

## ВАЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-АНТИГЕНА ВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПНЕВМОНИИ COVID-19 В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА

Ю. С. Лебедин<sup>1</sup>✉, О. В. Лянг<sup>2</sup>, А. Г. Галстян<sup>2</sup>, А. В. Пантелеева<sup>1</sup>, В. В. Белоусов<sup>2,3</sup>, Д. В. Ребриков<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ООО «ХЕМА», Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Появившаяся в декабре 2019 г. новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, почти за год унесла жизни 2,5 млн человек. Высокая контагиозность вируса привела к его широкому и быстрому распространению по всему миру. По состоянию на февраль 2021 г. общее число заболевших достигает 111 млн человек; в РФ зарегистрировано более 4 млн случаев заражения SARS-CoV-2. Для успешной борьбы с возникшей пандемией необходимо быстро диагностировать заболевание на ранней стадии, что позволит предотвратить дальнейшее распространение этого вируса и своевременно назначать необходимое лечение. Целью работы было оценить использование нуклеокапсидного антигена (N-Ag) SARS-CoV-2 и соответствующих антител в качестве диагностических маркеров у больных пневмонией. Исследование проводили в разгар пандемии COVID-19 в Москве (Россия). В него вошли 425 экстренных пациентов с клиническими признаками пневмонии COVID-19, из которых 280 (66%) были положительны либо на сывороточный N-Ag, либо на соответствующие ему антитела. Продemonстрирована общая распространенность сероконверсии N-Ag у пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2, в течение 3–5 дней после госпитализации. Полученные результаты свидетельствуют о высокой целесообразности серодиагностики SARS-CoV-2 у экстренных больных.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, COVID-19, нуклеокапсидный антиген, сероконверсия

**Финансирование:** работа выполнена при частичной поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1789, выделенного Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

**Благодарности:** мы благодарим Наталью Усман за помощь в обсуждении.

**Вклад авторов:** Ю. С. Лебедин — разработка концепции, отбор проб, молекулярные исследования, редактирование рукописи; О. В. Лянг, А. Г. Галстян — клинические обследования, отбор проб, биохимические и молекулярные исследования; А. В. Пантелеева — молекулярные исследования; редактирование рукописи, В. В. Белоусов, Д. В. Ребриков — подготовка исследования; редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили окончательный вариант рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 2020/07 от 16 марта 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Юрий Степанович Лебедин  
9-я Парковая, д. 48, 105264, г. Москва; lebedin@xema-medica.com

**Препринт опубликован:** 25.09.2020 **DOI:** 10.1101/2020.09.24.20200303

**Статья получена:** 11.02.2021 **Статья принята к печати:** 24.02.2021 **Опубликована онлайн:** 28.02.2021

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2021.009

## THE IMPORTANCE OF DETERMINING SARS-COV-2 N-Ag SERODIAGNOSTICS FOR THE MANAGEMENT OF COVID-19 PNEUMONIA IN HOSPITAL SETTINGS

Lebedin YuS<sup>1</sup>✉, Lyang OV<sup>2</sup>, Galstyan AG<sup>2</sup>, Panteleeva AV<sup>1</sup>, Belousov VV<sup>2,3</sup>, Rebrikov DV<sup>3</sup>

<sup>1</sup> XEMA Co. Ltd., Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

A new coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus, which appeared in December 2019, has claimed the lives of 2.5 million people in almost a year. The high contagiousness of this virus has led to its wide and rapid spread around the world. As of February 2021, the total number of cases is 111 million people; more than 4 million cases of SARS-CoV-2 infection have been registered in the Russian Federation. To successfully combat the emerging pandemic, it is necessary to quickly diagnose the disease at an early stage, which will prevent the further spread of this virus and prescribe the necessary treatment on time. The aim of the work was to evaluate the use of the SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen (N-Ag) and respective antibodies as diagnostic markers in pneumonia patients. The study was conducted at the height of COVID-19 pandemic in Moscow, Russia. It included 425 emergency patients with clinical signs of COVID-19 pneumonia, of which 280 (66%) were positive for either serum N-Ag and/or its respective antibodies. We demonstrate the total prevalence of N-Ag seroconversion in SARS-CoV-2-associated pneumonia patients within 3–5 days after hospital admission. The results indicate high feasibility of SARS-CoV-2 serodiagnostics in emergency patients.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, nucleocapsid antigen, seroconversion

**Funding:** this work was partially supported by a grant № 075-15-2019-1789 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation allocated to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

**Acknowledgement:** we acknowledge Natalia Usman for helpful discussions

**Author contribution:** Lebedin YS designed the study, performed the sampling, conducted molecular studies and drafted the manuscript, Lyang OV and Galstyan AG performed the clinical examinations and sampling, conducted biochemical and molecular studies, Panteleeva AV conducted molecular studies and drafted the manuscript, Belousov VV and Rebrikov DV designed the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study protocol was reviewed and approved by the Local Ethics Committee at the Pirogov Russian State Medical University (Protocol № 2020/07 dated March 16, 2020); the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuri S. Lebedin  
9-ya Parkovaya, 48, Moscow, 105264; lebedin@xema-medica.com

**Preprint published:** 25.09.2020 **DOI:** 10.1101/2020.09.24.20200303

**Received:** 11.02.2021 **Accepted:** 24.02.2021 **Published online:** 28.02.2021

**DOI:** 10.24075/brsmu.2021.009

Иммунохимическое определение антигенов в крови широко применяют в диагностике инфекционных заболеваний. Тесты на антигемию обычно нацелены на патогены, переносимые кровью (в частности, вирусы, вызывающие хронические вирусные инфекции, включая цитомегаловирус, вирусы гепатитов В и С и вирус иммунодефицита человека [1–3]). При респираторных заболеваниях проникновение компонентов патогена (нуклеиновых кислот или белков) в нереспираторные жидкости организма возможно, но их обнаружение обычно затруднено из-за очагового характера патогенеза и его сильной связи с местным иммунитетом слизистых. Несмотря на это, некоторые респираторные инфекции можно эффективно диагностировать и контролировать путем обнаружения соответствующих антигенов в крови, например галактоманна при легочном аспергиллезе [4] и антигена *Legionella pneumophila* в моче пациентов с болезнью легионеров [5]. Кроме того, сообщалось об использовании методов иммуноанализа для лечения вирусассоциированных нозокомиальных пневмоний у пациентов отделения интенсивной терапии [4, 6]. Сывороточный нуклеокапсидный антиген (N-Ag) вируса «тяжелого острого респираторного синдрома» был описан при SARS-ассоциированной пневмонии [7, 8].

Целью работы было оценить нуклеокапсидный антиген (N-Ag) вируса SARS-CoV-2 и соответствующих антител в качестве диагностического маркера и продемонстрировать общую распространенность сероконверсии N-Ag у пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2.

#### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в Федеральном центре исследований мозга и нейротехнологий весной 2020 г. В разгар пандемии COVID-19 стационарные учреждения Центра были перепрофилированы для экстренной госпитализации и ведения пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2. В исследовании приняли участие 425 пациентов. Критерии включения: наличие клинических признаков пневмонии COVID-19 (лихорадка с сочетанием двух и более клинических признаков, включая температуру тела  $\geq 38,5$  °C, частоту дыхания  $\geq 30$  вдохов в минуту и/или  $SpO_2 \leq 93\%$ ) [9]. Образцы сыворотки крови для исследования отбирали у каждого пациента не менее двух раз; отбор проб при поступлении и при выписке проводили одновременно с обязательной процедурой рутинных анализов крови. Стационарное лечение продолжалось  $20 \pm 2$  дня. Критерии выписки включали снижение уровня С-реактивного белка при подсчете WBC в пределах нормы (выше  $4,0 \times 10^9$  л) и, в частности, наличие четкой тенденции к регрессу характерных признаков, выявленных компьютерной томографией: отсутствие новых помутнений типа «матового стекла», уменьшение выраженности соответствующих изменений в легочной ткани и/или уменьшение объема или степени консолидации помутнений типа «матового стекла» (не более трех, каждое в пределах 3 см по максимальному размеру) [10]. Качественный ОТ-ПЦР-тест для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки осуществляли при поступлении с использованием SARS-CoV-2/SARS-CoV Multiplex Real-Time PCR Detection Kit согласно протоколу производителя («ДНК-Технология»; Россия); аналитическая чувствительность прибора — 10 экземпляров на усилительную пробку, диагностическая чувствительность —

100% (95% CI: 95,6–100%), диагностическая специфичность — 100% (95% CI: 96,7–100%).

#### Кодирующая последовательность нуклеокапсидного антигена SARS-Cov-2 (N-Ag)

Кодирующую последовательность нуклеокапсидного антигена SARS-Cov-2 (N-Ag) (номер присоединения NCBI 045512.2) клонировали NdeI/XhoI в вектор pET-30b(+) Novagen (EMD Millipore, США); плазмиду расширяли в *E. coli* Top10 и трансформировали в *E. coli* Rosetta (DE3) для экспрессии N-Ag.

Условия были оптимизированы для ферментации биореактора при температуре 37 °C в 3000 мл богатой среды (дрожжевой экстракт, бактоп-пептон, глюкоза и микроэлементы). После 12-часовой инкубации культуру индуцировали 2,5 мМ имидазолом в течение 4 ч. Полученную биомассу ресуспендировали в фосфатном буферном физиологическом растворе (PBS) в соотношении 1 : 3 (масса/объем) и разрушали с помощью гомогенизатора APV-2000 (Spx Flow; США) при 1200 бар. Раствор осветляли центрифугированием при 12 000 g. Нерастворимую фракцию (тельца включения), содержащую целевой белок, последовательно промывали PBS, 2%-м Тритоном в PBS и свежей порцией PBS для удаления остаточного детергента. Белок растворяли в мочеvine (8 M) с NaCl (250 мМ) и фосфатом (50 мМ), pH 10,0. Раствор инкубировали при температуре +4 °C в течение ночи и центрифугировали при 15 000 g; собранный супернатант фильтровали и добавляли 20 мМ имидазола для предотвращения неспецифического связывания примесей. Полигистидин-меченый белок N-Ag очищали методом иммобилизованной аффинной хроматографии металлов с использованием никелевой колонки High Density Nickel #6BCL-QHNi (ABT; Испания), уравновешенной мочевиным буфером. Белок элюировали 250 мМ имидазольным буфером и стерилизовали фильтрованием через фильтры диаметром 0,45 мкм.

#### Сывороточные IgG-антитела к нуклеокапсидному антигену (N-IgG)

Сывороточные IgG-антитела к нуклеокапсидному антигену (N-IgG) определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Для этого рекомбинантный полноразмерный нуклеокапсидный антиген SARS-CoV-2, полученный в *E. coli* (XEMA; Россия), был нанесен на поверхность полистирольных микроэлементов. Сыворотки, предварительно разведенные в 100 раз в ИФА-буфере (0,1%-й Твин-20 и 1%-й гидролизованый казеин в 0,1 M PBS), помещали в лунки планшета на 30 мин при 37 °C. После трех промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия лунки подвергали воздействию конъюгата мышинных моноклональных антител XG78 против IgG человека ( $\gamma$ -цепь) с пероксидазой хрена (XEMA; Россия) в течение 30 мин. После пяти промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия связанный фермент выявляли добавлением субстрат-хромогенной смеси (субстрат ТМБ, XEMA; Россия). Развитие цвета останавливали 5%-й серной кислотой и измеряли оптическую плотность (ОП) при 450 нм в планшетном ИФА-анализаторе Multiskan MC (Thermo LabSystems; Финляндия). Внутренний контроль (стабилизированная человеческая сыворотка, содержащая специфические IgG-антитела) был включен во все планшеты с целью расчета порога положительности ОП для каждого

запуска индивидуально. Результаты выражены в виде индексов позитивности (рассчитываются как ОП искомого образца к ОП внутреннего контроля).

### Сывороточные IgM-антитела против нуклеокапсидного антигена (N-IgM)

Сывороточные IgM-антитела против нуклеокапсидного антигена (N-IgM) обнаруживали методом обратного твердофазного ИФА. Мышиное моноклональное антитело против  $\mu$ -цепи IgM человека (клон X616, XEMA; Россия) адсорбировали на поверхности полистирольных микроэлементов. Разведения сывороток (приготовленных таким же образом, как и для анализа IgG) помещали в лунки планшета на 30 мин при 37 °С. После трех промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия рабочее разведение рекомбинантного полноразмерного нуклеокапсидного антигена SARS-CoV-2, конъюгированного с пероксидазой хрена в ИФА-буфере, помещали в лунки на 30 мин при 37 °С. После пяти промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия связанный меченый антиген был обнаружен субстратом ТМБ и считыванием ОП. Расчет индекса позитивности (аналогично с анализом IgG) проводили с использованием внутреннего контроля IgM+.

### Определение сывороточного N-антигена (N-Ag)

Определение сывороточного N-антигена (N-Ag) проводили двухфазным твердофазным сэндвич-методом с использованием моноклональных антител (мкАт), любезно предоставленных компанией HyTest Ltd. (Турку; Финляндия). На поверхность микропланшет наносили мкАт NP1510. Образцы сыворотки крови или калибраторы (растворы нуклеокапсидного антигена в донорской сыворотке в диапазоне от 20 до 2000 пг/мл) инкубировали с меченым пероксидазой мкАт в рабочей концентрации (клон NP1517) в ИФА-буфере с добавлением гетерофильного реагента для элиминации иммуноглобулинов (10 мкг/мл, HIER-E-010, Фапон Biotech; Китай) в течение 2 ч при 37 °С при непрерывном перемешивании в режиме 600 об. в PST-60HL-4 шейкере-инкубаторе (Biosan; Латвия). Детекцию проводили с использованием субстрата ТМБ (XEMA; Россия) и считывания ОП. Концентрации

N-Ag определяли методом калибровочной кривой с использованием программы GraphPad (Visual Data Tools, Inc.; США). Концентрации N-Ag, превышающие верхний предел калибровочной кривой (2000 пг/мл), в расчетах и графическом представлении были показаны как 2222 пг/мл. Образцам с показаниями ОП, соответствующими значениям концентрации ниже 20 пг/мл, не имеющим разрешения от нулевого калибратора, в представленных данных условно присваивали значения 15 пг/мл.

### Статистическая обработка

Результаты обрабатывали в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.; США) и Excel 2016 (Microsoft; США).

Референтные диапазоны определяли путем анализа образцов сыворотки крови, взятых у здоровых доноров ( $n = 250$ ) до декабря 2019 г. В обоих анализах пороговые значения (cutoff) были установлены для достижения полной специфичности (ни одного из доноров не считали положительным).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имуноферментное определение сывороточного N-Ag в сочетании с соответствующими антителами подтвердило COVID-19 у 280 пациентов (66%) исследуемой когорты. ОТ-ПЦР-анализ мазков из носоглотки подтвердил COVID-19 у 76% пациентов; перехват составляет 63% и соответствует конкордации 79%.

Несколько пациентов ( $n = 21$ ; 5%) были идентифицированы как отрицательные по SARS-CoV-2 с помощью как ОТ-ПЦР-тестов, так и серодиагностики и, скорее всего, представляли собой случаи пневмоний, не ассоциированных с SARS-CoV-2. Небольшое число таких пациентов объясняется тем, что исследование проводили на пике пандемии.

Согласно полученным данным, антигемия N-Ag характерна для большинства пациентов с тяжелым течением COVID-19 (63%).

Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови в зависимости от фазы заболевания представлена на рис. 1. Во время выписки у большинства пациентов, имевших положительный уровень N-Ag при поступлении (104 из 116; 90%), уровень N-Ag в сыворотке крови стал ниже

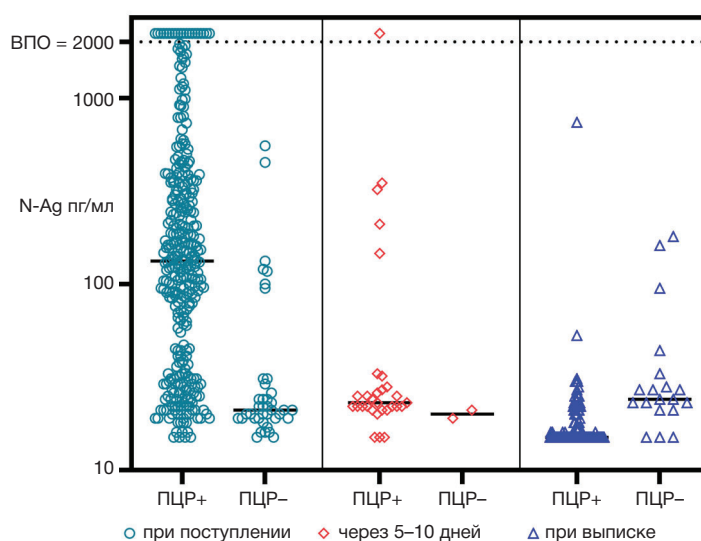
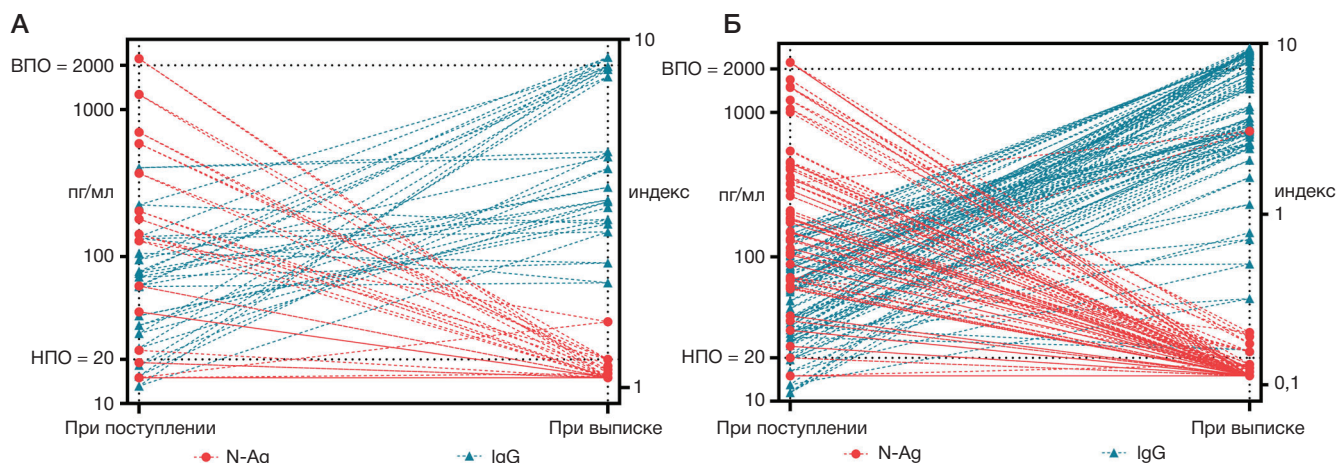


Рис. 1. Динамика уровня N-Ag в сыворотке в исследуемой когорте стационарных больных. VPO — верхний предел количественной оценки; «ПЦР+» и «ПЦР-» — относятся к состоянию пациента при поступлении



**Рис. 2.** Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови по сравнению с соответствующими IgG-антителами у пациентов IgG-серопозитивных при поступлении (А) и IgG-серонегативных при поступлении (Б). Вертикальные оси соответствуют концентрации N-Ag (слева) и индексу Ат (справа). ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения

нижней границы калибровочной кривой ( $< 20$  пг/мл; 104 из 116 пациентов, 90%). Однако некоторые пациенты имели явно положительный уровень N-Ag даже при выписке.

К моменту выписки сероконверсия была выявлена у большинства пациентов, поступивших с положительным уровнем N-Ag (108 из 116; 93%), хотя степень сероконверсии значительно варьировала.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения паттернов сероконверсии мы построили график, демонстрирующий уровни N-Ag в сыворотке крови и двух изоформ антител для отдельных случаев, разделив их на две подгруппы по Ат-серопозитивности при поступлении (рис. 2А и 3А против рис. 2Б и 3Б). Полученные результаты указывают на реципрокные паттерны для N-Ag и соответствующих антител, что характерно для классической сероконверсии. У пациентов, Ат-серонегативных при поступлении (предположительно находящихся на более ранней стадии заболевания), были выявлены более отчетливые паттерны классической сероконверсии. Паттерны IgG-антител были более выражены, чем паттерны IgM-антител в обеих группах.

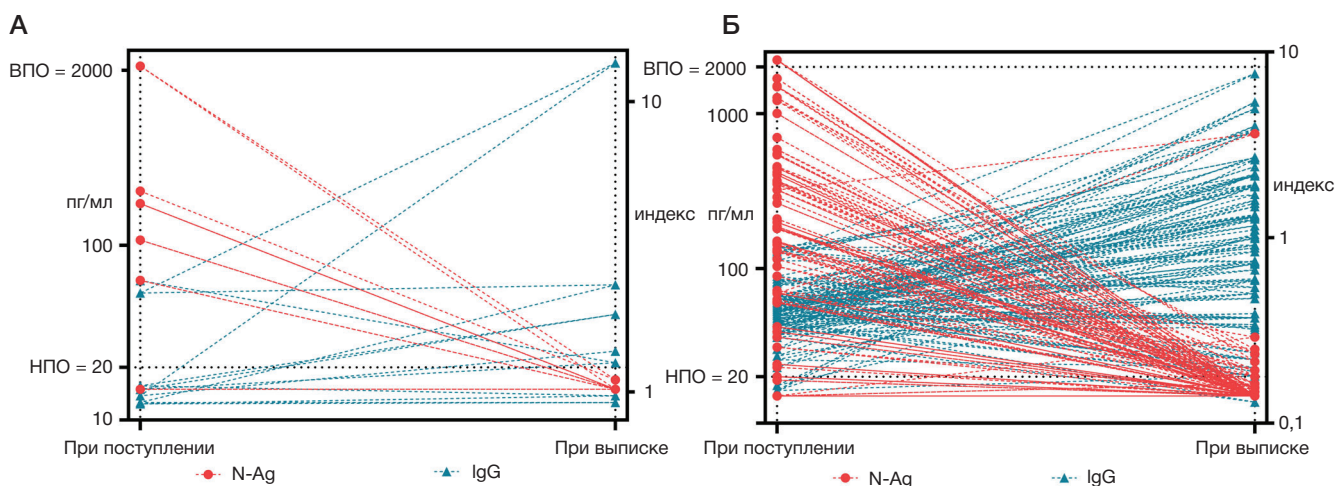
Совместное обнаружение N-Ag и анти-N-Ag антител в 92 (18%) из 503 образцов сыворотки крови показывает, что эпитоп, распознанный иммуноферментной парой,

используемой для определения антигена, по крайней мере, не полностью перекрывается (маскируется) ответом человеческого антитела.

В подгруппе из 20 пациентов мы имели возможность оценить сероконверсию в течение более короткого периода в несколько дней. Согласно результатам, в большинстве случаев переход из состояния Ag+Ат- в состояние Ag-Ат+ происходил в течение 3–5 дней после экстренной госпитализации (рис. 4).

Согласно результатам исследования, госпитализация пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2, в разгар пандемии чаще всего происходила до начала сероконверсии (т. е. на фоне обнаруживаемых концентраций N-Ag в сыворотке). У большинства пациентов антиген преобладал на момент поступления и «замаскировался» соответствующими антителами к моменту выписки. Тем не менее в некоторых случаях к моменту экстренной госпитализации уровень антител к N-Ag в крови пациента уже был высоким, что, вероятно, отражало либо отсроченную госпитализацию, либо индивидуальную вариабельность патогенеза COVID-19.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой целесообразности серодиагностики SARS-CoV-2 у экстренных больных (по аналогии с «экспресс-тестами» Capillus HIV-1/HIV-2®, Determine HIV-1/2® и др., предлагаемыми в настоящее время в качестве золотого



**Рис. 3.** Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови по сравнению с соответствующими IgG-антителами у пациентов IgM-серопозитивных при поступлении (А) и IgM-серонегативных при поступлении (Б). Вертикальные оси соответствуют концентрации N-Ag (слева) и индексу Ат (справа). ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения

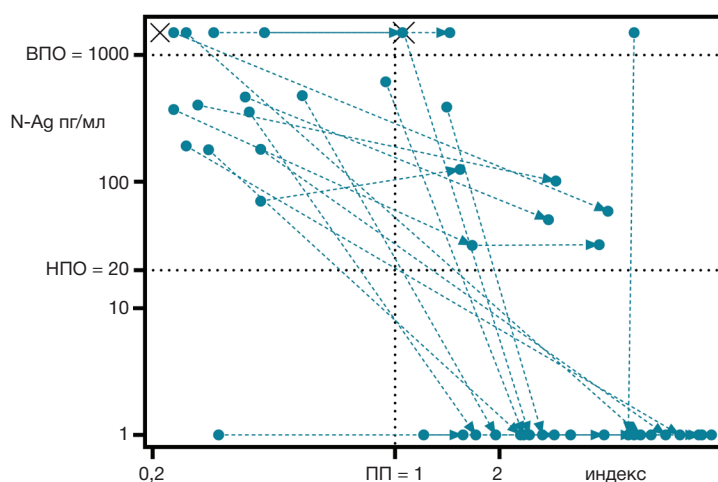


Рис. 4. Индивидуальные паттерны сероконверсии в течение 3–5 дней после поступления. ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения; ПП — порог положительности

стандарта диагностики ВИЧ вместо более дорогого и трудоемкого вестерн-блот анализа [11]). Аналогичные выводы были сделаны при исследовании небольших групп пациентов с подтвержденным SARS-CoV-2 с помощью различных методов иммунохимического анализа [12, 13].

Следует отметить, что ложноположительные результаты серодиагностики SARS-CoV-2 могут появляться у пациентов с высоким уровнем ревматоидного фактора или антител НАМА, что подчеркивает значимость персонализированной комплексной диагностики для пациентов с тяжелым течением COVID-19.

## ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о высокой актуальности проведения комбинированных тестов на определение N-антигена SARS-CoV-2 и антител к данному вирусу применительно к экстренным больным инфекционной пневмонией при поступлении, так как: 1) чувствительность и специфичность теста на N-Ag

сопоставима с таковыми у ОТ-ПЦР-анализа мазков из носоглотки, а использование иммунохимических тестов в сочетании с ПЦР-тестами на SARS-CoV-2 обеспечивает значительное повышение общей чувствительности; 2) обработка образцов крови более безопасна для персонала из-за незначительного присутствия инфекционных частиц SARS-CoV-2 в крови, в отличие от мазков из носоглотки; 3) иммунохимические тесты, как правило, быстрее в исполнении, чем ОТ-ПЦР-тесты (при учете полного цикла обработки биоматериала и пробподготовки), что ускоряет определение статуса SARS-CoV-2 для оперативного принятия решения о режиме ведения и мерах изоляции; кроме того, анализы сыворотки крови легче автоматизировать; 4) сбор образцов крови для иммуноферментной диагностики SARS-CoV-2 в условиях стационара не является дополнительной инвазивной процедурой, а проводится в рамках обязательного первичного обследования непосредственно при поступлении (а также заключительного обследования при выписке из стационара).

## Литература

1. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
2. Laing N, Tufton H, Ochola E, P'Kingston OG, Maini MK, Eason N. Hepatitis B assessment without hepatitis B virus DNA quantification: a prospective cohort study in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113 (1): 11–17. DOI: 10.1093/trstmh/try117.
3. Thai KTD, Götz H, Slingerland BCGC, Klaasse J, Schutten M, GeurtsvanKessel CH. An analysis of the predictive value of the HIV Ag/Ab screening assay within the performance characteristics of the DiaSorin LIAISON XL for the detection of blood-borne viruses. *J Clin Virol*. 2018; 102: 95–100. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.02.018.
4. Loughlin L, Hellyer TP, White PL, et al. Pulmonary Aspergillosis in Patients with Suspected Ventilator-associated Pneumonia in UK Intensive Care Units [published online ahead of print, 2020 Jul 1]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 10.1164/rccm.202002-0355OC. DOI: 10.1164/rccm.202002-0355OC.
5. Edelstein PH, Jørgensen CS, Wolf LA. Performance of the ImmView and BinaxNOW assays for the detection of urine and cerebrospinal fluid *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in patients with Legionnaires' disease or pneumococcal pneumonia and meningitis. *PLoS One*. 2020; 15 (8): e0238479. Published 2020 Aug 31. DOI: 10.1371/journal.pone.0238479.
6. Chiche L, Forel JM, Papazian L. The role of viruses in nosocomial pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24 (2): 152–56. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328343b6e4.
7. Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol*. 2004 Jun; 42 (6): 2629–35. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004.
8. Xiao-yan Che, Biao Di, Guo-ping Zhao, Ya-di Wang, Li-wen Qiu, Wei Hao, et al. A Patient with Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Antigenemia from the 2003–2004 Community Outbreak of SARS in Guangzhou, China. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43 (1): e1–e5. DOI: 10.1086/504943.
9. Приказ департамента здравоохранения города Москвы от 22 марта 2020 г. № 230 «Об утверждении регламентов (алгоритмов) работы медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы в период с 23 по 30 марта 2020 г. по оказанию медицинской помощи пациентам, заболевшим новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), и контактным с ними лицам». Доступно по ссылке: <https://rg.ru/2020/03/24/moscow-prikaz230-reg-dok.html>.

10. Приказ Департамента здравоохранения города Москвы от 06 апреля 2020 г. № 351 «О порядке выписки из медицинских организаций (стационаров), подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, пациентов с внебольничной пневмонией или коронавирусной инфекцией (COVID-19), для продолжения лечения в амбулаторных условиях (на дому)». Доступно по ссылке: <https://www.mos.ru/dzdrav/documents/department-acts/view/239550220/>.
11. Huang X, Liu X, Chen J, et al. Evaluation of Blood-Based Antibody Rapid Testing for HIV Early Therapy: A Meta-Analysis of the Evidence. *Front Immunol.* 2018; 9: 1458. Published 2018 Jun 26. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01458.
12. Le Hingrat Q, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, et al. Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection.* December 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.025.
13. Ogata AF, Maley AM, Wu C, Gilboa T, Norman M, Lazarovits R, et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease, *Clinical Chemistry.* 2020; 66 (12): 1562–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa213.

## References

1. Diocorti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* 2016; 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
2. Laing N, Tufton H, Ochola E, P'Kingston OG, Maini MK, Eason N. Hepatitis B assessment without hepatitis B virus DNA quantification: a prospective cohort study in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019; 113 (1): 11–17. DOI: 10.1093/trstmh/try117.
3. Thai KTD, Götz H, Slingerland BCGC, Klaasse J, Schutten M, GeurtsvanKessel CH. An analysis of the predictive value of the HIV Ag/Ab screening assay within the performance characteristics of the DiaSorin LIAISON XL for the detection of blood-borne viruses. *J Clin Virol.* 2018; 102: 95–100. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.02.018.
4. Loughlin L, Hellyer TP, White PL, et al. Pulmonary Aspergillosis in Patients with Suspected Ventilator-associated Pneumonia in UK Intensive Care Units [published online ahead of print, 2020 Jul 1]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 10.1164/rccm.202002-0355OC. DOI: 10.1164/rccm.202002-0355OC.
5. Edelstein PH, Jørgensen CS, Wolf LA. Performance of the ImmuView and BinaxNOW assays for the detection of urine and cerebrospinal fluid *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in patients with Legionnaires' disease or pneumococcal pneumonia and meningitis. *PLoS One.* 2020; 15 (8): e0238479. Published 2020 Aug 31. DOI: 10.1371/journal.pone.0238479.
6. Chiche L, Forel JM, Papazian L. The role of viruses in nosocomial pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24 (2): 152–56. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328343b6e4.
7. Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun; 42 (6): 2629–35. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004.
8. Xiao-yan Che, Biao Di, Guo-ping Zhao, Ya-di Wang, Li-wen Qiu, Wei Hao, et al. A Patient with Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Antigenemia from the 2003–2004 Community Outbreak of SARS in Guangzhou, China, *Clinical Infectious Diseases.* 2006; 43 (1): e1–e5. DOI: 10.1086/504943.
9. Приказ департамента здравоохранения города Москвы от 22 марта 2020 г. # 230 «Об утверждении регламентов (алгоритмов) работы медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы в период с 23 по 30 марта 2020 г. по оказанию медицинской помощи пациентам, заболевшим новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), и контактным с ними лицам». Available from: <https://rg.ru/2020/03/24/moscow-prikaz230-reg-dok.html>. Russian.
10. Приказ Департамента здравоохранения города Москвы от 06 апреля 2020 г. # 351 «О порядке выписки из медицинских организаций (стационаров), подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, пациентов с внебольничной пневмонией или коронавирусной инфекцией (COVID-19), для продолжения лечения в амбулаторных условиях (на дому)». Available from: <https://www.mos.ru/dzdrav/documents/department-acts/view/239550220/>. Russian.
11. Huang X, Liu X, Chen J, et al. Evaluation of Blood-Based Antibody Rapid Testing for HIV Early Therapy: A Meta-Analysis of the Evidence. *Front Immunol.* 2018; 9: 1458. Published 2018 Jun 26. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01458.
12. Le Hingrat Q, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, et al. Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection.* December 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.025.
13. Ogata AF, Maley AM, Wu C, Gilboa T, Norman M, Lazarovits R, et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease, *Clinical Chemistry.* 2020; 66 (12): 1562–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa213.