

ВОЗМОЖНОСТИ САЛИВАДИАГНОСТИКИ COVID-19

Курзанов А.Н.¹, Быков И.М.¹, Ледванов М.Ю.²

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар;

² ООО «Оргметодотдел АЕ»

В обзоре представлена существующая информация о клинических и научных основах потенциального использования ротовой жидкости / слюны для диагностики COVID-19 и мониторинга этого заболевания. Приведены данные о применении различных биохимических и иммунологических методов, используемых для выявления в образцах ротовой жидкости / слюны самого вируса SARS-CoV-2 по результатам исследования его РНК или антигенов, которые применяют с целью верификации диагноза COVID-19, а также для количественного определения антител против вируса SARS-CoV-2, позволяющего оценивать наличие или отсутствие иммунитета в результате продолжающегося или перенесенного заболевания. Кроме того, обсуждаются представленные в современных публикациях сведения о преимуществах и недостатках, спорных моментах и перспективах исследования слюны, которые обещают быть полезными для лучшего понимания COVID-19 и, возможно, для идентификации пациентов с различной степенью тяжести, включая бессимптомных носителей. Приведены мнения различных авторов о том, что слюна становится многообещающей альтернативой мазкам из носоглотки / ротоглотки для диагностики и мониторинга COVID-19, которые основаны на сравнительных перекрестных анализах образцов слюны и мазков из носоглотки при обнаружении РНК SARS-CoV-2. Представлены аргументы, свидетельствующие о том, что саливадиагностика COVID-19 является перспективной для прямого тестирования в условиях “по требованию” в местах социальной агрегации людей для программ массового скрининга и для анализа образцов слюны непосредственно там, где требуется тест на наличие SARS-CoV-2. В обзоре обобщаются сведения о диагностической ценности исследования слюны для выявления РНК SARS-CoV-2, приводятся факты о возможности контактной передачи этого вируса через микрокапли слюны, что, как ожидается, будет способствовать контролю над эпидемией COVID-19.

Ключевые слова: саливадиагностика, коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, ротовая жидкость, слюна, мазок из носоглотки

POSSIBILITIES OF SALIVARY DIAGNOSTICS OF COVID-19

Kurzanov A. N. ¹, Bykov I.M.¹, Ledvanov M.Yu. ²

¹ FSBEI HE «Kuban State Medical University" of the Ministry of Health of Russia», Krasnodar;

² ООО «Orgmethodotdel AE»

The survey covers existing clinical and scientific basics of potential use of oral fluid / saliva to diagnose COVID-19 and monitor this disease. The survey includes facts about the application of various biochemical and immunological methods used to detect the virus SARS-CoV-2 in samples of oral fluid / saliva basing on the RNA test results, or its antigens, which are being used to verify diagnose COVID-19, as well as to quantitatively detect antibodies to virus SARS-CoV-2, which let assess the presence or absence of immunity as a result of current or earlier infection. Moreover, the authors discuss recently published works on advantages and disadvantages, controversial points and prospects of saliva research, that promise to be useful for a better understanding of COVID-19 and for possible identification of patients with different disease severity including asymptomatic carriers. The survey quotes opinions of different authors about saliva becoming a very promising alternative to nasal / throat swabs to diagnose and monitor COVID-19, which are based on comparative cross-referencing of saliva samples and throat swabs with detected SARS-CoV-2 RNA. The authors present arguments proving, that the salivary diagnostics of COVID-19 has future in the direct testing “on demand” in the areas of human social aggregation, mass screening and testing of saliva samples on the spot if a SARS-CoV-2 test is required immediately. The survey summarizes information on the diagnostic value of saliva testing to detect SARS-CoV-2 RNA, and refers to the facts about possible contact transmission of this virus via saliva microdroplets, which is expected to help control the epidemic of COVID-19.

Keywords: salivary diagnostics, coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, oral fluid, saliva, throat swab

При подготовке данной публикации в доступной ее авторам отечественной литературе не было найдено ни одной обзорной статьи, посвященной саливадиагностике

COVID-19, что, однако, не свидетельствует об отсутствии интереса российских специалистов к этой теме, поскольку в интернете недавно появились переводы нескольких англоязычных статей, связанных с обсуждаемыми в обзоре вопросами [1-3], а также разноформатные материалы, излагающие краткие сведения по рассматриваемой теме. Стремление восполнить существующий информационный пробел побудило авторов данного обзора представить имеющиеся в доступной литературе сведения о возможностях саливадиагностики COVID-19 в предлагаемой вниманию читателей статье. Реализацию этой задачи авторы осуществляли, опираясь на 20-летний личный опыт научно-исследовательской работы в области клинической биохимии и иммунологии, включая проблемы саливадиагностики патологических состояний и вопросы функциональной активности иммунной системы при особо опасных инфекциях.

Изложению основного материала обзора, по-видимому, целесообразно предпослать несколько уточнений, касающихся используемых в научной литературе названий биоматериала, используемого для выявления SARS-CoV-2 в процессе саливадиагностики COVID-19. В проанализированной русскоязычной и англоязычной литературе чаще всего этот биоматериал называется «слюна - saliva» или «смешанная слюна - mixed saliva». Существенно реже используется название «ротовая жидкость - oral fluid». Известно, что получение чистой слюны производится путем зондирования выводных протоков слюнных желез или с использованием специальных устройств, которые фиксируются непосредственно на устья выводных протоков для сбора секрета отдельных слюнных желез, что технически сложно, трудоемко, используется в основном в целях исследования функционирования слюнных желез и практически не применяется в диагностических целях.

Очевидно, что *de facto* в подавляющем большинстве публикаций приведены данные анализа биоматериала, собранного путем сплевывания, который представляет собой жидкую биологическую среду организма, формируемую в полости рта за счет секреции слюны тремя (а по последним данным четырьмя) парами крупных и множеством мелких слюнных желез, а также содержимого пародонтальных карманов, десневой жидкости, микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности, десквамированных эпителиальных клеток, мигрирующих в полость рта лейкоцитов и продуктов их распада, а иногда и компонентов крови, остатков пищевых продуктов и средств гигиены ротовой полости, фрагментов назальных и бронхиальных секретов. Такая биологическая субстанция в наибольшей мере соответствует определению «ротовая жидкость», а ее исследование в подавляющем большинстве публикаций определяется термином «саливадиагностика». Необходимо, однако, отметить, что среди проанализированных нами публикаций, имеется немало статей, в которых исследуемый в целях саливадиагностики биоматериал использовался без уточнения способа

его получения у обследуемых лиц. В этой связи следует заметить, что не всегда представлялось возможным однозначно идентифицировать принадлежность анализируемого биоматериала, обозначенных в цитируемых работах, как «слюна», исключительно к секрету слюнных желез или к ротовой жидкости, что нашло отражение в данном тексте, в котором термин «саливадиагностика» служит для обозначения анализа биоматериала без уточнения в ряде случаев его принадлежности к собственно слюне или к ротовой жидкости в которой слюна является доминирующим компонентом.

Прошло уже более года с тех пор, как органы здравоохранения Китая проинформировали Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) о вспышке новой пневмонии, связанной с коронавирусом, в провинции Хубэй и городе Ухань[4]. Этот новый штамм коронавируса, из рода бетакоронавирусов (Betacoronavirus) вскоре был назван коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) из-за его тесной связи с вирусом, ответственным за эпидемию SARS 2003 года (SARS-CoV). Распространение SARS-CoV-2 было признано третьим случаем внедрения высокопатогенного коронавируса в человеческую популяцию после коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в двадцать первом веке [5]. В феврале 2020 года Всемирная Организация Здравоохранения представила официальное название для болезни, которую вызывает SARS-CoV-2 – «COVID-19» (COrona VIRus Disease 2019). С тех пор высоко вирулентный респираторный патоген стал частью нашей действительности. Пандемия Covid-19 - самая большая проблема и причина глобального мирового кризиса здравоохранения со времен Второй мировой войны [6].

Несмотря на то, что последовательность SARS-CoV-2 на 80% идентична последовательности SARS-CoV, его заразность, по-видимому, намного выше, о чем свидетельствует распространение инфекции по всему миру. SARS-CoV-2, по-видимому, в основном распространяется через респираторные секреторные выделения, которые продуцируются слизистыми оболочками в форме микрокапель у инфицированных людей. Эти капли превращаются в аэрозоль при кашле, чихании или разговоре и могут распространяться по воздуху или через загрязненные ими поверхности. Прямая передача SARS-CoV-2 от человека к человеку происходит при вдыхании капель даже при разговоре, а также возможна передача, вызванная контактом со слизистыми оболочками носа, глаз и полости рта. Микрокапли из дыхательных путей особенно заразны, когда инфицированные люди находятся в закрытых помещениях или в тесном контакте с другими людьми [7]. Сегодня совершенно очевидно, что с возникшими проблемами невозможно справиться без использования лабораторной диагностики. Лабораторное тестирование на наличие в

организме вируса стало принципиальным моментом в борьбе с пандемией COVID-19. Надежный тест на коронавирусную инфекцию должен выявлять пациентов с легкой или бессимптомной формой, достоверно отражать течение болезни и хорошо масштабироваться. Быстрое обнаружение SARS-CoV-2 имеет решающее значение для диагностики COVID-19 и предотвращения распространения вируса. Никакие другие инфекционные заболевания, даже пандемический грипп, не вызывали столь массовых лабораторно-диагностических акций, а регуляторные органы во всех странах оказались не готовы к проведению тестов на выявление SARS-CoV-2 в таких объемах и столь быстром темпе. Отсюда — проблемы как с качеством, так и трактовкой результатов исследований.

Существует несколько диагностических стратегий для выявления или исключения текущей инфекции, выявления людей, нуждающихся в медицинской помощи, или для проверки на наличие инфекции в прошлом и формирования иммунного ответа. Европейская комиссия подготовила рабочий документ, в котором предлагается предварительное определение критериев качества средств для диагностики COVID-19 (European Commission, 2020). Как отмечено в документе, тесты, используемые при COVID-19, можно разделить на две группы: 1) направленные на выявление наличия самого вируса (РНК и антигенов), которые применяют с целью верификации диагноза COVID-19, для скрининга в критически важных целевых группах (медицинские работники) и проверки окончания выделения вируса излечившимися пациентами; 2) выявляющие антитела против вируса SARS-CoV-2, то есть наличие или отсутствие иммунитета в результате продолжающегося или перенесенного заболевания. Молекулярная диагностика позволяет выявлять SARS-CoV-2 путем идентификации его геномного материала, то есть вирусной РНК, в анализируемом образце. Эти процедуры представляют собой эталонный стандарт диагностики вирусных инфекций, требующий использования специального оборудования, дорогих реагентов, квалифицированного персонала и необходимой лабораторной инфраструктуры. Молекулярные тесты и выявление антигена в месте оказания медицинской помощи могут обеспечить более раннюю диагностику COVID-19 и изоляцию инфицированных лиц.

На основе опыта других респираторных инфекционных заболеваний, включая SARS в 2003 году, в начале пандемии COVID-19 ВОЗ рекомендовала диагностический протокол обнаружения вирусной РНК с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (рОТ-ПЦР) в респираторных образцах (мазки из ротоглотки (OPS), носоглотки (NPS), бронхоальвеолярный лаваж, трахеальный аспират), который был признан эталонным стандартом для диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [8, 9]. Среди различных респираторных образцов мазок из носоглотки (NPS) был рекомендован в качестве биоматериала первого выбора для тестирования с точки зрения

чувствительности. Однако сбор мазков из носоглотки вызывает дискомфорт у пациентов из-за инвазивности процедуры, что может снизить вероятность согласия пациента на повторное тестирование. Кроме того, для сбора респираторных образцов требуется специализированный медицинский персонал, который подвержен очевидному риску контакта с содержащим вирус биоматериалом. Сама процедура может быть связана с раздражением глотки, чиханием и кашлем во время которых возможно массивное выделение вирусных частиц в зону нахождения медперсонала, что увеличивает риск инфицирования для медицинских работников, которые контактируют с пациентом во время сбора образцов биоматериала [10,11]. Получение мазков из носоглотки требует использования всех средств индивидуальной защиты, что увеличивает стоимость тестирования. Кроме того, сбор образцов из носоглотки или ротоглотки может вызвать кровотечение, особенно у пациентов с тромбоцитопенией [12]. Следовательно, мазки из носоглотки или ротоглотки нежелательны для серийного мониторинга вирусной нагрузки.

Во время пика эпидемии COVID-19 переполненность центров, предназначенных для анализа образцов мазков из носоглотки, вызвала прерывание многих других диагностических процедур, что оказало серьезное влияние на предоставление основных медицинских услуг при хронических заболеваниях. Наконец, чувствительность тестирования с использованием этого биоматериала может значительно варьировать в зависимости от интервала между воздействием инфицированного материала на обследуемого и процедурой отбора образцов [13].

Ротоглоточная секрет формируется при кашле или прочистке горла, и относится к респираторным секретам, образующимся как верхними (носоглотка), так и нижними (bronхи, легкие) дыхательными путями. Напротив, ротовая слюна вырабатывается слюнными железами и не принадлежит к группе респираторных биоматериалов. Однако четкое различие между этими двумя типами образцов невозможно и не входит в задачи лабораторной клинической диагностики COVID-19. Биоматериал, образующийся при кашле, содержит некоторое количество оральной слюны, а небольшое количество ротоглоточного секрета может присутствовать в ротовой слюне. Использование ротоглоточного секрета в качестве образца для обнаружения SARS-CoV-2 описано в исследованиях, в которых подчеркивается тот факт, что такие образцы могут содержать как бронхолегочные, так и носоглоточные выделения. Для тестов на обнаружение SARS-CoV-2 Японский национальный институт инфекционных заболеваний рекомендует собирать мокроту (первоочередная задача) [14]. Мокрота является неинвазивным образцом из нижних дыхательных путей, но только у 28% пациентов с COVID-19 в серии случаев оказалось возможным получить мокроту для диагностической оценки [15]. Поскольку сухой кашель,

сопровожающийся уменьшением количества мокроты, является обычным явлением при COVID-19, образцы из носоглотки также собирают (вторичный приоритет). Однако сбор образцов из носоглотки, кроме указанных выше недостатков, связан с использованием персонала, обладающего необходимыми техническими навыками (поскольку несоответствующая процедура может привести к ложноотрицательным результатам теста). В этой связи в нескольких исследованиях было предложено обнаружение SARS-CoV-2 с использованием других биоматериалов, таких как моча, фекалии, слезы и слюна [16]. Среди этих биоматериалов слюна привлекает серьезное внимание ученых - клиницистов и специалистов в области лабораторной медицины прежде всего в ракурсе саливадагностики инфекций, включая заболевания, вызываемые коронавирусами.

Yoon J.G. et al. (2020) [17] проанализировали серийную вирусную нагрузку в носоглотке, ротоглотке, образцах слюны, мокроты и мочи у пациентов с COVID-19. На ранней стадии инфекции вирусная нагрузка SARS-CoV-2 была чрезвычайно высокой в носоглотке и слюне. Установлено, что слюна содержит живые вирусы, которые могут способствовать передаче инфекции [18]. SARS-CoV-2 может попасть в ротовую жидкость как минимум тремя разными путями. SARS-CoV-2 в нижних и верхних дыхательных путях достигает ротовой полости вместе с каплями жидкости; SARS-CoV-2 в крови может попасть в рот через десневую жидкость; в процессе формирования секрета слюнных желез в случае их инфицирования с последующим выбросом вирусных частиц в слюну через слюнные протоки [19].

Было показано, что SARS-CoV-2 инфицирует эпителиальные клетки в протоках слюнных желез у макак-резусов [20]. Xu J. et al., (2020) [21] показали, что слюнные железы могут являться потенциальными резервуарами для SARS-CoV-2 и источником бессимптомной инфекции COVID-19. Возможность инфицирования слюнных желез предполагает наличие SARS-CoV-2 в слюне пациентов. Chen L. et al. (2020) [22] собрали слюну непосредственно из выводного протока слюнной железы и обнаружили РНК SARS-CoV-2, что доказывает инфицированность слюнных желез SARS-CoV-2. Тяжелая форма COVID-19 может индуцировать нарушение функции слюнных желез из-за заражения SARS-CoV-2. Предполагают, что SARS-CoV-2 может вызывать острый сиаденит и связанные с ним симптомы, такие как боль, дискомфорт, воспаление и секреторную дисфункцию слюнных желез [23]. Ранее Xu H., et al., (2020) [24] показали роль слизистой оболочки полости рта в заражении COVID-19. Это требует учитывать потенциальную инфекционность ротовой жидкости в ракурсе новых проблем для стоматологии и оральной медицины [25].

Однако следует отметить, что образцы ротовой жидкости содержат не только слюну, секретлируемую большими и малыми слюнными железами, включая лингвальные железы фон

Эбнера, десневую жидкость, буккальные и десневые эпителиоциты, но также и секреты, поступающие из носоглотки или из дыхательных путей. Считается, что респираторные вирусы передаются от человека к человеку при прямом или косвенном контакте, а также через крупные или мелкие капли жидкости, выделяемые при кашле или чихании, а микрокапли, содержащие вирус гриппа, могут быть обнаружены в выдыхаемом воздухе, даже при нормальном дыхании [26]. Следовательно, SARS-CoV-2 может передаваться через слюну прямо или косвенно даже среди пациентов без кашля или других респираторных симптомов. Эти результаты подтверждают необходимость использования масок в качестве меры профилактики.

Использование слюны в качестве диагностического образца имеет ряд преимуществ, таких как возможность простого самостоятельного сбора биоматериала пациентом без каких-либо инвазивных процедур даже в домашних условиях и отсутствие необходимости в специализированном персонале для сбора образцов. Следовательно, использование образцов слюны может снизить риск передачи вируса медицинским работникам. Кроме того, забор слюны намного удобнее для пациента, чем процедура мазков из носоглотки / ротоглотки, практически не вызывая дискомфорта [27]. Использование образцов слюны снижает риск внутрибольничной передачи COVID-19 и идеально подходит для ситуаций, в которых сбор образцов из носоглотки может быть противопоказан. Это также экономит время и является менее дорогостоящим, поскольку не требует использования средств индивидуальной защиты или устройств для безопасной транспортировки содержащих вирусы биоматериалов. Использование слюны позволяет собирать образцы за пределами больниц или медицинских центров. В условиях, когда необходим скрининг большого количества людей, слюна представляет собой практичный и неинвазивный тип биоматериала [18]. В результате за последние месяцы несколько научных статей, средств массовой информации и компаний сообщили о разработке новых тестов с использованием слюны для выявления инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Диагностическая ценность образцов слюны для определения РНК SARS-CoV-2 по-прежнему ограничена, но это перспективный метод, к которому следует относиться с осторожным оптимизмом [2].

Целью этого обзора явился анализ существующей информации о возможности саливадиагностики COVID-19 и целесообразности использования ротовой жидкости (слюны) в качестве биологического образца для выявления SARS-CoV-2.

Данные об использовании слюны в диагностике более ранних респираторных синдромов и роли слюнных желез в передаче инфекции

Предыдущие исследования показали высокий уровень информативности слюны в качестве образцов для лабораторной диагностики респираторных синдромов, вызываемых

вирусами. Идея о том, что капли слюны могут представлять собой важный компонент передачи инфекции и подходящий образец для диагностики, была подтверждена в 2003 году во время вспышки атипичной пневмонии, когда было доказано, что слюна является надежным образцом для выявления коронавируса SARS. Wang et al. (2004) [28] сообщили о высокой вирусной нагрузке SARS-CoV в образцах слюны по сравнению с промыванием горла. Аналогичные выводы были сделаны в отношении вспышки вызванного коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома, MERS-CoV [29]. Ранее подтверждена роль слюны в диагностике респираторных инфекций, вызванных гриппом или другими коронавирусами [30]. Эти данные согласуются с выводом о том, что капли слюны представляют собой основной источник передачи инфекции SARS-CoV-2 от человека к человеку [31]. ВОЗ также заявила, что капли, выделяемые инфицированными людьми при кашле, чихании или разговоре при близком контакте, являются основным способом передачи SARS-CoV-2, помимо прикосновения к зараженным поверхностям без мытья рук (<https://www.who.int/news-room/qa-detail/qa-coronaviruses#>). Воздушно-капельная передача также может иметь место в том же внутреннем пространстве, где применяются процедуры, способствующие образованию аэрозолей (интубирование, бронхоскопия, стоматологические манипуляции, высокопоточная назальная оксигенотерапия, инвазивная искусственная вентиляция легких).

Использование различных диагностических протоколов для обнаружения SARS-CoV-2

Несмотря на увеличение возможностей диагностического тестирования на SARS-CoV-2 во многих странах имеющийся уровень тестирования по-прежнему недостаточен для замедления пандемии COVID-19. У многих тестируемых все еще возникают длительные задержки в получении результатов из-за дисбаланса между спросом и предложением в центрах тестирования. Спрос на тестирование только возрастает с открытием учебных заведений и рабочих мест. В идеале специализированное тестирование, ориентированное на эпиднадзор за населением, должно обеспечивать минимальное отвлечение ресурсов от клинического диагностического тестирования, быть доступным и масштабируемым, и быстро и надежно идентифицировать наличие вируса для при бессимптомных или субклинических вариантах инфекций. Таким образом, упрощение процесса сбора образцов и тестирования имеет решающее значение в борьбе с пандемией COVID-19. Исследование образцов ротовой жидкости / слюны для обнаружения SARS-CoV-2 - одно из простых и эффективных решений, необходимых для массового расширения тестирования поскольку показано, что этот биоматериал является чувствительным для детектирования возбудителя COVID-19 [3,32,33]. Поэтому необходимы недорогие методы тестирования на SARS-CoV-2

на основе образцов слюны, чтобы помочь достичь потенциала, необходимого для безопасного функционирования лечебных, учебных заведений и рабочих мест.

Многие протоколы сбора слюны требуют, чтобы пациенты откашливались перед тем, как собрать слюну [18, 34] и регламентируют использование реагентов для стабилизации РНК в составе устройства для сбора ротовой жидкости. Принудительный кашель, если он проводится в присутствии медицинского работника, требует использования средств индивидуальной защиты. Кроме того, стабилизаторы РНК увеличивают стоимость тестирования, дефицитны и могут быть потенциально токсичными при использовании. С целью определения возможной деградации РНК в слюне в качестве потенциальной причины ложноотрицательных результатов, Hanson K.E. et al., 2020 [32] провели исследования стабильности биоматериала при температуре окружающей среды и при охлаждении в течение до 5 дней и не обнаружили снижения результата выявления РНК SARS-CoV-2. Это исследование представляет собой одно из крупнейших проспективных сравнений типов образцов на сегодняшний день и демонстрирует отличное согласие результатов тестирования между NPS, собранными врачом, и слюной, собранной самостоятельно пациентом. У большинства (91,9%) пациентов с положительными результатами РНК SARS-CoV-2 была обнаружена как минимум в двух типах образцов одновременно. Образцы NPS и слюны в целом показали наибольшую положительную реакцию. Учитывая, что у всех участников было сильное клиническое подозрение на COVID-19, а молекулярное тестирование в целом имеет очень высокую специфичность, вполне вероятно, что результаты NPS или образцов слюны, которые были единственными положительными образцами, являются истинно положительными, но отсутствие принятого внешнего эталонного стандарта не позволяет рассчитать клиническую чувствительность и специфичность.

Некоторые авторы рекомендуют использовать образцы ротовой жидкости, собранные сразу после пробуждения, до приема пищи или чистки зубов [11;35]. Другие исследователи собирали слюну в любое время у пациентов, у которых производили тест по запросу врача[36]. В некоторых исследованиях слюну получали с помощью специальных устройств для сбора, улучшающих качество и количество получаемой слюны [37]. Однако эти устройства для сбора обычно недоступны в медицинских центрах общего профиля, особенно в странах с низким уровнем доходов. Кроме того, для сбора слюны с помощью таких устройств требуется помощь медицинских работников.

Чтобы изучить возможность широкого внедрения доступных подходов к эпиднадзору на основе тестирования образцов слюны, [38] исследовали стабильность РНК SARS-CoV-2 и вирулентность вируса в образцах слюны, хранящихся в широко доступных стерильных лабораторных пластиковых (полипропиленовых) пробирках, не содержащих нуклеазы.

Показано стабильное обнаружение РНК SARS-CoV-2 в образцах слюны, хранившихся при различной температуре и в течение продолжительных периодов времени, что подтверждает возможность недорогого и простого сбора слюны. Слюна, собранная у пациентов с COVID-19 в стационаре и медицинских работников с использованием стерильных пробирок для сбора использовалась для оценки временной стабильности РНК SARS-CoV-2 при различных температурах хранения (-80 ° C, 4 ° C, ~ 19 ° C, 30 ° C). С) без использования консервантов нуклеиновых кислот. Установлено, что РНК SARS-CoV-2 из слюны неизменно обнаруживалась на одинаковых уровнях независимо от времени и температуры хранения. Более того, РНК SARS-CoV-2 оставалась относительно стабильной в образцах слюны, оставленных на срок до 25 дней при комнатной температуре. Этот вывод согласуется с недавним исследованием, в котором также сообщается о стабильности РНК SARS-CoV-2 в слюне, хранившейся при комнатной температуре 7 дней. Стабильность обнаружения РНК SARS-CoV-2 в течение продолжительных периодов времени и в различных условиях хранения указывает на то, что слюну можно собирать без необходимости использования дорогостоящих буферных добавок для стабилизации РНК [39].

Более того, предыдущие исследования продемонстрировали простую возможность сбора слюны в простые стерильные, свободные от нуклеаз пластиковые контейнеры с широким горлышком [3]. Стабильность SARS-CoV-2, как при комнатной температуре, так и при 30 ° C, позволяет использовать более доступные способы сбора и транспортировки биоматериала без необходимости использования дорогостоящих стратегий охлаждения, что также облегчает проведение массового тестирования слюны в регионах с ограниченными ресурсами. В других исследованиях обследуемые производили сбор ротовой жидкости используя метод сплевывания в стерильные контейнеры, обычно используемые во многих клиниках для сбора мочи. Поскольку никаких специальных устройств обычно не требуется, использование слюны может быть реализовано в клинической практике в качестве рутинной процедуры без ущерба для качества образца, как сообщалось ранее [40].

Метод пассивного слюнотечения позволяет получить более однородный образец и избежать влияния ингибирующих веществ [41]. Показано, что слюна, собранная методом пассивного слюноотделения, может быть лучше мазков из носоглотки для получения стабильных результатов анализа [42]. Тем не менее, для определения наиболее подходящего метода сбора слюны необходима дополнительная оценка. Самостоятельно собранные образцы ротовой жидкости и мазков из носа демонстрируют сопоставимую чувствительность с образцам мазков из носоглотки, собранным клиницистом, для выявления SARS-CoV-2 [43]. Вышесказанное позволяет констатировать, что использование самостоятельно собранных образцов слюны является простой, удобной и недорогой

альтернативой обычным молекулярным тестам на основе мазков из носоглотки. Эти результаты могут позволить более широко использовать молекулярные тесты для управления пандемией COVID19, особенно в условиях ограниченных ресурсов. Даже если диагностика по слюне неинвазивна и менее опасна по сравнению с мазками из зева, комплексный диагноз должен подкрепляться полной информацией о симптомах, эпидемиологической историей и анализом нескольких клинических обследований. Поскольку присутствие живого вируса в слюне определяет ее как потенциальный источник передачи инфекции, с любыми собранными образцами слюны необходимо обращаться с осторожностью, чтобы избежать распространения этого патогена.

Выявление SARS-CoV-2 в ротовой жидкости (слюне) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (рОТ-ПЦР)

Обнаружение SARS-CoV-2 в слюне с помощью рОТ-ПЦР было первоначально (февраль 2020 г.) описано То КК. et al., (2020) [18]. В своем исследовании авторы проанализировали 23 образца слюны пациентов с разной степенью тяжести заболевания COVID-19 и сообщили, что у 87% из них обнаруживалась вирусная РНК в слюне.

Исследование диагностической достоверности выявления SARS-CoV-2 с помощью анализа на основе ПЦР мазков из OPS, NPS и образцов слюны или мокроты с последующим сравнительным анализом количественной ОТ-ПЦР и вирусной нагрузки [44] показало, что частота обнаружения вируса в мокроте (95,65%) и слюне (88,09%) была значительно выше, чем в мазках из OPS (41,54%) и NPS (72,31%) ($P < 0,001$). Кроме того, значение C_t для мазков из NPS, образцов мокроты и слюны было значительно выше, чем для мазков из OPS, тогда как между образцами мокроты и слюны не наблюдалось значительной разницы. Авторы исследования констатировали, что уровень обнаружения SARS-CoV-2 в слюне выше, чем в респираторных образцах. Эти результаты показали, что слюна и мокрота являются надежными типами биоматериалов, которые можно использовать для обнаружения SARS-CoV-2. Высокий уровень соответствия между двумя типами биоматериала демонстрирует, что использование слюны для обнаружения SARS-CoV-2 методом рОТ-ПЦР так же надежно, как и использование мазков NPS / OPS, но с меньшими затратами и рисками.

На 25.08.2020 в Российской Федерации зарегистрировано 34 диагностических наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2.

Недавно разработаны новые методы диагностического тестирования, такие как более быстрый анализ ПЦР, который позволяет выявить инфекцию в учреждениях, предназначенных для диагностики COVID-19 [45]. Эти методы позволяют более быструю диагностику с помощью прямой рОТ-ПЦР без выделения РНК. Применение этой более быстрой процедуры с использованием образцов слюны позволило зафиксировать

чувствительность, которая была лишь немного ниже, чем чувствительность, показанная стандартным протоколом с экстракцией РНК [46]. Новая тест – система nCoV-DK (Shimadzu Corporation, Киото, Япония) для обнаружения SARS-CoV-2, исключает этапы выделения и очистки РНК с помощью технологии Ampdirect™, что значительно сокращение времени, необходимого для подготовки образца и детекции с помощью ПЦР[47]. Однако nCoV-DK был первоначально разработан для использования образцов мазков из носоглотки, и было необходимо выяснить, можно ли исследовать образцы слюны с использованием системы nCoV-DK, поскольку слюна имеет высокий уровень РНКазы [48]. Результаты показали, что присутствие РНКаз в слюне не нарушает такой альтернативный протокол, который позволяет обойти классическое выделение и очистку РНК, чтобы снизить риск человеческой ошибки на этом этапе. Fukumoto T., et al., (2020) [49] провели сравнительное тестирование группы пациентов больных COVID-19 с помощью прямой ПЦР и nCoV-DK. Общая степень соответствия обнаружения вируса между двумя методами составила 94,4%. Показатели соответствия составляли 95,2%, 95,5% и 85,7% в образцах мазка из носоглотки, слюны и мокроты соответственно. Между двумя методами была сильная корреляция ($r = 0,837$, 95% ДИ = 0,736–0,902, $P < 0,01$). Это исследование продемонстрировало, что слюна является надежным инструментом для обнаружения вируса с помощью системы nCoV-KD даже без процесса экстракции и очистки РНК. Наконец, время, необходимое для выполнения этой процедуры, составляло от 30 до 60 минут, что обеспечивало более быструю диагностику [34]. Таким образом, можно сделать вывод, что гRT-PCR слюны предоставляет релевантные, надежные данные, которые можно использовать в дополнение к эталонному стандарту (например, NPS) для выявления ложноотрицательных случаев с помощью анализа респираторных мазков, тем самым повышая общую чувствительность на основе тестирования стандартных молекулярных образцов [32]. Несколько групп в мире изучают возможность применения технологии одностадийной изотермической амплификации нуклеиновых кислот, опосредованной обратной транскрипцией (RT-LAMP - Loop-Mediated Isothermal Amplification), которая используется для диагностики инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями или вирусами. RT-LAMP очень эффективный метод обнаружения вирусов с геномом РНК, использование которого в сочетании с колориметрическим качественным анализом в местах оказания медицинской помощи, было протестировано на образцах слюны, взятых у пациентов с COVID-19 без этапа выделения РНК. Результаты были доступны через 30 минут и оценивались на основе изменения цвета образца при наличии вирусной РНК [50]. Применение метода RT-LAMP с использованием слюны имеет несколько преимуществ при диагностике в месте оказания медицинской помощи. Во-первых, пациент самостоятельно собирает образец слюны и процедура анализа не требует выделения

PHK. Во-вторых, этот метод обеспечивает легко интерпретируемые результаты в течение 1 часа и не требует каких-либо сложных лабораторных устройств или технологий [51,52]. Например, EasyCOV (SkiCell и Sys2Diag / CNRS) - это колориметрический анализ RT-LAMP, разработанный для анализа слюны. Результаты можно прочесть, наблюдая за цветом образца внутри пробирки. Изменение цвета с оранжевого на желтый указывает на то, что образец положительный и присутствует SARS-CoV-2 [53].

Диагностическая точность рОТ-ПЦР слюны

Автоматизированные молекулярные анализы в местах оказания медицинской помощи значительно сократили время выполнения теста на SARS-CoV-2. Одно из основных препятствий сейчас находится на этапе сбора образцов, особенно в загруженных клинических условиях. Слюна - это удобный тип образцов, который могут легко получить взрослые пациенты. В последнее время образцы слюны были исследованы для обнаружения PHK SARS-COV-2 с переменным успехом. Чтобы сделать значимый вывод в этом отношении, наиболее важным дизайном исследования должен быть сравнительный перекрестный анализ образцов слюны и мазков из носоглотки при обнаружении PHK SARS-CoV-2 с пороговым значением цикла [54]. Поэтому здесь приведены результаты критического анализа опубликованных статей с таким дизайном исследования. В этих исследованиях слюна рассматривалась потенциальным биоматериалом для обнаружения и диагностики PHK SARS-CoV-2 с использованием ОТ-ПЦР. В группе исследований обнаружение вирусной PHK в слюне сравнивали с обнаружением мазков из носоглотки и / или ротоглотки (OPS), выполненных в тот же день сбора слюны. В некоторых из этих исследований сравнивалась чувствительность образцов слюны и дыхательных путей при обнаружении инфекции SARS-CoV-2 у анализируемых пациентов. Результаты были неоднородными.

Iwasaki S., et al., (2020) [41] сообщили о 97% -ной согласованности между образцами мазка из носоглотки и слюной при обнаружении SARS-CoV-2 .В нескольких публикациях представлены данные о молекулярной диагностике SARS-CoV-2 путем идентификации его геномного материала, то есть вирусной PHK, по результатам исследования слюны в сопоставлении с тестированием других биоматериалов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Опубликованные данные, сравнивающие слюну и мазок из носоглотки для обнаружения SARS-CoV-2, показали противоречивые результаты. У пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, поступивших в Йельскую больницу Нью-Хейвен с тяжелой формой заболевания, Wyllie et al.[3] обнаружили, что титр вируса в пробах слюны выше, чем в мазках из носоглотки. В ходе отдельного анализа 38 пар образцов слюна-мазок в 21% проб коронавирус

обнаруживался в слюне, но не в мазке, и только для 8% проб ситуация была обратной. Авторы показали, что точность выявления SARS-CoV-2 в слюне если не превосходит, то как минимум сравнима с точностью результатов мазка из носоглотки при ранней госпитализации и даже более рациональна при продолжительной госпитализации и восстановлении. Этот факт позволил предположить, что анализ слюны для выявления коронавируса SARS-CoV-2 является эффективной и оптимальной альтернативой мазкам из носоглотки и особенно для выявления легких или бессимптомных форм инфекции. Результаты других исследований подтверждают потенциал слюны для выявления SARS-CoV-2 как у пациентов без симптомов, так и у амбулаторных больных [43,55].

Точно так же у 25 пациентов с тяжелой формой заболевания в Италии был выявлен SARS-CoV-2 в слюне. Это позволило авторам констатировать, что слюна надежный инструмент для обнаружения SARS-CoV-2 [56]. Yokota I., et al., (2020) [57] сообщили, что образцы слюны более информативны, чем мазки из носоглотки (NPS) в условиях больниц, пунктов неотложной помощи и при скрининговом тестировании на SARS-CoV-2 с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Результаты исследования [36] показали, что анализ слюны в качестве альтернативы мазкам из NPS является чувствительным и достаточно специфичным, чтобы использовать его в повседневной практике. Соответствие результатов ОТ-ПЦР для обнаружения SARS-CoV-2 в слюне и мазках NPS составило 96,1%. To et al. (2020) [55,35] сообщили о высокой согласованности результатов исследования между слюной и носоглоточным аспириатом для обнаружения респираторных вирусов и мониторинга вирусной нагрузки SARS-CoV-2.

Rao, M., et al., (2020) [58] провели проспективное одноцентровое сравнительное исследование утренних образцов слюны, собранных пациентами, с образцами NPS, полученными медицинским работником, в котором приняли участие 217 бессимптомных взрослых мужчин-участников карантинного центра COVID-19, у которых был получен положительный результат на SARS-CoV-2 за 8-10 дней до изоляции. Парные образцы NPS и слюны были собраны и обработаны в течение 5 часов после сбора образцов с использованием рОТ-ПЦР. Частота выявления SARS-CoV-2 была выше в слюне по сравнению с тестом NPS (93,1%, против 52,5%, $p < 0,001$). Авторы заключили, что слюна - лучший альтернативный образец для выявления SARS-CoV-2, а с учетом простоты самостоятельного сбора образцов, дефицита средств индивидуальной защиты и трансмиссивности вируса, исследование слюны может обеспечить возможность для точного эпиднадзора за SARS-CoV-2.

Однако в амбулаторных условиях в Мельбурне, (Австралия), из 662 обследованных пациентов только у 33 из 39 (84,6%) пациентов с подтвержденными случаями COVID-19 был

обнаружен SARS-CoV-2 в слюне [27]. Barat, B., et al., (2020)[59] оценили образцы слюны для тестирования SARS-CoV-2 рОТ-ПЦР путем сравнения 459 проспективно собранных парных мазков NPS или средней носовой раковины от 449 человек с целью определения возможности использования слюны для скрининга среди лиц с отсутствием симптомов COVID-19. Процент положительного и отрицательного совпадения результатов анализа слюны по сравнению с мазком из носоглотки составил 81,1% и 99,8% соответственно. Чувствительность увеличилась до 90,0% (95% ДИ: 74,4–96,5%) при рассмотрении только образцов с умеренной и высокой вирусной нагрузкой. Авторы пришли к выводу, что анализа слюны достаточно для выявления лиц с высокой вирусной нагрузкой в программе скрининга лиц с отсутствием симптомов COVID-19 не требующей сбора мазков и это может помочь улучшить добровольный скрининг для тех людей, которые не приемлют различные формы интраназальных манипуляций.

Чтобы лучше оценить клиническую ценность и характер выделения вирусной РНК в образцах слюны, Zhu J. et al., (2020) [60] дополнительно исследовали клинические характеристики слюны по сравнению с парными образцами из дыхательных путей в большей группе пациентов с COVID-19 и проанализировали временное изменение вирусной нагрузки и ее корреляцию с тяжестью заболевания по слюне. По сравнению с образцами из дыхательных путей чувствительность и специфичность исследования слюны на присутствие SARS-CoV-2 составляли 86,4% и 97,0% соответственно. Анализ соответствия выявил 92,1% наблюдаемой точности обнаружения вируса и твердое согласие диагноза между респираторным трактом и образцом слюны (коэффициент Каппа Коэна 0,840, 95% ДИ 0,805–0,874). Представленные авторами данные показали, что уровни РНК- SARS-CoV-2 в слюне достигли своего пика в течение одной недели после появления симптомов заболевания, а затем неуклонно снижались. 40% пациентов имели период выделения вируса в слюне более 14 дней. Это согласуется с предыдущими результатами анализа мазков из горла и мокроты [61], а также образцов слюны [35]. Продолжительное присутствие вирусной РНК SARS-CoV-2 в образцах слюны не было связано с тяжестью заболевания ($p = 0,535$). Средняя вирусная нагрузка тяжелых случаев COVID-19 не показала значимых отличий от легких случаев за весь указанный период. Паттерны клиренса вирусной РНК в образцах слюны также наблюдались аналогичным образом у пациентов с легкой и тяжелой формой COVID-19. Динамика выделения вирусной РНК в слюне, которая наблюдалась у пациентов с COVID-19 легкой и тяжелой степени тяжести, отличалась от той, которая была представлена в мазках из носоглотки NPS. Пациенты с более тяжелой формой заболевания имели более высокую вирусную нагрузку. Это свидетельствует о клинической значимости показателей вирусной РНК SARS-CoV-2 слюны у стационарных пациентов [62]. Это могло быть связано с

длительным присутствием вирусной РНК SARS-CoV-2 в образцах слюны, тогда как мазки из носоглотки со временем стали отрицательными [63,64]. В исследовании, проведенном с участием 891 подозреваемого на COVID-19, поступивших последовательно в больницы Аль-Сабах, Джабер и Альрази (Кувейт) было проанализировано восемьсот девяносто одна пара проб NPS и образцов слюны [65]. Результаты показали, что тест ОТ-ПЦР слюны продемонстрировал высокую чувствительность (83,43%) и специфичность (96,71%) и сопоставимые характеристики с текущим стандартом мазка из носоглотки. Эти данные согласуются с предыдущим исследованием (чувствительность и специфичность ОТ-ПЦР образца слюны составляют 84,2% и 98,9% соответственно) [66]. Кроме того, в недавнем метаанализе чувствительность к SARS-CoV-2 составляла 91% (95% ДИ, 80–99%) и 98% (95% ДИ, 89–100%) для слюны и образцов NPS, соответственно. [67]. Интересно, что не выявлено существенной разницы в чувствительности и специфичности тестов на основе слюны и NPS для 11 различных вирусных респираторных инфекций, включая коронавирусы [68].

Большинство исследований по обнаружению вирусной РНК в слюне проводилось с привлечением пациентов с COVID-19 или лиц с подозрительными симптомами, в то время как только несколько исследований включали когорты бессимптомных пациентов. Результаты, относящиеся к этой группе, были противоречивыми. Хотя в некоторых исследованиях сообщалось о более низкой чувствительности слюны в группе бессимптомных лиц [69,46], другие исследователи, напротив, подчеркивали клиническую полезность ротовой жидкости для выявления SARS-CoV-2 в этой группе населения [70,71]. В недавнем исследовании по данным тестирования слюны выявлены бессимптомные носители SARS-CoV-2 среди медицинских работников, имевших отрицательный результат аналогичного тестирования NPS [3]. Однако не все диагностические тесты подходят для саливадиагностики COVID-19 в любых условиях. Хотя рОТ-ПЦР представляет собой эталонный стандарт для молекулярной диагностики образцов слюны, время, необходимое для анализа, ограничивает его применение в программе массового скрининга. Таким образом, этот метод следует рассматривать в качестве предпочтительного теста в больницах для стационарных пациентов с COVID-19 или для подтверждения положительного диагноза, установленного тестами с использованием других образцов, особенно в случаях, дающих подозрение на ложноотрицательные результаты при анализе мазков из носоглотки. Прямая рОТ-ПЦР без выделения РНК может использоваться в качестве предварительного анализа для скрининга пациентов с подозрением на COVID-19 при поступлении в отделение неотложной помощи, где необходимо быстрое получение определенных результатов, что снижает риск заражения персонала. Саливадиагностика COVID-19 представляет собой также действенный и полезный инструмент в местах оказания медицинской помощи для врачей,

которые лечат пациентов вне больницы, например, в кабинете терапевта. В этом контексте технология прямой рОТ-ПЦР должна обеспечивать результаты в течение 30–60 минут и выполняться неспециализированным медицинским персоналом, а устройства должны быть простыми в использовании и портативными.

В нескольких исследованиях сообщалось, что в период выздоровления образцы мазков из носоглотки показали более высокую чувствительность для SARS-CoV-2, выявляемого методом рОТ-ПЦР, чем слюна [41,27]. Skolimowska K., et al., (2020) [72] сравнили результаты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, полученные при исследовании образцов мазков из ротоглотки / носоглотки со слюной. Авторы обнаружили, что слюна имела чувствительность 83,3% и специфичность 99,1% и заключили, что исследование слюны характеризуется отрицательной прогностической ценностью. Во временном профиле пик вирусной нагрузки слюны выявлен в течение первой недели появления симптомов, а затем этот показатель снизился. Эта группа также обнаружила РНК SARS-CoV-2 в слюне после лечения. Даже при использовании антител против SARS-CoV-2 вирусная РНК все еще может быть обнаружена в течение 20 дней или даже дольше в образцах слюны из глубокого горла у трети включенных пациентов, что позволяет предположить, что вирусная РНК может оставаться в течение длительного периода времени вместо того, чтобы исчезнуть после применения антител. Это позволяет предположить, что низкие уровни РНК SARS-CoV-2 могут выделяться со слюной даже после клинического выздоровления [35].

В других исследованиях сообщалось о положительных на SARS-CoV-2 пробах слюны одновременно с отрицательными результатами такого же тестирования образцов NPS. Причины, лежащие в основе этого расхождения результатов, остаются неясными и могут быть связаны с несколькими факторами, включая неправильное выполнение процедуры забора NPS или различные варианты вирусного и клинического течения инфекции. Опубликованные данные предполагают, что комбинация образцов слюны и респираторных проб в условиях больницы может повысить общую чувствительность и снизить количество ложноотрицательных результатов. Следует учитывать то, что некоторые пациенты с COVID-19 могут иметь отрицательный результат на SARS-CoV-2 по анализу NPS, в то время как образец их слюны является и остается положительным при тестировании с помощью рОТ-ПЦР [63]. Этот факт поднимает вопрос о том, действительно ли все пациенты, показавшие 2 последовательных отрицательных теста на SARS-CoV-2 по анализу NPS не заразны.

Выявление в ротовой жидкости (слюне) антигенов SARS-CoV-2

Экспресс-тест на антиген – это метод, который обнаруживает присутствие антигена т. е. вирусного белка на его поверхности. Это отличает его от других медицинских тестов,

которые обнаруживают антитела (тесты на антитела) или нуклеиновые кислоты (молекулярные тесты). В отличие от серологических тестов, тест на антиген не может выдать предполагаемый иммунный паспорт, так как он не определяет наличие специфических антител IgG и / или IgM против SARS-CoV-2. Он просто определяет наличие вируса прямо в момент анализа. Эта особенность объясняет его пригодность в программе массового скрининга. Для достижения этой цели любой тест на антиген должен иметь возможность широко использоваться на целевой территории, а также быть легко применяемым, как медицинским, так и немедицинским персоналом и иметь приемлемую цену. В Российской Федерации зарегистрирован один из лучших в классе быстрых тестов на наличие антигена к новому коронавирусу – One Step SARS-CoV-2 Antigen Rapid Test Biocredit (RapiGEN, Южная Корея). Это исследование выявляет непосредственно белковые антигенные структуры вируса в биологическом материале методами иммунохроматографии, показывая в течение 5-10 минут с высокой вероятностью, инфицирован ли человек в данное время и является ли он источником инфицирования для других людей. Необходимо понимать, что исследование антигенов SARS-CoV-2 не может полностью заменить методы молекулярной диагностики (ПЦР), однако является важной скрининговой опцией, особенно при использовании в комбинации с тестом на ранние антитела (IgM).

Недавно опубликованы результаты исследования, посвященного анализу диагностической точности экспресс-теста слюны (RST) на основе LFA для выявления SARS-CoV-2 [73]. Тест обеспечил получение результата менее чем за 10 минут, обнаружив присутствие белка-шипа в образце слюны. В ходе выполнения исследования, слюна, собранная у субъекта, наносится на подушечку для образца, и она капиллярно перемещается по нитроцеллюлозной мембране. Через 5-10 мин результат можно прочитать: если видны 2 цветные полосы (как тестовая, так и контрольная), субъект инфицирован, а если видна только контрольная линия, субъект не инфицирован. Авторы сообщили о высокой чувствительности (93%) тестируемого метода. Однако в другом исследовании приведены данные о его низкой чувствительности [46]. Эти различия, вероятно, связаны с разными характеристиками используемых антител.

Возможность экспресс-теста на антиген на основе диагностики слюны привлекает все большее внимание в последние несколько месяцев. Перспектива разработки более технологически продвинутых диагностических систем с использованием микрофлюидных систем на базе смартфонов со специальными биосенсорами представляет собой одну из самых серьезных возможностей на ближайшее будущее, особенно в случае других вспышек пандемии [74]. Недавно объявлено о создании теста для анализа слюны (жидкости, собранной после простого полоскания рта непосредственно в месте проведения теста),

который может обнаружить присутствие вируса за несколько секунд с 95% успешностью с помощью портативного и точного устройства (SpectraLIT™), сочетающим уникальную технологию спектрального анализа для диагностики патогенов и программным решением Virusight обеспечения искусственного интеллекта. Компания Virusight, основанная в 2020 году в ответ на пандемию COVID-19, была создана для разработки диагностики вирусов в реальном времени для быстрого (за секунды) скрининга COVID-19 у пассажиров в международных аэропортах по всему миру.

Тестирование антител к SARS-CoV-2 в ротовой жидкости (слюне)

Выявление активной инфекции обычно достигается путем тестирования на вирусную РНК, но этот подход малоинформативен после исчезновения симптомов. В дополнение к молекулярной диагностике COVID-19 точные серологические тесты могут идентифицировать людей, у которых развился иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2. Антитела являются ключевыми компонентами в арсенале защитного иммунитета против новых вирусных инфекций, таких как SARS-CoV-2. Понимание их долговечности и их системной компартментации среди различных групп населения - это важные данные, которые позволяют отслеживать распространенность серотипов в сообществах, выбирать доноров плазмы для лечения и разрабатывать вакцины против COVID-19. Эти тесты необходимы на платформах, которые могут быть развернуты в большом количестве для описания изменений иммунитета на популяционном уровне в различных географических масштабах и с течением времени. Существует острая необходимость в проведении широкомасштабного популяционного тестирования для улучшения усилий по профилактике и контролю COVID-19. Предлагается осуществлять тестирование в повторяющиеся моменты времени, чтобы лучше понять пространственно-временную динамику передачи, инфекции и формирования коллективного иммунитета [75]. В настоящее время тестирование антител на популяционном уровне в основном проводится с использованием крови. Достижение таких всеобъемлющих целей популяционного тестирования будет сложной задачей, если полагаться только на традиционное диагностическое исследование образцов крови, поскольку это считается инвазивным, неудобным или неприемлемым, особенно среди уязвимых и восприимчивых групп населения [76,77].

Хотя ответ антител на SARS-CoV-2 широко изучался в крови, относительно мало известно об ответе антител в слюне и его связи с системными уровнями антител. Тестирование на наличие антител к SARS-CoV-2 в образцах крови или слюне направлено на выявление предыдущей инфекции SARS-CoV-2, может помочь подтвердить наличие текущей инфекции и может дать представление об иммунологическом статусе человека. Это исследование может быть выполнено, как методом иммуноферментного анализа (ELISA),

так и с использованием технологий хемилюминесцентного анализа, а также анализа латерального потока (LFA - Lateral flow test). Разработка улучшенных тестов на антитела к SARS-CoV-2 для выявления предшествующей инфекции была определена как одна из главных диагностических задач в борьбе с пандемией COVID-19 [75]. Точная диагностика COVID-19 на индивидуальном уровне может потенциально способствовать принятию клинических решений, в то время как на популяционном уровне необходимо точное знание о предшествующей инфекции, состоянии иммунитета и текущей заболеваемости для определения приоритетности рисков, принятия управленческих решений о социальном дистанцировании, лечения и вакцинации [78]. Если исследование слюны может использоваться для выявления РНК SARS-CoV-2, а также антител против SARS-CoV-2, то этот тип биоматериала может предоставить важную возможность контролировать индивидуальную и на популяционном уровне динамику передачи инфекции и формирования иммунитета в зависимости от места и времени [79].

Понимание взаимосвязи между различными клиническими проявлениями COVID-19 и серологическим ответом, возникающим во время и после инфекции, имеет большое значение для понимания иммунопатогенеза заболевания и выбора подходящего лечения. Важным фактором является переменная клиническая картина инфекции, которая может влиять на концентрацию антител, индуцированную у субъекта. Понимание формирования антител у людей с самой низкой симптоматикой будет иметь большое значение для мониторинга передачи вируса в рамках этой пандемии COVID-19 [80]. Разработка новых тестов на антитела требует всестороннего понимания гуморального ответа по всем проявлениям заболевания, вызванных этим патогеном. В Российской Федерации зарегистрированы 50 экспресс-тестов производства разных стран для выявления иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 (по состоянию на 25.08.2020). Необходимость иметь возможность идентифицировать тех, кто ранее был инфицирован SARS-CoV-2, привела к разработке иммуноанализов, предназначенных для измерения количества антител в качестве сигнатуры воздействия. Исследования в когортах пациентов с SARS-CoV-2 показывают, что ответы антител развиваются с разной скоростью в зависимости от тяжести заболевания. В целом титры антител выше у пациентов с критическим или тяжелым заболеванием по сравнению с пациентами с более легким течением болезни [81,82]. Важный вывод из этих ответов состоит в том, что относительно просто обнаружить антитела у пациентов с тяжелым заболеванием и что сосредоточение внимания на обнаружении ответов у тех, у кого заболевание гораздо менее тяжелое или бессимптомно, может быть полезным для максимизации чувствительности теста на антитела. Когда оценивались подклассы IgG, IgG1 и IgG3 были наиболее распространенными во всех протестированных образцах, и они также

были выше у госпитализированных пациентов, чем у пациентов с легкой формой заболевания. Это важно, поскольку было высказано предположение, что антитела могут играть роль в патогенезе, включая возможную роль IgG1 в качестве медиатора острого повреждения легких при COVID-19 [83]. Анализы антител также показали потенциал в диагностике осложнений, связанных с SARS-CoV-2, а также для определения распространенности серотипа среди медицинских работников в условиях стационара [84]. Эти реальные примеры использования тестов на антитела подчеркивают потенциал этих исследований для помощи в диагностике и иммунном надзоре. Если из-за COVID-19 возникают постинфекционные осложнения, очевидным преимуществом будет наличие высококачественных анализов для выявления предшествующей инфекции. В совокупности эти аргументы подтверждают пользу и ценность тестов на антитела в условиях нынешней пандемии [85].

Присутствие в слюне специфических антител к SARS-CoV-2 продемонстрировано исследованиями [85,86]. Isho B. et al., (2020) [87] изучили ответы IgG, IgA и IgM на спайковый белок SARS-CoV-2 (полноразмерный тример) и его рецептор-связывающий домен (RBD) в сыворотке и слюне пациентов в остром периоде и у выздоравливающих пациентов с лабораторно диагностированным COVID-19 в течение 3–115 дней после появления симптомов по сравнению с отрицательным контролем. В то время как специфичность анализов слюны была очень хорошей для ответов IgG против спайкового белка и против RBD, это было менее верно для IgA, особенно для ответа IgA против RBD. Ответы антител против SARS-CoV-2 были легко обнаружены в сыворотке и слюне, при этом пиковые уровни IgG достигаются через 16–30 дней после появления симптомов. Анализ стабильности уровней антител в течение первых трех месяцев после заражения как в сыворотке, так и в слюне показал отсутствие резкого снижения уровней анти-спайк, анти-RBD или анти-NP IgG за 3-месячный период. То же самое отмечено для антиген-специфических измерений в слюне (анти-спайк и анти-RBD IgG). Однако IgA и IgM ответы на антигены SARS-CoV-2 снижались как в сыворотке, так и в слюне. Наконец, ответы IgG, IgM и, в меньшей степени, IgA на спайк и RBD положительно коррелировали между парными образцами сыворотки и слюны. Следовательно, по крайней мере, для измерений IgM против спайкового белка и IgG против RBD, слюна может представлять собой хорошую альтернативу для тестирования антител. Полученные авторами данные показывают, что устойчивый IgG-ответ против антигенов SARS-CoV-2 генерируется как в слюне, так и в сыворотке у большинства пациентов с COVID-19. Из трех измеренных изотипов ответ IgA меньше всего коррелирует между сывороткой и слюной, особенно для антигена RBD. Это может указывать на некоторую компартиментализацию ответа IgA в ротовой полости по

сравнению с периферией. Это исследование подтверждает, что антитела IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке и слюне сохраняются у большинства пациентов с COVID-19 в течение как минимум 3 месяцев после появления симптомов. IgG-ответы в слюне могут служить суррогатным показателем системного иммунитета к SARS-CoV-2 на основе их корреляции с сывороточными IgG-ответами.

Pisanic N. et al., (2020) [88] исследовали информативность определения антител, специфичных для SARS-CoV-2 в слюне, для выявления предшествующей инфекции COVID-19 с такой же чувствительностью и специфичностью, как и при тестировании сыворотки. Авторы также оценили способность тестирования антител в слюне отражать временные профили, наблюдаемые по данным исследования сыворотки путем сравнения кинетики антител в слюне с кинетикой в сыворотке по времени с момента появления симптомов COVID-19. Мультиплексный иммуноанализ, включающий десять антигенов SARS-CoV-2 был использован для тестирования в общей сложности 167 образцов слюны от 150 человек и 324 образцов сыворотки от 171 человека. Это исследование показало, что антиген-специфические ответы антител SARS-CoV-2 в слюне отражают те, которые наблюдаются в сыворотке крови. Тестирование ответов IgG, специфичных для SARS-CoV-2, можно использовать для точного обнаружения предшествующей инфекции SARS-CoV-2 с высокой чувствительностью и специфичностью. Когда слюна была собрана через ≥ 10 дней после появления симптомов, анализ IgG к SARS-CoV-2 выявляет инфекцию SARS-CoV-2 со 100% чувствительностью и 99% специфичностью. Кроме того установлено, что временная кинетика ответов IgG, специфичных для SARS-CoV-2, в слюне согласуется с изменениями, наблюдаемыми в сыворотке крови и указывает на то, что у большинства людей происходит сероконверсия примерно через 10 дней после появления симптомов COVID-19 или примерно через две недели после предполагаемого инфицирования. Основываясь на этих результатах, можно точно измерить ответ IgG слюны для выявления людей с предшествующей инфекцией SARS-CoV-2. Предложенный авторами мультиплексный иммуноферментный анализ слюны может служить неинвазивным подходом для точного и крупномасштабного «серологического» эпиднадзора за SARS-CoV-2 поскольку образцы слюны можно собирать самостоятельно и отправлять по почте при температуре окружающей среды [89]. Исследование на антитела к SARS-CoV-2 с использованием слюны может значительно увеличить масштаб тестирования - особенно среди восприимчивых групп населения - по сравнению с кровью и может прояснить популяционный иммунитет и предрасположенность к SARS-CoV-2. Точный тест на антитела к SARS-CoV-2 на основе образцов слюны к предшествующей инфекции COVID-19 значительно улучшил бы способность принимать меры общественного здравоохранения в условиях текущей пандемии. Этот неинвазивный

метод комплексного определения предшествующего инфицирования SARS-CoV-2 может облегчить широкомасштабное «серологическое» наблюдение для оценки популяционного иммунитета. По мере того, как вакцины-кандидаты от COVID-19 проходят клинические испытания, такие неинвазивные тесты будут иметь решающее значение для выявления пробелов в иммунитете восприимчивых групп населения для информирования при проведении целевой вакцинации, а также в качестве сопутствующей диагностики для испытаний вакцин [88]. В нескольких исследованиях слюна использовалась как образец для выявления антител к SARS-CoV-2. В одном из этих исследований антиспайковые (но не нуклеокапсидные) ответы антител IgG, IgA и IgM были легко обнаружены в слюне госпитализированных пациентов с симптомами COVID-19 и у лиц без симптомов заболевания. Интересно, что ответы антител в слюне и сыворотке, а также наличие клинических симптомов COVID-19 в значительной степени независимы друг от друга [85]. В другом исследовании с использованием мультиплексного иммуноанализа на антитела к SARS-CoV-2 на основе технологии Luminex, который включал 12 антигенов CoV, в основном происходящих из нуклеокапсида SARS-CoV-2 и шипа, образцы слюны и сыворотки, собранные в подтвержденных случаях COVID-19, были протестированы на IgG, IgA и IgM в панели антигенов. Соответствующие ответы IgG в слюне и сыворотке значимо коррелировали. Ответ анти-N IgG в слюне показал наивысшую чувствительность (100%), продемонстрировав положительный ответ в подтвержденных ОТ-ПЦР случаях COVID-19, взятых через 14 дней после появления симптомов, тогда как ответ IgG-рецепторсвязывающего домена давал 100% специфичность. Временная кинетика IgG в слюне соответствовала кинетике, наблюдаемой в крови. Алгоритмы, использующие комбинацию ответа IgG на антигены нуклеокапсида и спайкового белка, обладают высокой (100%) диагностической точностью. Эти результаты подтверждают использование теста на антитела на основе слюны в качестве неинвазивной и масштабируемой альтернативы тестированию на антитела на основе крови [86].

Одним из преимуществ слюны перед образцами крови является наличие антител IgA. Антитела IgA уже были описаны как играющие роль в иммунных ответах на SARS-CoV-2. Сывороточные IgA были обнаружены в сыворотке пациентов с COVID-19 и, по-видимому, обнаруживаются раньше, чем антитела IgM или IgG, возможно, уже через 2 дня после появления симптомов [90]. Это говорит о том, что IgA может быть первым антителом, которое появится в ответ на инфекцию SARS-CoV-2, в отличие от антител IgM и IgG, которые обычно содержатся в меньшей концентрации в слюне, чем в крови, IgA хорошо представлены в ротовой жидкости, потому что они являются основным классом антител, обнаруживаемых в секретах слизистой оболочки. Этот секреторный IgA (sIgA) выполняет

ряд важных функций в формировании иммунитета слизистой оболочки. Основная функция заключается в предотвращении заражения патогенами клеток-хозяев посредством иммунного исключения, конкурируя за лиганды клетки-хозяина, которые запускают проникновение вируса. В случае SARS-CoV-2 антитела sIgA могут предотвращать адгезию к эпителиальным клеткам-мишеням посредством нейтрализации шипового (спайкового) белка коронавируса (и, таким образом, ингибирования его взаимодействия с рецептором ACE-2 хозяина [91] или связывание с белком нуклеокапсида SARS-CoV-2. Помимо своей важной роли в иммунитете слизистых оболочек и очевидной важности в регуляции реакции организма на респираторные инфекции, IgA актуален также для общественного здравоохранения по причине целесообразности его популяционного тестирования для оценки формирования коллективного иммунитета. Как и в случае с другими респираторными инфекциями, IgA слюны коррелирует с системными уровнями антител против SARS-CoV-2. Как секретлируемое антитело, sIgA легко доступен для обнаружения в слюне по сравнению с другими типами биоматериалов, что обуславливает привлекательность тестирования слюны благодаря простоте ее сбора. Учитывая простоту сбора слюны, IgA слюны может быть особенно привлекательным инструментом для выявления и отслеживания уязвимых групп населения повышенного риска [85,86].

В недавнем исследовании с использованием протокола ELISA, специально разработанного для выявления IgA в слюне (Brevitest IgA Salivary Mucosal Test [BRAVO]), получены данные тестирования слюны пациентов, которые ранее дали положительный результат ПЦР на SARS-CoV-2. Авторы охарактеризовали IgA слюны к SARS-CoV-2 как доступный биомаркер иммунитета слизистой оболочки против COVID-19. Показана чувствительность и специфичность теста 92% и 97% соответственно, с p -значением $<0,0001$ по двустороннему точному критерию Фишера [92]. Тест на IgA был разработан с использованием платформы Brevitest, которая недавно была представлен в FDA для получения разрешения на использование в чрезвычайных ситуациях (EUA). Платформа Brevitest, на которой работает анализ BRAVO, предназначена для быстрого (<15 минут) количественного иммуноанализа в месте оказания медицинской помощи. Тест был проверен на качественное определение IgA в слюне в соответствии с рекомендациями FDA с использованием ПЦР-подтвержденных субъектов в качестве истинно положительной группы и образцов слюны, полученных до появления COVID-19, как истинно отрицательных. Количественные показатели уровня IgA в слюне против SARS-CoV-2 как в пробах до COVID, так и в слизистых демонстрируют широкий диапазон концентраций IgA у субъектов, указывая на стойкость IgA в слюне к SARS-CoV-2 в течение как минимум 3 месяцев после появления симптомов и потенциальную корреляцию между уровнями IgA в слюне и

тяжестью заболевания. Констатация того, что антитела IgA слизистой оболочки к SARS-CoV-2 сохраняются в течение нескольких месяцев, особенно интригует, учитывая недавно опубликованные данные о том, что титры системных антител IgG могут снизиться в течение месяца [93]. Эти результаты предполагают потенциальную роль тестирования IgA в слюне, как для клинического ведения отдельных пациентов, так и для понимания уровня инфицированности населения, а также при разработке и внедрении вакцин.

Faustini et al. (2020) [85] при тестировании образцов сыворотки и слюны с использованием модифицированного ими методов ELISA для обнаружения антител у лиц с более низким уровнем специфических антител к SARS-CoV-2 обнаружили минимальную корреляцию между анти-S-антителами в сыворотке и слюне. Тем не менее, у многих людей был только один положительный результат - или в сыворотке или в слюне. Таким образом, полагаясь на анализ одного из биообразцов, можно значительно недооценить истинные уровни инфицированности обследуемых. Более того, это несоответствие может иметь значение для понимания механизмов формирования защитного ответа антител и требуются ли антитела в одном или нескольких сайтах для оптимальной защиты. Таким образом, метод ELISA, модифицированный для обнаружения антител в сыворотке и слюне от лиц с тяжелой, легкой и бессимптомной формой COVID-19, может служить важным инструментом для оценки как краткосрочного, так и долгосрочного гуморального иммунитета к COVID-19 и понимания природы естественных и индуцированных вакцинами защитных реакций на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 [85]. Если IgA слизистой оболочки при COVID-19 ведет себя так же, как описано для других респираторных патогенов, уровни IgA в слюне могут иметь клиническое значение. Исследование взаимосвязи между изменениями IgA в слюне и респираторными инфекциями у людей показало, что снижение уровня IgA коррелирует с увеличением заболеваемости респираторными инфекциями [94,95]. Эти данные свидетельствуют о том, что люди, которые являются слизисто-отрицательными по IgA слюны против SARS-CoV-2, могут иметь повышенный риск инфекции и / или тяжести заболевания. Напротив, есть данные, свидетельствующие о том, что чрезмерные уровни IgA слизистой оболочки могут вызывать патологический воспалительный ответ [96]. COVID-19 характеризуется внезапным ухудшением дыхания у пациентов, а sIgA может вызывать воспалительную реакцию в дыхательных путях, включая активацию нейтрофилов [97]. Недавние препринты сообщают, что системная нейтрофильная активация, по-видимому, является маркером тяжести COVID-19 [98]. Таким образом, если корреляция между клиническим исходом и избыточным уровнем IgA в слюне будет установлена, повышенный уровень IgA в слюне может служить биомаркером для выявления пациентов с повышенным риском клинического ухудшения COVID-19 и, возможно, кандидатов на раннее лечение

стероидами [99]. Сообщения о том, что IgA в крови может быть обнаружен раньше, чем системные IgG или IgM, [96,90] согласуются с ролью IgA в раннем ответе, а также с данными о том, что положительный IgA в слюне может выявляться одновременно с обнаружением вируса с помощью ПЦР. Полагают, что основным препятствием на пути успешного сдерживания COVID-19 является относительно высокий уровень ложноотрицательности при проведении ПЦР-тестирования, а также отсутствие своевременных результатов, которые препятствуют отслеживанию контактов. Если раннее появление антител IgA к SARS-CoV-2 в слюне подтверждено, то тестирование IgA слюны может служить полезным инструментом раннего скрининга COVID-19, гораздо более привлекательным для пациентов и клиницистов, чем исследование биоматериала назофарингеального мазка с использованием ПЦР. Таким образом, представленная в литературе информация по серологии IgA слюны, согласуется с обширными опубликованными данными о критической роли, которую играет иммунитет слизистой оболочки в защите от респираторных вирусов, а также роль sIgA и возможность его использования в ведении пациентов с COVID-19. IgA слюны может быть полезным индикатором нескольких ключевых параметров, включая индивидуальный и коллективный иммунитет, клинический риск и степень тяжести заболевания. Тестирование иммунных ответов IgA слюны могут быть полезно при разработке и внедрении вакцин против COVID-19.

Результативность саливадиагностики COVID -19 на основе выявления SARS-CoV-2 в ротовой жидкости

Возможности использования ротовой жидкости / слюны как биоматериала для диагностики COVID-19, изучалась и продолжает изучаться в ряде стран у пациентов, с различной формой [100,41,101] и степенью тяжести заболевания [46,68,71]. В большинстве исследований сообщалось о результатах анализа, проведенного с небольшими выборками пациентов (200 субъектов или меньше) [3,27,66], хотя недавно были опубликованы исследования с более крупными когортами (около 1000 субъектов) [69,60]. Показано [42], что образцы слюны демонстрируют более высокую чувствительность, чем мазки из носоглотки, и подтверждают результаты предыдущих исследований [40,56,102]. В случаях COVID-19 результаты анализов обоих типов образцов в период сразу после появления симптомов соответствовали друг другу. Поэтому многие исследователи предлагают использовать слюну вместо мазков из носоглотки при первичном выявлении пациентов с COVID-19. Также существует огромный интерес к слюне как к первичному типу образцов для выявления SARS-CoV-2 у детей, что важно для понимания динамики передачи вирусов в этой когорте пациентов. К сожалению, данные об использовании слюны для обнаружения

SARS-CoV-2 у педиатрических пациентов немногочисленны. Несколько доступных отчетов об использовании образцов слюны у детей показали низкое обнаружение SARS-CoV-2 с чувствительностью 53-73% хотя эти исследования включали небольшие выборки образцов биоматериала [103,104].

Yee R. et al., (2020) [105] оценили и сравнили проспективно собранные парные образцы мазки слюны и NPS у педиатрических и взрослых пациентов для выявления SARS-CoV-2. Парные образцы были собраны у людей с неизвестным статусом COVID-19, а также у пациентов, ранее положительных на SARS-CoV-2. Парные мазки из носоглотки и слюна были исследованы с использованием рОТ-ПЦР в лаборатории клинической вирусологии детской больницы Лос-Анджелеса. Это первое и крупнейшее исследование, демонстрирующее поддержку использования слюны в детской возрастной группе и сравнение показателей слюны между педиатрическими и взрослыми когортами. Важно отметить, что тестирование слюны выявило ряд случаев COVID-19, которые были отрицательными по данным NPS. Зафиксировано обнаружение SARS-CoV-2 в слюне в срок до 43 дней наблюдения по сравнению с 32 днями для мазков NP. Противоречивые результаты между исследованиями могут быть связаны с различиями в протоколе сбора слюны и вариабельностью характеристик образцов. Это исследование показало, что слюна является надежным диагностическим образцом для обнаружения РНК SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР, особенно у детей с симптомами и без симптомов, а также у взрослых с симптомами, который может использоваться для широкомасштабного тестирования на SARS-CoV-2 в стационарных условиях и в обществе.

Заключение

Заключая данный обзор, мы сочли целесообразным отойти от традиционной формы резюмирующих обобщений. Вместо этого вниманию читателей представляется информация, характеризующая внимание ряда государственных структур и общественных институтов к обсуждаемой проблеме, что, по-видимому, отражает ее актуальность и место в поиске путей борьбы с пандемией COVID-19. В этой связи приведены данные о регламентации диагностических исследований слюны в ряде стран, которые в существенной мере отражают внимание специалистов и общества к возможностям саливадиагностики COVID-19.

В настоящее время ротовая жидкость рассматривается как альтернативный биоматериал или дополнение к образцу мазка из носоглотки. Доказательством этого является факт того, что Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США предоставило разрешение на использование в экстренных случаях (EUA) тестирования слюны в качестве биоматериала для обнаружения SARS-CoV-2 (13 апреля 2020 г., <https://www.rutgers.edu/news/new-rutgers-saliva-test-coronavirus-gets->

fdaapproval). Кроме того, FDA санкционировало диагностический тест с возможностью использования образцов слюны, собранных в домашних условиях, для тестирования COVID-19 и выдало разрешение на экстренное использование (EUA) Лаборатории клинической геномики Rutgers образцов биоматериала, самостоятельно взятых пациентами дома с помощью устройства для сбора слюны Spectrum Solutions LLC SDNA-1000 (8 мая 2020 г., <https://www.rutgers.edu/news/fda-Approves-first-home-saliva-collection-test-coronavirustest>). FDA отметило в своем выпуске, что тест Рутгерса в настоящее время является единственным авторизованным диагностическим тестом на Covid-19, который использует образцы слюны для тестирования на новый коронавирус (<https://www.fda.gov/media/137773/download>). С помощью теста люди могут собрать свою собственную слюну дома и отправить свои образцы в лабораторию для результатов. Рутгерский университет — государственный исследовательский университет США, крупнейшее высшее учебное заведение штата Нью-Джерси. В заявлении университета отмечается, что новая технология сбора слюны в домашних условиях позволяет проводить более широкий анализ, чем при использовании стандартного метода с использованием мазков из носа и горла в медицинском учреждении или в месте тестирования.

Министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии одобрило (июнь, 2020) проведение доклинических ПЦР-тестов на COVID-19 с использованием слюны в стоматологических клиниках с оплатой за счет средств страховых фондов [106].

Роль саливадиагностики во время пандемии COVID-19 привлекает все большее внимание исследователей во всем мире по нескольким причинам. Во-первых, чувствительность образца слюны сопоставима с чувствительностью респираторных образцов. Во-вторых, ротовая жидкость может собираться самостоятельно испытуемыми, либо его могут проводить обученный персонал, не являющийся медицинскими специалистами, что существенно снижает риск передачи вируса медицинским работникам. Наконец, использование этого метода может сэкономить медицинские человеческие ресурсы во время пика вспышки пандемии, что имеет первостепенное значение для системы здравоохранения стран, столкнувшихся с таким событием.

Наконец, саливадиагностика COVID-19 является перспективной для прямого тестирования в условиях “по требованию” в местах социальной агрегации людей для программ массового скрининга и для анализа образцов слюны непосредственно там, где требуется тест на наличие SARS-CoV-2, например в школе, кинотеатре или театре, ресторане или аэропорту. Выявление бессимптомных инфицированных лиц до того, как они попадут в замкнутое пространство и распространят инфекцию среди других людей, представляет собой основную сложную проблему для всех государственных учреждений, частного бизнеса или

общественной деятельности [107]. Экономический кризис, последовавший за чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения, вызванной эпидемией, вскоре сделает неприемлемым продление любого широко распространенного протокола изоляции или жестких ограничений на поездки людей. Следовательно, необходима программа массового скрининга, и она должна полагаться на диагностические технологии, которые также могут использоваться немедицинским персоналом для быстрой оценки того, является ли человек заразным. Экспресс-тесты слюны на антиген могут представлять собой ключевую стратегию сдерживания пандемии COVID-19. Использование своевременных, точных и неинвазивных тестов для выявления SARS-CoV-2 будет способствовать принятию эффективных крупномасштабных мер по борьбе с пандемией COVID-19.

Список литературы

1. Jamal M., Shah M., Almarzooqi S.H., et al. Overview of transnational recommendations for COVID-19 transmission control in dental care settings. *Oral Dis.* 2020. 00. P. 1–10. DOI: 10.1111/odi.13431.
2. Xu R., Cui B., Duan X., Zhang P., Zhou X., Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int. J. Oral. Sci.* 2020. V. 12(1). P. 11. DOI: 10.1038/s41368-020-0080-z.
3. Wyllie A.L., Fournier J., Casanovas-Massana A., et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 383(13). P. 1283-1286. DOI: 10.1056/NEJMc2016359.
4. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., et al.; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382(8). P. 727–733.
5. Li X., Geng M., Peng Y., Meng L., Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm Anal.* 2020. V. 10(2). P. 102-108. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.
6. Sri Santosh T., Parmar R., Anand H., Srikanth K., Saritha M. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus.* 2020. V. 12(4). P. e7708. DOI: 10.7759/cureus.7708.
7. Meselson M. Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382(21). P. 2063. DOI: 10.1056/NEJMc2009324.
8. Wang Y., Kang H., Liu X., Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. P. 538–539. DOI: 10.1002/jmv.25721.

9. Corman V.M., Landt O., Kaiser M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020. V. 25. P. 1–8. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
10. Ng K., Poon P.H., Kiat Puar T.H., Shan Quah J.L., Loh W.J., Wong Y.J., Tan T.Y., Raghuram J. COVID-19 and the risk to health care workers: a case report. *Ann Intern Med*. 2020. V. 172(11). P. 766–767.
11. Wyllie A.L., Fournier J., Casanovas-Massana A. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *Med. Rxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.16.20067835.
12. Chan J.F., Yuan S., Kok K.H., et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020. pii: S0140-6736(20)30154-9.
13. Wiersinga J.W., Rhodes A., Cheng A.C., Peacock S.J., Prescott H.C. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA*. 2020. V. 324(8). P. 782–793.
14. National Institute of Infectious Diseases Japan nCoV (new coronavirus) Sample collection and transportation manual. 2019. https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/2019-nCoV_200416.pdf. Japanese ver. 16 April 2020.
15. Huang C., Wang Y., Li X., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020. pii: S0140-6736(20)30183-5.
16. Sun J., Zhu A., Li H., Zheng K., Zhuang Z., Chen Z., Shi Y., Zhang Z., Chen S., Liu X., et al. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 991–993.
17. Yoon J.G., Yoon J., Song J.Y., Yoon S.Y., Lim C.S., Seong H., Noh J.Y., Cheong H.J., Kim W.J. Clinical Significance of a High SARS-CoV-2 Viral Load in the Saliva. *J. Korean Med. Sci.* 2020. V. 35(20). P. e195. DOI: 10.3346/jkms.2020.35.e195.
18. To K.K., Tsang O.T., Yip C.C., Chan K.H., Wu T.C., Chan J.M., Leung W.S., Chik T.S., Choi C.Y., Kandamby D.H., Lung D.C., Tam A.R., Poon R.W., Fung A.Y., Hung I.F., Cheng V.C., Chan J.F., Yuen K.Y. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin. Infect Dis.* 2020. V. 71(15). P. 841-843. DOI: 10.1093/cid/ciaa149.
19. Sabino-Silva R., Jardim A.C.G., Siqueira, W.L. Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. *Clin. Oral. Invest.* 2020. V. 24. P. 1619–1621. DOI: 0.1007/s00784-020-03248-x.

20. Liu L., Wei Q., Alvarez X., et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 4025–1030.
21. Xu J., Li Y., Gan F., Du Y., Yao Y. Salivary Glands: Potential Reservoirs for COVID-19 Asymptomatic Infection. *J. Dent Res.* 2020. V. 99(8). P. 989. DOI: 10.1177/0022034520918518.
22. Chen L., Zhao J., Peng J., Li X., Deng X., Geng Z. et al., Detection of 2019-nCoV in Saliva and Characterization of Oral Symptoms in COVID-19 Patients. 2020. <https://ssrn.com/abstract=3557140>.
23. Wang C., Wu H., Ding X., Ji H., Jiao P., Song H., Li S., Du H. Does infection of 2019 novel coronavirus cause acute and/or chronic sialadenitis? *Med Hypotheses.* 2020. V. 140:109789. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.109789.
24. Xu H., Zhong L., Deng J., Peng J., Dan H., Zeng X., Li T., Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral Sci.* 2020. V. 12(1). P. 8. DOI: 10.1038/s41368-020-0074-x.
25. Meng L., Hua F., Bian Z. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): emerging and future challenges for dental and oral medicine. *Journal of Dental Research.* 2020. V. 99(5). P. 481-487.
26. Yan J., Grantham M., Pantelic J., et al. EMIT Consortium Infectious virus in exhaled breath of symptomatic seasonal influenza cases from a college community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 1081–1086.
27. Williams E., Bond K., Zhang B., Putland M., Williamson D.A. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(8). P. e00776-20. DOI: 10.1128/JCM.00776-20.
28. Wang W.-K., Chen S.-Y., Liu I.-J. Detection of SARS-associated Coronavirus in Throat Wash and Saliva in Early Diagnosis. *Emerg. Infect Dis.* 2004. V. 10. P. 1213–1219.
29. Adhikari U., Chabrelie A., Weir M., Boehnke K., McKenzie E., Ikner L., Wang M., Wang Q., Young K., Haas C.N., et al. A case study evaluating the risk of infection from Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in a hospital setting through bioaerosols. *Risk Anal.* 2019. V. 39(12). P. 2608–2624.
30. To K.K., Lu L., Yip C.C., Poon R.W., Fung A.M., Cheng A., Lui D.H., Ho D.T., Hung I.F., Chan K.H., et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2017. V. 6(6). P. e49.
31. Han P, Ivanovski S. Saliva-friend and foe in the COVID-19 outbreak. *Diagnostics (Basel).* 2020. V. 10(5). P. 290.
32. Hanson K.E., Barker A.P., Hillyard D.R., Gilmore N., Barrett J.W., Orlandi R.R., Shakir S.M. Self-Collected Anterior Nasal and Saliva Specimens versus Health Care Worker-Collected

Nasopharyngeal Swabs for the Molecular Detection of SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(11). P. e01824-20. DOI: 10.1128/JCM.01824-20.

33. Byrne R.L., Kay G.A., Kontogianni K., Aljayyousi G., Brown L., Collins A.M., Cubas-Atienzar A.I. Saliva Alternative to Upper Respiratory Swabs for SARS-CoV-2 Diagnosis. *Emerging Infectious Diseases.* 2020. V. 26(11). P. 2769-2770. DOI: 10.3201/eid2611.203283.

34. Chen J.H., Yip C.C., Poon R.W., Chan K.H., Cheng V.C., Hung I.F., Chan J.F., Yuen K.Y., To K.K. Evaluating the use of posterior oropharyngeal saliva in a point-of-care assay for the detection of SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. P. 1356–1359. DOI: 10.1080/22221751.2020.1775133.

35. To K.K.W., Tsang O.T.Y., Leung W.S. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020. V. 20. P. 565–574. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

36. Vaz S.N., de Santana D.S., Netto E.M., Pedroso C., Wang W.K., Santos F.D., Brites C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Braz. J. Infect Dis.* 2020. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.08.001.

37. Sueki A., Matsuda K., Yamaguchi A. Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays. *Clin. Chim. Acta.* 2016. P. 71–74. DOI: 10.1016/j.cca.2015.12.006.

38. Ott I.M., Strine M.S., Watkins A.E., Boot M., Kalinich C.C., Harden et al. Simply saliva: stability of SARS-CoV-2 detection negates the need for expensive collection devices. *medRxiv: the preprint server for health sciences.* 2020. DOI: 10.1101/2020.08.03.20165233.

39. Griesemer S.B., Van Slyke G., Ehrbar D., Strle K., Yildirim T., Centurioni D. A., George, K. S. Evaluation of specimen types and saliva stabilization solutions for SARS-CoV-2 testing. 2020. DOI: 10.1101/2020.06.16.20133041.

40. To K.K.W., Tsang O.T.Y., Chik-Yan Yip C. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin. Infect Dis.* 2020. P. 4–6. DOI: 10.1093/cid/ciaa149.

41. Iwasaki S., Fujisawa S., Nakakubo S., Kamada K., Yamashita Y., Fukumoto T. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J. Infect.* 2020. V. 81(2). P. e145–e147. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.071.

42. Azzi L., Maurino V., Baj A., Dani M., d'Aiuto A., Fasano M., Lualdi, M., Sessa F., Alberio T. Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *Journal of dental research.* 2020. DOI: 10.1177/0022034520969670.

43. Kojima N., Turner F., Slepnev V., Bacelar A., Deming L., Kodeboyina S., Klausner J.D. Self-Collected Oral Fluid and Nasal Swab Specimens Demonstrate Comparable Sensitivity to

- Clinician-Collected Nasopharyngeal Swab Specimens for the Detection of SARS-CoV-2. *Clin. Infect Dis.* 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa1589.
44. Zheng S., Yu F., Fan J., Zou Q., Xie G., Yang, X. et al. Saliva as a Diagnostic Specimen for SARS-CoV-2 by a PCR-Based Assay: A Diagnostic Validity Study. 2020. DOI: 10.2139/ssrn.3543605.
45. Bordi L., Piralla A., Lalle E., Giardina F., Colavita F., Tallarita M., Sberna G., Novazzi F., Meschi S., Castilletti C., et al. Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using the SimplexaTM COVID-19 direct assay. *J. Clin. Virol.* 2020. V. 128. P. 104416.
46. Nagura-Ikeda M., Imai K., Tabata S., Miyoshi K., Murahara N., Mizuno T., Horiuchi M., Kato K., Imoto Y., Iwata M., et al. Clinical evaluation of self-collected saliva by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR), direct RT-qPCR, reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19. *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(9). P. e01438-20.
47. Nishimura N., Nakayama H., Yoshizumi S., Miyoshi M., Tonoike H., Shirasaki Y., Kojima K., Ishida S. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J. Virol. Methods.* 2010 V. 163. P. 282–286.
48. Pandit P., Cooper-White J., Punyadeera C. High-yield RNA-extraction method for saliva. *Clin. Chem.* 2013. V. 59. P. 1118–1122.
49. Fukumoto T., Iwasaki S., Fujisawa S., Hayasaka K., Sato K., Oguri S., et al., Efficacy of a novel SARS-CoV-2 detection kit without RNA extraction and purification. *International Journal of Infectious Diseases.* 2020. V. 98. P. 16-17. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.074.
50. Lalli M.A., Chen X., Langmade S.J., Fronick C.C., Sawyer C.S., Burcea L.C., Fulton R.S., Heinz M., Buchser W.J., Head R.D., et al. Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva with colorimetric LAMP. *medRxiv* (preprint). 2020. DOI: 10.1101/2020.05.07.20093542.
51. Lamb L., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification. *PLoS One.* 2020. V. 15(16):. P. 0234682.
52. Wei S., Kohl E., Djandji A., Morgan S., Whittier S., Mansukhani M., Yeh R., Alejaldre J.C., Fleck E., D’Alton M., et al. Field-deployable, rapid diagnostic testing of saliva samples for SARS-CoV-2. *medRxiv* (preprint). 2020. DOI: 10.1101/2020.06.13.20129841.
53. L’Helgouach N., Champigneux P., Santos Schneider F., Molina L., Espeut J., Alali M., Baptiste J., Cardeur L., Dubuc B., Foulongne V., et al. EasyCOV: LAMP based rapid detection of SARS-CoV-2 in saliva. *medRxiv* (preprint). 2020. DOI: 10.1101/2020.05.30.20117291.

54. Sarode G.S., Sarode S.C., Sengupta N., Gadbail A.R., Gondivkar S., Sharma N.K., Patil S. Clinical status determines the efficacy of salivary and nasopharyngeal samples for detection of SARS-CoV-2. *Clinical oral investigations*. 2020. V. 24(12). P. 4661–4662. DOI: 10.1007/s00784-020-03630-9.
55. To K.K.W., Yip C.C.Y., Lai C.Y.W., Wong C.K.H., Ho D.T.Y., Pang P.K.P., et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019. V. 25(3). P. 372-378. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.06.009.
56. Azzi L., Carcano G., Gianfagna F., Grossi P., Gasperina D.D., Genoni A. et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020. V. 81(1). P. e45-e50. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.005.
57. Yokota I., Shane PY, Okada K, Unoki Y, Yang Y, Inao T, et al., Mass screening of asymptomatic persons for SARS-CoV-2 using saliva. *Clin. Infect Dis.* 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa1388.
58. Rao M., Rashid F.A., Sabri F., Jamil N.N., Zain R., Hashim R., et al. Comparing nasopharyngeal swab and early morning saliva for the identification of SARS-CoV-2. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa1156.
59. Barat, B., Das, S., Giorgi, V., Henderson, D. K., Kopka, S., Lau, A. F., et al., (2020). Pooled Saliva Specimens for SARS-CoV-2 Testing. *medRxiv: the preprint server for health sciences*. 2020. DOI: 10.1101/2020.10.02.20204859.
60. Zhu J., Guo J., Xu Y., Chen X. Viral dynamics of SARS-CoV-2 in saliva from infected patients. *J. Infect.* 2020. V. 81(3). P. e48-e50. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.059.
61. Pan Y., Zhang D., Yang P., Poon L.L.M., Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis.* 2020. V. 20(4). P. 411–412.
62. Liu Y., Yan L.M., Wan L., Xiang T.X., Le A., Liu J.M. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020. V. 20(6). P. 656–657
63. Azzi L., Carcano G., Dalla Gasperina D., Sessa F., Maurino V., Baj A. Two cases of COVID-19 with positive salivary and negative pharyngeal or respiratory swabs at hospital discharge: a rising concern. *Oral Dis.* 2020. DOI: 10.1111/odi.13368.
64. Miller M., Jansen M., Bisignano A., Mahoney S., Wechsberg C., Albanese N. Validation of a Self-administrable, Saliva-based RT-qPCR Test Detecting SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.06.05.20122721.

65. Altawalrah H., AlHuraish F., Alkandari W.A., Ezzikouri S. Saliva specimens for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Kuwait: A cross-sectional study. *J. Clin. Virol.* 2020. V. 132. P. 104652. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104652.
66. Pasomsub E., Watcharananan S.P., Boonyawat K., Janchompoo P., Wongtabtim G., Suksuwan W., Sungkanuparph S., Phuphuakrat A. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020. S1198-743X(20)30278-0. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.001.
67. Czumbel L.M., Kiss S., Farkas N., Mandel I., Hegyi A., Nagy Á, Lohinai Z., Szakács Z., Hegyi P., Steward M.C., Varga G. Saliva as a candidate for COVID-19 diagnostic testing: a meta-analysis. *Front Med.* 2020. V. 7. P. 465.
68. Kim Y.G., Yun S.G., Kim M.Y., Park K., Cho C.H., Yoon S.Y., et al., Comparison between saliva and nasopharyngeal swab specimens for detection of respiratory viruses by multiplex reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2017. V. 55. P. 226–233.
69. Caulley L., Corsten M., Eapen L., Whelan J., Angel J.B., Antonation K. et al. Salivary detection of COVID-19. *Ann. Intern Med.* 2020. DOI: 10.7326/M20-4738.
70. Chau N.V.V., Lam V.T., Dung N.T., Yen L.M., Minh N.N.Q., Hung L.M., et al. The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis.* 2020. DOI:10.1093/cid/ciaa711.
71. Miguères M., Mengelle C., Dimeglio C., Didier A., Alvarez M., Delobel P., Mansuy J.M, Izopet J. Saliva sampling for diagnosing SARS-CoV-2 infections in symptomatic patients and asymptomatic carriers. *J. Clin. Virol.* 2020. V. 130. P. 104580.
72. Skolimowska K., Rayment M, Jones R, Madona P, Moore LSP, Randell P. Non-invasive saliva specimens for the diagnosis of COVID-19: caution in mild outpatient cohorts with low prevalence. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020. V. 26(12). P. 1711-1713. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.07.015.
73. Azzi L., Baj A., Alberio T., Lualdi M., Veronesi G., Carcano G., et al. Rapid salivary test suitable for a mass screening program to detect SARS-CoV-2: a diagnostic accuracy study. *J. Infect.* 2020. V. 81(3). P. e75–e78.
74. Farshidfar N., Hamedani S. The potential role of smartphone-based microfluidic systems for rapid detection of COVID-19 using saliva specimen. *Mol Diagn Ther.* 2020. V. 24(4). P. 371–373.
75. Angulo F.J., Finelli L., Swerdlow D.L. Reopening Society and the Need for Real-Time Assessment of COVID-19 at the Community Level. *JAMA.* 2020. V. 323(22). P. 2247-2248. DOI: 10.1001/jama.2020.7872.

76. Aita A., Basso D., Cattelan A.M., Fioretto P., Navaglia F., Barbaro F., et al., 2020. SARS-CoV-2 identification and IgA antibodies in saliva: One sample two tests approach for diagnosis. *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 510. P. 717–722.
77. Pisanic N., Ballard S.B., Colquechagua F.D., François R., Exum N., Yori P.P., et al. Minimally invasive saliva testing to monitor norovirus infection in community settings. *J. Infect Dis.* 2019. V. 219. P. 1234–1242.
78. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, Lu L, Jiang S, Yang Z, Wu Y, Ying T. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS oronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect.* 2020. V. 9. P. 382–385.
79. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann AJ., et al., The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol.* 2020. DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
80. Park S.W., Cornforth D.M., Dushoff J., Weitz J.S.. The time scale of asymptomatic transmission affects estimates of epidemic potential in the COVID-19 outbreak. *Epidemics.* 2020. V. 31. P. 100392. DOI:10.1016/j.epidem.2020.100392.
81. Sun B., Feng Y., Mo X., Zheng P., Wang Q., Li P., et al., Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 940-948. DOI: 10.1080/22221751.2020.1762515.
82. Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology.* 2020. V. 9(5). P. e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.
83. Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., et al., Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019. V. 4(4). P. e123158. DOI: 10.1172/jci.insight.123158.
84. Shields A.M., Faustini S.E., Perez-Toledo M., Jossi S., Aldera E.L., Joel D Allen J.D., et al. SARS-CoV-2 seroconversion in health care workers. *medRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.05.18.20105197.
85. Faustini S.E., Jossi S.E., Perez-Toledo M., Shields A.M., Allen J.D., Watanabe Y., et al. 2020. Detection of antibodies to the SARS-CoV-2 spike glycoprotein in both serum and saliva enhances detection of infection. *medRxiv (preprint).* 2020. DOI: 10.1101/ 2020.06.16.20133025.
86. Randad P.R., Pisanic N., Kruczynski K., Manabe Y.C., Thomas D., Pekosz A., et al. COVID-19 serology at population scale: SARS-CoV-2-specific antibody responses in saliva. *medRxiv [Preprint].* 2020. DOI: 10.1101/2020.05.24.20112300.

87. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.* 2020. V. 5(52). P. eabe5511. DOI: 10.1126/sciimmunol.abe5511.
88. Pisanic N., Randad P.R., Kruczynski K., Manabe Y.C., Thomas D.L., Pekosz A., et al. COVID-19 serology at population scale: SARS-CoV-2-specific antibody responses in saliva. *J. Clin. Microbiol.* 2020. DOI: 10.1128/JCM.02204-20.
89. Lassaunière R., Frische A., Harboe Z., Nielsen A.C., Fomsgaard A., Krogfelt K., Jørgensen C. 2020. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.09.20056325.
90. Yu H.Q., Sun B.Q., Fang Z.F., Zhao J.C., Liu X.Y., Li Y.M., et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur. Respir J.* 2020. V. 56(2). P. 2001526.
91. 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. V. 579. P. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
92. Varadhachary A., Chatterjee D., Garza J., Garr R.P., Foley C., Letkeman A.F. et al. Salivary anti-SARS-CoV-2 IgA as an accessible biomarker of mucosal immunity against COVID-19. *medRxiv (preprint)*. 2020. DOI: 10.1101/2020.08.07.20170258.
93. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P. et al. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(4). P. 424-432. DOI: 10.1002/jmv.25685.
94. Neville V., Gleeson M., Folland J.P. Salivary IgA as a risk factor for upper respiratory infections in elite professional athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2008. V. 40(7). P. 1228-1236. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31816be9c3.
95. Chaushu S., Yefenof E., Becker A., Shapira J., Chaushu G. A link between parotid salivary Ig level and recurrent respiratory infections in young Down's syndrome patients. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002. V. 17(3). P. 172-176. DOI: 10.1034/j.1399-302x.2002.170306.x.
96. Ma H., Zeng W., He H., Zhao D., Jiang D., Zhou P., Cheng L., Li Y., Ma X., Jin T. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell. Mol. Immunol.* 2020. V. 17(7). P. 773-775. DOI: 10.1038/s41423-020-0474-z.
97. Morton H.C., van Egmond M., van de Winkel J.G. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit. Rev. Immunol.* 1996. V. 16(4). P. 423-440.
98. Shi H., Zuo Y., Yalavarthi S., Gockman K., Zuo M., Madison J.A., et al. Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *medRxiv [Preprint]*. 2020. DOI: 10.1101/2020.05.06.20093070.

99. Mahase E. Covid-19: Low dose steroid cuts death in ventilated patients by one third, trial finds. *BMJ*. 2020. V. 369. P. m2422. DOI: 10.1136/bmj.m2422. PMID: 32546467.
100. Becker D., Sandoval E., Amin A. Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv* (preprint). 2020. DOI: 10.1101/2020.05.11.20092338.
101. Jamal A.J., Mozafarihashjin M., Coomes E., Powis J., Li A.X., Paterson A., et al. Sensitivity of nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect Dis*. 2020. DOI:10.1093/cid/ciaa848.
102. Khurshid Z., Asiri F.Y.I., Al Wadaani H. Human saliva: non-invasive fluid for detecting novel coronavirus (2019-nCoV) *Int. J. Environ Res. Publ. Health*. 2020. DOI: 10.3390/ijerph17072225.
103. Han M.S., Seong M.W., Kim N., Shin S., Cho S.I., Park H., Kim T.S., Park S.S., Choi E.H. Viral RNA Load in Mildly Symptomatic and Asymptomatic Children with COVID-19, Seoul, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2020. V. 26(10). P. 2497-2499. DOI: 10.3201/eid2610.202449.
104. Chong C.Y., Kam K.Q., Li J., Maiwald M., Loo L.H., Nadua K.D., Tan N.W.H., Yung C.F., Thoon K.C. Saliva is not a useful diagnostic specimen in children with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020. P. ciaa1376. DOI: 10.1093/cid/ciaa1376.
105. Yee R., Truong T., Pannaraj P.S., Eubanks N., Gai E., Jumarang J., Turner L., Peralta A., Lee Y., Bard J. D. Saliva is a promising alternative specimen for the detection of SARS-CoV-2 in children and adults. *medRxiv* [Preprint]. 2020. DOI: 10.1101/2020.10.25.20219055.
106. Takeuchi Y., Furuchi M., Kamimoto A., Honda K., Matsumura H., Kobayashi R. Saliva-based PCR tests for SARS-CoV-2 detection. *J. Oral Sci*. 2020 V. 62(3). P. 350-351. DOI: 10.2334/josnusd.20-0267. PMID: 32581183.
107. Lavezzo E., Franchin E., Ciavarella C., Cuomo-Dannenburg G., Barzon L., Del Vecchio C. et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature*. 2020. V. 584(7821). P. 425–429.