системы для выявления ОНП (например, тест-системы на ОНП N501Y) могут не выявлять / не идентифицировать новые варианты, в которых данный ОНП (например, N501Y) присутствует, из-за аминокислотных замен в участках, влияющих на связывание праймера/зонда. В частности, для варианта «омикрон» наблюдалось, что некоторые коммерчески доступные тест-системы на ОНП для выявления замен T478K, N501Y и R681H неспособны надёжно выявлять эти мутации несмотря на то, что данный вариант является носителем указанных мутаций в гене S [11]. Разработаны новые тест-системы для идентификации варианта «омикрон» [15, 16]. Лабораториям следует сохранять бдительность, чтобы обеспечить выявление снижения чувствительности или неспособности конкретных тест-систем идентифицировать ВВО.

ОИЦ Европейской комиссии [17] разработал специализированную методику для выявления варианта «омикрон» с помощью МАНК; в настоящее время идёт её проверка [18]. Специфические тест-системы для выявления варианта «омикрон» также разработаны, а их описания опубликованы в виде препринтов [10,19].

Таблица 1. Аминокислотные замены/делеции/инсерции, использующиеся для скрининга на различные ВВО SARS-CoV-2 (неполный перечень)

Изменения аминокислот шиповидного белка	Альфа В.1.1.7	Бета В.1.351	Гамма В.1.1.28	Дельта В.1.617	Омикрон В.1.1529*
ΔН69-V70	x				x
ins214EPE					x
S371L/S373P					x
L452R				x	
N501Y	x	x	x		x
K417T			x		
K417N		x			(x)
E484K		x	x		
E484Q	(x)				
E484A					x
P681H	x				x
P681R				x	
T478K				x	

Важное примечание: несоответствие праймеров/зондов на соседних участках варианта «омикрон» (или иного) могут привести к невозможности выявить аминокислотную замену, даже если в данном варианте эта замена присутствует. Поэтому рекомендуется проводить проверку для выявления/описания характеристик новых вариантов.

(x): Данная аминокислотная замена присутствует в некоторых последовательностях ВВО.

** Некоторые из аминокислотных замен отличаются для сублиний «омикрон» ВА.1 и ВА.2 (например, S371L/S373P выявляет только вирусы сублинии ВА.1).*

Скрининг на однонуклеотидные полиморфизмы путём анализа кривой плавления при специфичной ОТ-ПЦР в реальном времени

Многие платформы для ОТ-ПЦР позволяют проводить анализ кривой плавления. Разработаны коммерческие тест-системы, с помощью которых можно использовать этот метод генотипирования для идентификации определенных аминокислотных замен (например, ΔН69/V70, S371L/S373P, K417N, N439K, Y453F, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H или V1176F). Такие тест-системы можно использовать для идентификации ВВО.

Таблица 2. Перечень имеющихся тест-систем/протоколов для идентификации варианта «омикрон» SARS-CoV-2 (неполный перечень)

Коммерческая тест-система или собственная разработка	Аминокислотная замена гена шиповидного белка	Методология	Библиография
TIB MolBiol	S371L/S373P	Кривая плавления	[15,16]
TIB MolBiol	ins214EPE	Кривая плавления	[15,16]
TIB MolBiol	E484A	Кривая плавления	[15,16]
Thermo Fisher TaqPath	ΔH69/V70	НЦГ S	[20]
Seegene	E484A, N501Y, ΔH69/V70	ОТ-ПЦР	[21]
ОИЦ	Несколько мишеней	ОТ-ПЦР – идёт проверка	[18]
Центральная вирусологическая лаборатория Министерства здравоохранения Израиля и Израильский институт биологических исследований	nsp6 (Orf1a)	Тест-система на основе ОТ-ПЦР – на 16 декабря 2021 г.	[10]
Университетская клиника Женевы	Два частичных участка гена S	ОТ-ПЦР и секвенирование по Сэнгеру	[22]
Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия)	Делеция ORF1	ОТ-ПЦР	[23]
Государственный институт сывороток (Дания)	ПЦР на 4 мишени, специфичные для варианта «омикрон»	ОТ-ПЦР	[19]

Петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией и транскрипционная изотермическая амплификация

Петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (RT-LAMP) и транскрипционная амплификация (TMA) на аппаратах Panther Hologic стала альтернативным методом молекулярного обнаружения для выявления SARS-CoV-2. Метод RT-LAMP имеет ряд преимуществ, среди которых более быстрое получение результатов теста и меньшая ресурсоёмкость при сохранении высокой чувствительности и специфичности, хотя имеющиеся в настоящее время методики не позволяют отличать конкретные ВВО друг от друга [24]. Однако некоторые методики (например, LamPORE) дают потенциальную возможность перехода к секвенированию.

Для оценки этих новых методов и оценки роли, которую они могут сыграть в разных условиях, необходимы надлежащие валидационные клинические исследования.

Экспресс-тесты на выявление антигенов

Экспресс-тесты на выявление антигенов (АГ-ДЭТ) могут внести вклад в общий потенциал тестирования на SARS-CoV-2 благодаря таким преимуществам, как меньший срок получения результата и меньшие затраты, особенно при ограниченном потенциале тестирования с помощью МАНК. Однако их чувствительность как правило ниже, чем у ОТ-ПЦР [25]. АГ-ДЭТ способны выявлять наличие SARS-CoV-2 (включая варианты вирусы), но не позволяют идентифицировать ВВО и различать их. Однако они могут помочь снизить дальнейшее распространение за счёт раннего выявления случаев с высокой контагиозностью, что позволяет быстро приступить к отслеживанию контактов. Комитет по безопасности в области здравоохранения ЕС создал техническую рабочую группу по диагностическим тестам на COVID-19, которая отвечает за составление и постоянное обновление единого перечня АГ-ДЭТ на COVID-19, соответствующих определённым критериям эффективности [26].

Несмотря на появление новых вариантов вирусов, на данный момент сообщений о снижении чувствительности АГ-ДЭТ не поступало [25]. Предварительные результаты экспресс-оценки, проведённой Фондом инновационных новых методов диагностики (FIND), указывают на то, что появление варианта «омикрон» не повлияло на точность АГ-ДЭТ [27]. Более того, первоначальная лабораторная проверка устройств для иммунохроматографии, проведённая в рамках программы тестирования и отслеживания НСЗ (Национальной службы здравоохранения Соединённого Королевства), позволила выяснить, что чувствительность при выявлении варианта «омикрон» схожа с чувствительностью в отношении варианта «дельта» [28]. Следует отметить, что АГ-ДЭТ в основном рассчитаны на выявление вирусного белка N, который в случае варианта «омикрон», по-видимому, отличается не так сильно, как шиповидный белок. Более широкомасштабные исследования АГ-ДЭТ для варианта «омикрон» в условиях активного распространения пока не проводились. В настоящее время ведутся дополнительные исследования, а лабораториям следует сохранять бдительность, чтобы выявить возможное снижение чувствительности используемых АГ-ДЭТ в отношении различных ВВО.

Реакции нейтрализации и описание антигенных характеристик

ВВИ и ВВО необходимо подвергать более тщательному изучению в рамках процесса оценки рисков с рассмотрением различных элементов риска (например, увеличения способности к распространению, заболеваемости/смертности среди прошедших вакцинацию против COVID-19 и переболевших COVID-19 или ускользания от действия вакцин). Чтобы лаборатории могли оценить, насколько хорошо антитела, выработавшиеся как элемент гуморального иммунного ответа на естественную инфекцию и как элемент вакцинного иммунитета, могут защищать от циркулирующих вирусов, важно проводить реакцию нейтрализации вируса с использованием реконвалесцентной плазмы/сыворотки инфицированных и вакцинированных людей. Для оценки антигенных характеристик циркулирующих вариантов при этих реакциях следует использовать международные стандарты (см. ниже).

Разработано множество лабораторных методов, позволяющих определять потенциал нейтрализации вируса. К примерам таковых относятся реакция подавления бляшкообразования (РПБО), реакция микронейтрализации и реакция нейтрализации псевдовирусов [29–31]. Анализы с использованием изолятов SARS-CoV-2, способных к репликации, обычно проводятся либо в виде реакции подавления бляшкообразования/фокусообразования, либо в виде анализов, основанных на TCID₅₀ (медианной цитопатогенной дозе). Однако у них есть существенный недостаток: работа с ними возможна только в лабораториях уровня биобезопасности (УББ) 3 и часто весьма трудоёмка. С другой стороны, анализы, в которых используются неспособные к репликации псевдовирусы, можно проводить в условиях УББ-2, однако для последних необходимо иметь псевдовирусы, специфичные для изучаемого варианта. Так как для всех реакций нейтрализации требуются живые клетки, то их сложнее стандартизировать, чем молекулярные анализы. Таким образом, важнейшим этапом является проверка робастности этих анализов [32]. Сопоставление четырёх различных типов тест-систем, основанных на реакции нейтрализации, показало, что эти тест-системы на базе нейтрализации SARS-CoV-2 робастны. Их результаты сопоставимы, а получаемые титры нейтрализации обладают высокой воспроизводимостью [32, 33]. Кроме того, показано прекрасное соответствие между суррогатной реакцией нейтрализации вируса и золотым стандартом – РПБО [29].

Для оценки нейтрализационного потенциала сывороток в различных ситуациях, связанных с пациентами, в панели сыворотки можно включать образцы сыворотки бессимптомных, симптоматических и выздоравливающих пациентов после тяжёлого заболевания, отбираемые с различной периодичностью (например, через 14 суток после появления симптомов или отбора образца в случае бессимптомной инфекции, а также через 3–6 месяцев или позднее), при их доступности для лаборатории, где проводится тестирование. В случае сыворотки привитых можно охватить следующие сроки и схемы вакцинации: 14 дней и 3–6 месяцев после второй дозы и 14 дней либо 3–6 месяцев после ревакцинации. Кроме того, для сравнения было бы желательно охватить сыворотки после гетерологичных прививки и ревакцинации или заражения с последующей прививкой любой вакциной.

Лаборатории, работающие над реакциями нейтрализации и в силу этого культивирующие вирусы SARS-CoV-2, должны учитывать, что последовательная культивация вариантов SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 или клетках иных типов может привести к мутациям сайта расщепления фурином,

которые влияют на особенности роста и поведения вируса *in vitro* или *in vivo*. Распространение нежелательных мутаций можно снизить путём выращивания вирусов в таких клетках, как Vero/hSLAM, и частого подтверждения последовательностей (рекомендуются методы глубокого секвенирования) [34].

Для сравнения результатов реакций нейтрализации с другими лабораториями на международном уровне следует использовать Международный стандарт антител ВОЗ (MC BO3) или, если он недоступен, так называемый рабочий реагент NIBSC (21/234) или эталонная сыворотка с высоким титром (20/150) [29, 35–37]. Следует отметить, что MC BO3 по-разному взаимодействует с каждым вариантом, поэтому при предоставлении любых данных, в которых проводится сравнение с MC BO3, всегда следует указывать, какой вариант анализируется. В тест-системы на основе реакции нейтрализации важно включать представителей штаммов, относящихся к различным вариантам (аналогам уханьского, D614G, «альфа», «бета», «гамма» и «дельта»); как минимум желательно включать D614G, «альфа», «бета» и «дельта»). Кроме того, тесты желательно проводить с двумя или тремя повторениями.

В ряде исследований с помощью различных тест-систем на основе реакции нейтрализации уже рассматривались антигенные свойства ВВИ и ВВО – например, вариантов SARS-CoV-2 501Y.V2 [38], «альфа» [39], «бета» [40], «дельта» [41], «эта» [40], «гамма» [42] и «лямбда» [39]. Характеристики тест-систем для варианта «омикрон» также опубликованы, хотя и без рецензирования [43, 44]. Дополнительные тесты на В-лимфоциты и Т-лимфоциты позволяют получить более детальную информацию об иммунном ответе на различные ВВО.

Страны ЕС/ЕЭЗ, которым требуется поддержка в начале эксплуатации тест-систем для определения антигенных свойств или которые желали бы направлять образцы для определения антигенных свойств, могут обращаться по адресу covid.microbiology@ecdc.europa.eu, а не входящие в ЕС/ЕЭЗ страны могут обращаться с теми же целями по адресу euinfluenza@who.int. Референс-лаборатории Европейского региона ВОЗ по COVID-19 могут предоставлять странам поддержку в определении антигенных характеристик; перечень референс-лабораторий приведён на сайте ВОЗ¹. Результаты определения антигенных характеристик новых ВВО следует немедленно передавать в Европейское региональное бюро ВОЗ и ECDC.

Соображения по поводу выбора типа образцов и методов

Стратегии тестирования должны быть адаптивными и предусматривать возможность их быстрого приспособления к местной эпидемиологической ситуации, динамике численности населения, а также к местному ресурсному обеспечению. Вопросы формирования выборки и выбора методов являются ключевыми и зависят от указанных ниже целей.

- Своевременное тестирование людей с симптомами остаётся важным условием быстрого принятия мер профилактики инфекций и инфекционного контроля. Ему можно содействовать, расширяя доступность тестирования и популяризируя практику обращения за тестированием в кратчайшие сроки после появления симптомов. Целенаправленный отбор образцов для идентификации ВВО (например, в связи с поездками, при вспышках, госпитализации, реинфекции) важен для раннего выявления и принятия ответных мер.
- Для сдерживания или отсрочки завоза и распространения нового ВВО в местном сообществе можно проводить секвенирование или скрининг для раннего обнаружения циркулирующих ВВО одним из вышеуказанных методов. Для этого необходимы условия, обеспечивающие быстрое получение результатов.
- Для сдерживания ВВО или отсрочки завоза новых ВВО в местное сообщество рекомендуется использовать тест-системы на основе МАНК для скрининга положительных образцов на наличие ВВО. Преимущество тест-систем на основе МАНК состоит в быстром получении результатов, что позволяет немедленно принимать меры общественного здравоохранения.
- Для идентификации ВВО может проводиться сплошной или выборочный скрининг образцов, положительных на SARS-CoV-2. Скрининг лиц, совершающих поездки, неэффективен для сдерживания завоза нового варианта, однако при необходимости сдержать или отсрочить завоз и распространение нового ВВО в Европе из других частей света желательно проводить скрининг или секвенирование всех случаев, связанных с поездками. При использовании методики на основе

¹ Список референс-лабораторий ВОЗ, проводящих подтверждающее тестирование на COVID-19, находится по адресу: <https://www.who.int/publications/m/item/who-reference-laboratories-providing-confirmatory-testing-for-covid-19>

- МАНК все образцы (при спорадическом выявлении или низкой распространённости ВВО) или как минимум некоторое подмножество образцов в рамках скрининга (если ВВО уже распространился в местном сообществе) следует отобрать для дальнейшего подтверждающего секвенирования.
- Согласно методическим рекомендациям по секвенированию ECDC [5], еженедельно следует формировать репрезентативную выборку, позволяющую выявлять варианты при распространённости 1–2,5%. Это поможет оценить уровень циркуляции известных вариантов в местном сообществе.
 - Для замедления распространения новых ВВО ECDC рекомендует корректировать объём секвенирования, чтобы обеспечить выявление при распространённости 1%, в соответствии с методическими рекомендациями ECDC по секвенированию [5]. Кроме того, следует активизировать секвенирование случаев, связанных с поездками, особенно в регионы с передачей новых ВВО в местных сообществах.
 - Если процесс отбора образцов не является репрезентативным, например, отбор образцов для секвенирования основан на образцах для подтверждения при скрининге на НЦГ S, то результаты секвенирования могут быть смещены. Для тестирования репрезентативных выборок предпочтение следует отдать секвенированию; однако скрининговые методы также могут быть полезны, так как быстрое получение результата важно для обоснования принимаемых мер общественного здравоохранения.
 - Чтобы использовать скрининговый метод в качестве показателя ситуации в целом, для оценки доли вирусов с несоответствием целевому гену S можно применять секвенирование, либо выявление образцов, положительных на ВВО, другими скрининговыми методами.
 - Параллельно следует проводить ПГС для определения генетических характеристик вируса с целью мониторинга эволюции вируса. Для этого следует собирать образцы у людей с длительными/хроническими инфекциями и тяжёлыми инфекциями, охватывающими весь спектр форм заболевания и различные демографические категории, при реинфекциях, зоонозных инфекциях и вспышках [2].
 - В зависимости от имеющихся ресурсов, ПГС может преследовать и дополнительные задачи, в т. ч. анализ вспышек, филодинамический анализ и другие научные исследования.
 - Может потребоваться секвенирование вирусов из регионов, где заболеваемость в целом повышена, для первоначальной идентификации новых ВВО.
 - Для мониторинга антигенных свойств циркулирующих вирусов и их соответствия вакцинам, следует оценивать репрезентативную выборку вирусов с помощью реакции нейтрализации в национальных или международных референс-лабораториях. Дополнительные тесты на В-лимфоциты и Т-лимфоциты позволят получить более детальную информацию об иммунном ответе на различные ВВО.

Рекомендации по отбору образцов и расчёту минимального количества вирусов, подлежащих секвенированию в целях эпиднадзора, приведены в документе ECDC «Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring» [«Руководство по репрезентативному и целенаправленному мониторингу геномной информации SARS-CoV-2»] [5].

Оценка качества

Перед внедрением нового метода тестирования или новой тест-системы необходимо провести валидацию и проверку, чтобы подтвердить, что рабочие технологии лабораторной тест-системы позволяют выявлять циркулирующие вирусы. В лабораториях должна быть внедрена система гарантии качества; им также рекомендуется участвовать во внешних схемах оценки качества или проводить межлабораторное сопоставление результатов анализа некоторого подмножества образцов [45]. В 2022 г. ECDC и Европейское региональное бюро ВОЗ планируют провести молекулярную внешнюю оценку качества для национальных референс-лабораторий по COVID-19. За дополнительной информацией обращайтесь по адресу covid.microbiology@ecdc.europa.eu.

Геномика является наилучшим инструментом для идентификации новых вариантов. Диагностическим лабораториям необходимо сохранять бдительность, чтобы обнаруживать любые несоответствия между праймерами и зондами для МАНК (например, ОТ-ПЦР и анализов на ОНП) и геномами циркулирующих вирусов, а также способностью к выявлению вирусов в других тестах, в частности, АГ-ДЭТ, и адаптировать методики секвенирования по Сэнгеру. Подавляющее большинство сайтов связывания праймеров/зондов в коммерческих тест-системах широкой публике неизвестны. Важно отметить случайную природу того факта, что тест-системы, целевым для которых является ген S, могут использоваться как вспомогательное средство скрининга на

некоторые варианты. Для всех тест-систем крайне важно отслеживать возможные случаи неоптимальной работы и информировать производителя коммерческой тест-системы и международные сети здравоохранения, противодействующие SARS-CoV-2, ECDC и Европейское региональное бюро ВОЗ о любых проблемах, относящихся к той или иной тест-системе.

ОИЦ отслеживает рабочие характеристики тест-систем на основе ОТ-ПЦР и публикует сведения на информационной панели ОИЦ². Лабораториям настоятельно рекомендуется проверять эффективность используемых протоколов по информационной панели ОИЦ. FIND также проводит независимые исследования по оценке для подтверждения предела обнаружения (ПО); результаты публикуются на сайте фонда³ [46].

Отчетность о результатах

Специалисты по обработке данных национальных органов общественного здравоохранения в регистрирующих странах должны еженедельно передавать отчетность о случаях инфекции SARS-CoV-2 в Европейскую систему эпиднадзора (TESSy) с использованием наиболее актуальной версии протокола предоставления отчетности о COVID-19 [47]. Отчетность об обнаружении подозрительного сигнала, связанного с линиями SARS-CoV-2 или вспышками циркулирующих в настоящее время ВВО или вариантов, считающихся значимыми регистрирующей страной, следует немедленно направлять посредством Системы раннего предупреждения и реагирования (EWRS) и ММСП, а сведения о случаях обнаружения вариантов следует направлять в TESSy еженедельно.

Последовательности SARS-CoV-2 следует своевременно (т. е. желательно в течение одной недели после отбора образца) передавать в GISAID или иные общедоступные базы данных. Исходные данные, при их наличии, следует депонировать на портале данных о COVID-19⁴ посредством Европейского архива нуклеотидов (ENA)⁵.

Переменные для предоставления отчетности о вариантах (т. е. VirusVariant) реализованы в типах записей TESSy для сводных (NCOVARIANT) данных и данных по отдельным случаям (NCOV). Результаты, касающиеся НЦГ S, следует передавать с использованием соответствующего кодированного значения. В типе записи NCOV для данных по отдельным случаям следует указывать в том числе идентификатор последовательности (идентификатор GISAID). Исходные данные секвенирования и номера добавления в ENA/Sequence Read Archive (SRA), при их наличии, также следует передавать в TESSy, для чего заполняется соответствующая переменная. Кроме того, следует передавать все имеющиеся эпидемиологические данные, в том числе об условиях получения образца, о том, получен ли образец в рамках репрезентативной выборки или целевого эпиднадзора, является ли случай завозным или приобретенным в местных условиях и/или о вероятной стране заражения (некоторые переменные можно указать только используя тип записи для данных об отдельных случаях – подробные указания см. в протоколе предоставления отчетности) [47]. Это позволит проводить более точный анализ и интерпретацию данных путём выявления репрезентативных случаев, отражающих распространённость вариантов в местном сообществе.

За содействием в выгрузке в базу данных TESSy обращайтесь по адресу tessy@ecdc.europa.eu. За помощью в интерпретации/предоставлении отчетности о результатах секвенирования обращайтесь по адресу covid.microbiology@ecdc.europa.eu.

Лабораторная поддержка

ECDC и Европейское региональное бюро ВОЗ координируют оказание поддержки странам Европейского региона ВОЗ. ECDC поддерживает наращивание потенциала в области секвенирования и проведения реакций нейтрализации среди государств-членов ЕС/ЕЭЗ. За дополнительной информацией обращайтесь по адресу covid.microbiology@ecdc.europa.eu. Страны, желающие получать поддержку от Европейского регионального бюро ВОЗ, могут обращаться по

² Информационная панель ОИЦ находится по адресу: https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices#form_content

³ Веб-сайт FIND: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>

⁴ Портал данных о COVID-19: <https://www.covid19dataportal.org/>

⁵ Европейский архив нуклеотидов (ENA): <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/submit>

адресу euinfluenza@who.int.

К эталонным вирусам для реакций нейтрализации, конструктам для анализов с использованием псевдовирюсов и контрольным материалам для анализов с помощью МАНК можно получить доступ посредством ресурса European Virus Archive Global (EVAg) и через Национальный институт биологических стандартов и контроля (NIBSC) [35,48]. В настоящее время ВОЗ также организует центр BioHub⁶ с целью обмена материалами.

Обмен информацией и протоколами

Европейское региональное бюро ВОЗ совместно с ECDC создали платформу обмена алгоритмами действий/информацией EZCollab для обмена протоколами, связанными с COVID-19. Регистрацию можно пройти по следующему адресу: https://ezcollab.who.int/euroflu/flulab/covid19_protocols.

Список экспертов, принявших участие в подготовке настоящего документа

Эксперты ECDC, участвовавшие в разработке документа (в алфавитном порядке): Erik Alm, Benjamin Bluemel, Eeva Broberg, Theresa Enkirch, Csaba Kodmon, Annette Kraus, Katrin Leitmeyer, Angeliki Melidou.

Эксперты Европейского регионального бюро ВОЗ, участвовавшие в разработке документа (в алфавитном порядке): Алина Гусейнова, Nataliya Jorgensen, Marco Marklewitz, Karen Nahapetyan, Richard Pebody, Maja Stanojevic.

Авторы, аффилированные с Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), несут единоличную ответственность за взгляды, выраженные в данной публикации, которые не обязательно совпадают с решениями и стратегическими принципами ВОЗ.

Выражение признательности: мы хотели бы выразить благодарность членам совместной рабочей группы ECDC/ЕРБ ВОЗ по определению характеристик вирусов и сотрудникам референс-лабораторий ВОЗ по COVID-19 за проведенное ими рецензирование настоящего документа (в алфавитном порядке): Александр Агафонов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзор (Российская Федерация); Emmi Andersson, Агентство общественного здравоохранения (Швеция); Mia Brytting, Агентство общественного здравоохранения (Швеция); Annasara Carnahan, Агентство общественного здравоохранения (Швеция); Antonino Di Caro, Международный университет медицинских наук им. Святого Камилла (Италия); Olav Hungnes, Норвежский институт общественного здравоохранения (Норвегия); John Pettersson, Агентство общественного здравоохранения (Швеция); Maximilian Riess, Агентство общественного здравоохранения (Швеция).

Эксперты, участвовавшие в разработке документа, подписали и предоставили уведомление об интересах, предусмотренное механизмом деятельности Совместной рабочей группы Европейского регионального бюро ВОЗ и ECDC по характеристике SARS-CoV-2 (VCWG) и референс-лабораторий ВОЗ. Каких-либо конфликтов интересов у составителей настоящего документа выявлено не было.

⁶ Центр ВОЗ BioHub описан по адресу: <https://www.who.int/initiatives/who-biohub>

Библиография

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). SARS-CoV-2 variants of concern as of 14 December 2021. Stockholm: ECDC; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Sequencing of SARS-CoV-2: first update 18 January 2021. Stockholm: ECDC; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Sequencing-of-SARS-CoV-2-first-update.pdf>
3. World Health Organization (WHO). Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. 8 January 2021. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338480>
4. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Геномное секвенирование SARS-CoV-2 для целей общественного здравоохранения. Временные рекомендации, 8 января 2021 г. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338483/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1-rus.pdf
5. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring. 20 May 2021. Stockholm: ECDC; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Guidance-for-representative-and-targeted-genomic-SARS-CoV-2-monitoring-updated-with%20erratum-20-May-2021.pdf>
6. Université de Genève and Hôpitaux Universitaires de Genève. Protocol for specific RT-PCRs for marker regions of the Spike region indicative of the UK SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 and the South African variant 501Y.V2 2021. URL: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/laboratoire_de_virologie/protocol_amplification_voc_20201201_uk_geneva.pdf
7. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. . Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B. 1.1. 7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. 4 January 2021. URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.30.20249034v1.full>
8. US Food and Drug Administration (US FDA). Genetic Variants of SARS-CoV-2 May Lead to False Negative Results with Molecular Tests for Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care Providers. 8 January 2021. URL: <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negative-results-molecular-tests-detection-sars-cov-2>
9. Dudas G, Hong SL, Potter BI, Calvignac-Spencer S, Niatou-Singa FS, Tombolomako TB, et al. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineage B.1.620 with variant of concern-like mutations and deletions. Nat Commun. 2021 Oct 1;12(1):5769. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34599175>
10. Oran E, Beth-Din A, Asraf H, Levy V, Kabat A, Mannasse B, et al. Specific detection of SARS_CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) variant by four RT-qPCR differential assays. medRxiv. 2021:2021.12.07.21267293. URL: <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2021/12/07/2021.12.07.21267293.full.pdf>
11. US Food and Drug Administration (US FDA). SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests. 2021. URL: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>
12. Vogels CBF, Alpert T, Breban M, Fauver JR, Grubaugh ND. Multiplexed RT-qPCR to screen for SARS-COV-2 B.1.1.7 variants: Preliminary results 2021. URL: <https://virological.org/t/multiplexed-rt-qpcr-to-screen-for-sars-cov-2-b-1-1-7-variants-preliminary-results/588>
13. GitHub. Proposal to split B.1.1.529 to incorporate a newly characterised sibling lineage. 6 December 2021. URL: <https://github.com/cov-lineages/pango-designation/issues/361>

14. Gulay Korukluoglu, Kolukirik M, Bayrakdar F, Ozgumus GG, Altas AB, Cosgun Y, et al. 40 minutes RT-qPCR Assay for Screening Spike N501Y and HV69-70del Mutations. 26 January 2021. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.26.428302v1.full.pdf>
15. Medical Device Network. TIB Molbiol develops new VirSNiP test kits for Omicron variant detection. 6 December 2021. URL: <https://www.medicaldevice-network.com/news/tib-molbiol-virsnip-kits-omicron-variant/>
16. F. Hoffmann-La Roche Ltd. Roche has rapidly developed additional testing options to differentiate mutations in the Omicron SARS-CoV-2 variant. 3 December 2021. URL: <https://www.roche.com/dam/jcr:d2a34e06-2552-4699-b2c3-195d93636fed/en/03122021-mr-omicron-sarscov2-variant-e.pdf>
17. EU Science Hub. Joint Research Centre (JRC). 2021. URL: <https://ec.europa.eu/jrc/en>
18. Petrillo MQ, M.; Corbisier, P.; Marchini, A.; Buttinger, G.; Van den Eede, G.;. In Silico Design of Specific Primer Sets for the Detection of B.1.1.529 SARS-CoV-2 Variant of Concern (Omicron). Zenodo. 1 December 2021 URL: <https://zenodo.org/record/5747872#.YayuytDMKbg>
19. Spiess K, Gunalan V, Marving E, Nielsen SH, Jørgensen MGP, Fomsgaard AS, et al. Rapid surveillance platforms for key SARS-CoV-2 mutations in Denmark. medRxiv. 2021:2021.10.25.21265484. URL: <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2021/10/26/2021.10.25.21265484.full.pdf>
20. Thermo Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Confirms Detection of SARS-CoV-2 in Samples Containing the Omicron Variant with its TaqPath COVID-19 Tests. 29 November 2021. URL: <https://thermofisher.mediaroom.com/2021-11-29-Thermo-Fisher-Scientific-Confirms-Detection-of-SARS-CoV-2-in-Samples-Containing-the-Omicron-Variant-with-its-TaqPath-COVID-19-Tests>
21. Seegene. Seegene's High Multiplex PCR Assay Capable of Detecting New Omicron Variant. 2021. URL: https://www.seegene.com/press_release/seegene%E2%80%99s_high_multiplex_pcr_assay_capable_of_detecting_new_omicron_variant_2021
22. EZCollab. COVID-19 protocol sharing. 2021. URL: https://ezcollab.who.int/euroflu/flulab/covid19_protocols
23. Yolshin N, Fadeev A, Komissarov A. RT-PCR protocol for the detection ORF1 11288–11296 deletion (NSP6 106-108del) in SARS-CoV-2 genome. Protocols.io; 2021. URL: <https://www.protocols.io/view/rt-pcr-protocol-for-the-detection-orf1-11288-11296-bvf9n3r6>
24. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. Science Translational Medicine. 2020;12(556):eabc7075. URL: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/scitranslmed.abc7075>
25. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. 19 November 2020. Stockholm: ECDC; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>
26. European Commission. A common list of COVID-19 rapid antigen tests; A common standardised set of data to be included in COVID19 test result certificates; and A common list of COVID-19 laboratory based antigenic assays (eighth update, 8 December 2021). URL: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/preparedness_response/docs/covid-19_rat_common-list_en.pdf
27. The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Media advisory: Current testing tools uncompromised by new COVID-19 Variant of ConcernOMICRON (B.1.1.529) 29 November 2021. URL: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2021/11/Omicron-variant_PR_FINAL-29.11.2021.pdf
28. United Kingdom Health Security Agency. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England Technical Briefing 31. 10 December 2021. URL:

https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1040076/Technical_Briefing_31.pdf

29. Perera RAPM, Ko R, Tsang OTY, Hui DSC, Kwan MYM, Brackman CJ, et al. Evaluation of a SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test for Detection of Antibody in Human, Canine, Cat, and Hamster Sera. February 2021. e02504-20]. URL: <https://jcm.asm.org/content/jcm/59/2/e02504-20.full.pdf>

30. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. Nat Protoc. 2021 Jun;16(6):3114-40. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33893470>

31. Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, et al. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. 25 June 2020. 2020/06/26:[e108].

32. Riepler L, Rössler A, Falch A, Volland A, Borena W, von Laer D, et al. Comparison of Four SARS-CoV-2 Neutralization Assays. 2021. 13]. URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/13>

33. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. 2020. 2020/03/25:[680-6].

34. Funnell SGP, Afrough B, Baczenas JJ, Berry N, Bewley KR, Bradford R, et al. A cautionary perspective regarding the isolation and serial propagation of SARS-CoV-2 in Vero cells. NPJ Vaccines. 2021 Jun 17;6(1):83. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34140522>

35. NIBSC. Biological reference materials. 2021. URL: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=21/234

36. Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency. First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 17 December 2020. URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-268.pdf>

37. Knezevic I, Mattiuzzo G, Page M, Minor P, Griffiths E, Nuebling M, et al. WHO International Standard for evaluation of the antibody response to COVID-19 vaccines: call for urgent action by the scientific community. Lancet Microbe. 26 October 2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34723229>

38. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. Nature. 2021 May;593(7857):142-6. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33780970>

39. Zuckerman N, Nemet I, Kliker L, Atari N, Lustig Y, Bucris E, et al. The SARS-CoV-2 Lambda variant and its neutralisation efficiency following vaccination with Comirnaty, Israel, April to June 2021. Euro Surveill. 2021 Nov;26(45) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34763751>

40. Arora P, Rocha C, Kempf A, Nehlmeier I, Graichen L, Winkler MS, et al. The spike protein of SARS-CoV-2 variant A.30 is heavily mutated and evades vaccine-induced antibodies with high efficiency. Cell Mol Immunol. 2021 Dec;18(12):2673-5. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34697413>

41. Davis C, Logan N, Tyson G, Orton R, Harvey WT, Perkins JS, et al. Reduced neutralisation of the Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2 variant of concern following vaccination. PLoS Pathog. 2021 Dec;17(12):e1010022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34855916>

42. Naranbhai V, Garcia-Beltran WF, Chang CC, Mairena CB, Thierauf JC, Kirkpatrick G, et al. Comparative immunogenicity and effectiveness of mRNA-1273, BNT162b2 and Ad26.COVS2.S COVID-19 vaccines. medRxiv. 2021:2021.07.18.21260732. URL: <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2021/10/13/2021.07.18.21260732.full.pdf>

43. Daniel J. Sheward D, Kim C, Pankow A, Dopico X, Martin D, Dillner J, et al. Preliminary Report - Early release, subject to modification quantification of the neutralization resistance of the Omicron Variant of Concern.2021. URL: <https://drive.google.com/file/d/1CuxmNYj5cpluxWXhjjVmuDqntxXwlfXQ/view>

44. Cele S, Jackson L, Khan K, Khoury D, Moyo-Gwete T, Tegally H, et al. SARS-CoV-2 Omicron has extensive but incomplete escape of Pfizer BNT162b2 elicited neutralization and requires ACE2 for infection 2021. URL: <https://www.ahri.org/wp-content/uploads/2021/12/MEDRXIV-2021-267417v1-Sigal.pdf>
45. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2. Временные рекомендации, 11 сентября 2020 г. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-rus.pdf>
46. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). FIND Evaluation update: SARS-COV-2 Molecular diagnostics. 2021. URL: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/>
47. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance and study protocols. 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/study-protocols>
48. European Virus Archive Global (EVAg). 2021. URL: <https://www.european-virus-archive.com/>