

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени
Патриса Лумумбы»

На правах рукописи

Генералова Любовь Викторовна

**МОДИФИКАЦИЯ ПОДХОДОВ К КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОМУ
ОБСЛЕДОВАНИЮ ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19)**

3.1.22. Инфекционные болезни

1.5.11. Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Бургасова Ольга Александровна,

доктор медицинских наук

Гущин Владимир Алексеевич,

кандидат биологических наук

Москва 2023

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19 и анализ факторов, ассоциированных с тяжелым течением болезни.....	13
1.2. Характеристика гуморального ответа у пациентов с COVID-19.....	21
1.3. Подходы к диагностике COVID-19 на современном этапе.....	36
Глава 2. Материалы и методы.....	50
2.1. Пациенты, находившиеся под наблюдением.....	50
2.2. Общеклинические, лабораторные и инструментальные методы исследования.....	55
2.3. Молекулярно-генетические методы диагностики.....	57
2.4. Серологические методы исследования.....	58
2.4.1. Детекция иммуноглобулинов классов М+А к S-белку SARS-CoV-2 методом ИФА.....	58
2.4.2. Детекция специфических IgG антител к структурным белкам нуклеокапсида (Nc) и рецептор-связывающего гликопротеида шиповидного белка S (RBD) коронавируса SARS-CoV-2.....	59
2.4.3. Детекция нейтрализующих антител (IgG) к рецептор-связывающему домену (RBD) методом ИФА.....	60
2.4.4. Измерение авидности антител.....	61
2.5. Статистические методы исследования.....	62
2.5.1. Методы вариационной статистики, применяемые для оценки клинико-лабораторных показателей.....	62
2.5.2. Методы вариационной статистики, применяемые для оценки показателей гуморального ответа.....	65
Глава 3. Клиническая характеристика пациентов с COVID-19.....	67
3.1. Ретроспективный анализ историй болезни пациентов с COVID-19, находившихся в стационаре в период с апреля по июль 2020 г.....	67
3.2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19, находившихся в стационаре в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г.....	80

3.3. Клиническая характеристика реконвалесцентов COVID-19, находившихся под наблюдением с ноября 2020 г. по сентябрь 2021 г.....	101
3.4. Описание клинического случая тяжелого течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19).....	104
Глава 4. Оценка гуморального ответа у стационарных пациентов с COVID-19.....	110
4.1. Определение иммуноглобулинов классов М и А к S-белку SARS-CoV-2 у пациентов различных групп тяжести с COVID-19 методом ИФА в динамике заболевания.....	111
4.2. Определение антител IgG к рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD) и нуклеокапсиду (Nc) SARS-CoV-2 у пациентов различных групп тяжести с COVID-19 в динамике заболевания.....	118
4.3. Определение нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у переболевших и вакцинированных.....	128
4.3.1. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у больных COVID-19.....	130
4.3.2. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у вакцинированных против COVID-19.....	138
4.3.3. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у заболевших вакцинированных против COVID-19.....	141
4.3.4. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у повторно заболевших COVID-19 для прогнозирования тяжести заболевания.....	144
Глава 5. Совершенствование подходов к тактике лабораторного обследования пациентов с COVID-19.....	151
5.1. Алгоритм диагностики стационарных пациентов с COVID-19.....	154
Заключение.....	157
Практические рекомендации.....	166
Перспективы дальнейшей разработки темы	168
Список сокращений.....	169
Список литературы.....	171

Введение

Актуальность темы исследования. Появление новых инфекционных болезней дает серьезный импульс к всестороннему изучению клинико-лабораторных, патофизиологических, микробиологических, диагностических и профилактических аспектов этих инфекций. Не стала исключением и пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, впервые зарегистрированной как тяжелая пневмония неизвестной этиологии в г. Ухань провинции Хубей (КНР) в декабре 2019 г., охватившая многие страны мира, в том числе и Россию. Всемирная организация здравоохранения 30 января 2020 г. сообщила о чрезвычайной ситуации международного характера в области общественного здравоохранения [1,2].

Крайне важным для практического здравоохранения было определение ведущих клинических проявлений и форм заболевания, особенно на первом этапе пандемии, знание которых позволило своевременно ставить клинический диагноз, определить факторы, ассоциированные с тяжелым течением COVID-19, структурировать подходы к госпитализации и терапии, что в свою очередь способствовало стабилизации системы здравоохранения и поддержке социально-психологической стабильности в обществе.

Накопленный на сегодняшний день опыт свидетельствует о том, что клинические проявления болезни варьируют от бессимптомных до клинически ярко выраженных форм. Уже в начале пандемии стало известно, что клинически выраженными формами заболевания являются поражения нижних дыхательных путей с развитием тяжелых осложнений в виде: ОДН, ОРДС, сепсиса, инфекционно-токсического шока, ДВС-синдрома [3]. До настоящего времени медицинское сообщество владеет только частью информации о клинических вариантах заболевания и факторах тяжелого

течения болезни у пациентов с COVID-19, глубокое изучение которых потребует анализа и дополнительного времени.

Этиологическое подтверждение диагноза базируется на комплексном подходе к диагностике, в том числе и оценке гуморального ответа к активным рецепторам SARS-CoV-2. Известно, что вирус SARS-CoV-2 имеет четыре основных структурных белка: спайковый белок (S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (Nc). При заболевании наиболее выраженный антительный ответ вырабатывается как к Nc, так и к S-белку коронавируса. Как правило выявление IgM и IgA к S-белку свидетельствует о недавнем инфицировании вирусом SARS-CoV-2, подтверждая наличие раннего иммунного ответа к COVID-19 после встречи с вирусом. Считается, что IgM чаще обнаруживаются в крови на 5-7 день появления симптомов, достигают пика через неделю и могут сохраняться в течение 2 и более месяцев. IgA антитела экспрессируются с 11 дня болезни, достигают максимума через 3-4 недели и снижаются к 1,5-2 месяцам после заражения [4,5,6]. Примерно с 3-й недели или ранее определяются специфические антитела класса G к SARS-CoV-2, которые достигают максимального уровня на 6-7 неделе после начала заболевания и затем медленно снижаются, однако остаются высокими на протяжении нескольких месяцев, выполняя защитную функцию от инфекции [7, 8, 9].

Учитывая наличие особенностей формирования гуморального иммунитета, исследована эффективность применения иммуноферментного анализа (ИФА) при определении спектра иммуноглобулинов классов M, A и G к основным структурным белкам коронавируса SARS-CoV-2 в динамике заболевания в зависимости от тяжести болезни у стационарных пациентов с лабораторно подтверждённым диагнозом COVID-19 и уровня защитных антител для обоснования алгоритма обследования больных и прогнозирования течения заболевания.

Степень разработанности темы. Анализ научной литературы показал, что степень разработанности темы исследования на сегодняшний день недостаточная, особенно в вопросах изучения некоторых аспектов гуморального ответа; мало изучены вопросы иммунного ответа в динамике заболевания с учетом клинических форм и тяжести течения болезни. Недостаточно изучена информационная значимость avidности специфических G антител при респираторных инфекциях, в связи с чем изучение этих аспектов гуморального ответа является актуальным и перспективным. Нет достаточно убедительных данных, которые могут послужить основой для принятия решения о вакцинации или ревакцинации.

Цель работы: Обоснование тактики обследования больных с COVID-19 посредством анализа клинико-лабораторных данных и ряда показателей гуморального ответа.

Задачи исследования:

1. Дать клинико-лабораторную характеристику COVID-19 у стационарных пациентов различной степени тяжести.
2. Проанализировать эффективность применения иммуноферментного анализа для определения антител класса IgA + IgM к спайковому белку коронавируса SARS-CoV-2 в динамике заболевания.
3. Оценить эффективность иммуноферментного анализа для определения IgG к нуклеокапсиду и RBD-домену S-протеина SARS-CoV-2 в динамике инфекционного процесса.
4. Дать сравнительную оценку нейтрализующей активности IgG к RBD-домену и индекса avidности у пациентов с COVID-19.
5. Разработать оптимальный алгоритм диагностики COVID-19 в динамике заболевания.

Научная новизна. На основании проведенного анализа клинико-лабораторных данных у пациентов с COVID-19 расширены представления о

предикторах тяжелого течения болезни. Установлено, что тяжелое течение было ассоциировано с возрастом (старше 60 лет) и наличием коморбидности: гипертонической болезни, сердечно-сосудистой патологии, сахарного диабета 2 типа. Показано, что поражение ЖКТ с развитием диспептического синдрома достоверно чаще встречается у пациентов с легким течением COVID-19.

Впервые дана оценка эффективности применения ИФА в диагностике COVID-19 с определением IgM+IgA к S-белку SARS-CoV-2; IgG и нейтрализующей активности к RBD-домену S-белка SARS-Cov-2; IgG к Nc-белку в динамике у пациентов с различной степенью тяжести. Установлено, что диагностическая эффективность метода ИФА для обнаружения IgM+IgA к S-белку SARS-CoV-2 составляет $92,3 \pm 2,0\%$ на 1-10 день болезни и $98,4 \pm 0,9\%$ на 11-21 день болезни. Диагностическая эффективность метода ИФА для определения антител IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 составляет $62,2 \pm 3,6\%$ на 1-10 день болезни и $96,9 \pm 1,6\%$ на 11-21 день болезни заболевания, превышая аналогичные показатели в отношении RBD-домена ($52,6 \pm 3,7\%$ и $95,1 \pm 2,0\%$ соответственно). Полученные данные и характеристика гуморального ответа у пациентов с COVID-19 могут быть использованы при разработке лабораторных стандартов диагностики у стационарных пациентов. Доказано, что определение индекса авидности может служить фактором прогнозирования течения заболевания у первично и повторно заболевших. Мониторирование уровня нейтрализующих антител к RBD-домену может служить критерием для обоснования индивидуального отбора пациентов для проведения вакцинации/ревакцинации против COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные новые данные позволят дополнить представления о течении заболевания и его прогнозирования, а также могут быть использованы для этиологического подтверждения диагноза

Проведенное комплексное исследование определило ряд значимых факторов, влияющих на тяжесть течения инфекционного процесса. Определено, что показатель авидности IgG к RBD коррелирует с тяжестью заболевания. Дана оценка эффективности использования иммунологических тестов на разных сроках заболевания, включая уровень нейтрализующих антител в динамике, что является рациональным в решении вопроса иммунизации. Результаты исследования внедрены в практическую работу ИКБ №1 ДЗ г. Москвы, а также используются в учебно-методических материалах при подготовке врачей инфекционистов, врачей общей практики, клинических ординаторов и аспирантов кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии РУДН.

Методология и методы исследования. Методологическая основа диссертационной работы была спланирована на основании поставленной цели исследования и включает применение методов научного познания с целью решения поставленных задач. Дизайн клинических исследований представляет собой сравнительный открытый рандомизированный характер с использованием клинических, лабораторных, аналитических и современных статистических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений. Наиболее часто встречающимися клиническими проявлениями COVID-19 у стационарных больных являются: симптомы интоксикации (100%), одышка (77%), сухой кашель (73%). Значительно реже встречаются anosmia (26%), dysgeusia (21%), экзантема (2%). Поражение ЖКТ (36%) с развитием диспепсического синдрома коррелирует с легким течением болезни.

2. Тяжелое течение COVID-19 достоверно чаще протекает у пациентов старше 60 лет с гипертонической болезнью (92,1%), сердечно-сосудистой патологией (60,2%), сахарным диабетом 2 типа (30,1%), в гематологической картине которых отмечалась выраженная лимфопения, тромбоцитопения.

3. Обоснована высокая диагностическая эффективность метода ИФА для обнаружения IgM+IgA к S-белку SARS-CoV-2 (92,3–98,4%) в динамике инфекционного процесса у стационарных пациентов с разной степенью тяжести COVID-19. Индекс антител IgM+IgA был достоверно высоким на 1-10 день болезни у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Высокая диагностическая эффективность метода ИФА с определением IgG (96,9%) к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 показана спустя 11 и более дней от начала заболевания.

4. Наличие защитных антител IgG к RBD с низкой авидностью (менее 40%) у переболевших COVID-19 относится к «факторам риска» возможного реинфицирования пациентов, а также служит критерием прогнозирования тяжести течения заболевания. Показано, что вероятность течения заболевания в тяжелой форме у реинфицированных пациентов COVID-19 с низкой авидностью антител класса G к RBD составляет $89 \pm 20,5\%$ ($p < 0,05$).

5. У переболевших лиц через 4-6 месяцев сохраняется высокая нейтрализующая активность антител IgG к RBD (Me 61,4%). Исследование уровня нейтрализующих антител в динамике позволит обосновать индивидуальный подбор пациентов для проведения вакцинации/ревакцинации против COVID-19.

Апробация работы. Тема диссертационного исследования «Модификация подходов к клинико-лабораторному обследованию пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)» обсуждена и утверждена на заседании Ученого совета медицинского факультета ФГАОУ ВО РУДН 21 января 2021 года, протокол №6.

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на совместных научно-практических семинарах, проводимых с проводимых с ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава Российской Федерации, на заседании кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии РУДН (2021-2022 гг.).

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на XIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, Россия, 24-26 мая 2021 г.), доклад «Клинико-лабораторный профиль амбулаторных и стационарных пациентов с COVID-19»; Международном Конгрессе «Здравоохранение в период пандемии: опыт и достижения в борьбе с COVID-19» (Узбекистан, Ташкент 1-4 июня, 2021), онлайн-доклад «COVID-19: клиническая структура, особенности гуморального ответа»; на Международной конференции «Современные проблемы инфектологии, эпидемиологии, микробиологии и медицинской паразитологии» (Андижан, Узбекистан, 22-23 сентября, 2021), доклад «Клинико-иммунологические аспекты диагностики новой коронавирусной инфекции: вопросы и ответы»; Международном VIII Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Санкт-Петербург, Россия, 17-19 мая 2022 г.), доклад «Гуморальный ответ у больных и реконвалесцентов COVID-19»; на XV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, Россия, 27-29 марта 2023 г.), доклад «Значимость определения авидности у пациентов с респираторными инфекциями»

Материалы диссертационного исследования были доложены и представлены к апробации на кафедре инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии РУДН. Работа рекомендована к защите (Протокол заседания кафедры инфекционных болезней с курсами

эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО РУДН от 21.12.2022 № 0300-14-04/5).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационное исследование соответствует формуле специальностей: 3.1.22. Инфекционные болезни и областям исследования п. 2 «Клинические проявления инфекционного процесса, повреждения и нарушения функции различных органов и систем, особенности течения во всех возрастных категориях, в различных условиях окружающей среды и в сочетании с другими болезнями. Прогнозирование течения инфекционного процесса и его исходов» п.3 «Диагностика инфекционных болезней с использованием клинических, микробиологических генетических, иммунологических, биохимических, инструментальных и других методов исследования и пр.» и паспорту специальности 1.5.11. Микробиология, п. 2, 3, 8.

Внедрение результатов исследования в практику. Исследовательская работа на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме: «Модификация подходов к клинико-лабораторному обследованию пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)» одобрена этической экспертизой Комитета по этике Медицинского института РУДН от 9 июня 2022 года.

Полученные научно обоснованные данные внедрены в практику работы отделений респираторных инфекций и реанимационного отделения ИКБ №1 ДЗ г. Москвы. Разработаны и донесены до научно-практического сообщества, врачебного и студенческого сообщества основные положения диссертационного исследования, которые используются при оценке тяжести течения COVID-19, оценке гуморального ответа у больных и реконвалесцентов COVID-19, используемого для этиологического подтверждения диагноза на разных этапах заболевания.

Личный вклад автора. На всех этапах выполнения диссертационной работы участие автора заключалось в проведении анализа отечественных и зарубежных источников литературы, подготовке дизайна исследования, формулировании цели и задач исследования, мониторинговании пациентов с COVID-19 в период пандемии в «красных зонах», сборе и транспортировке биологического материала на лабораторные базы. Автором лично разработаны протоколы исследования, создание баз данных и анализ google-таблиц, подготовка материалов к проведению статистического анализа. Соискатель принимал непосредственное участие в получении, обработке и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке публикации по выполненной работе.

Публикации по теме диссертации. Основные научные результаты по теме диссертации опубликованы в 7 научных работах, в том числе 3 статьи в журналах из перечня международной базы цитирования (Scopus-Q4), 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ или РUDN.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 189 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 3 глав собственных исследований, выводов и практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 166 источников (30 отечественных и 136 зарубежных). Работа иллюстрирована 34 таблицами, 31 рисунком, 3 клиническими примерами.

Глава 1. Обзор литературы

Глава 1.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19 и анализ факторов, ассоциированных с тяжелым течением болезни

Вновь возникающие инфекционные заболевания, преимущественно вирусной этиологии, преодолевшие межвидовой барьер, могут создать чрезвычайную проблему как для системы здравоохранения во всем мире, так и для каждого отдельного индивидуума. Одним из ярких примеров такой инфекции является новая коронавирусная зоонозная инфекция — тяжелый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом-2 (SARS-CoV-2), ставшим седьмым описанным коронавирусом в человеческой популяции. Обладая относительно низкой вирулентностью и высокой контагиозностью, вирус передается легко, особенно при большой скученности людей, — эта эпидемиологическая характеристика свойственна всем респираторным вирусам. Действие этих факторов способствовало быстрому распространению SARS-CoV-2 по всему миру, вызывая пандемию, значительно отличающуюся от предыдущих, описанных ранее в литературе.

Крайне важным для практического здравоохранения, особенно на первом этапе пандемии, было определение ведущих клинических проявлений и форм заболевания, знание которых позволило своевременно поставить клинический диагноз, определить факторы, ассоциированные с тяжелым течением COVID-19, структурировать подходы к госпитализации и терапии, что в свою очередь способствовало стабилизации системы здравоохранения и сохранению социально-психологической стабильности в обществе.

До настоящего времени медицинское сообщество владеет только частью информации о клинических формах заболевания, факторах тяжелого течения

болезни у пациентов с COVID-19, глубокое изучение которых потребует дополнительного анализа и времени. Накопленный сегодня опыт свидетельствует, что клинические проявления болезни варьируют от бессимптомных до клинически ярко выраженных [10, 11]. Показатели летальности при COVID-19, по данным ряда авторов, составляли от 4,3 до 15%, особенно на первых этапах пандемии [9, 12, 13].

По данным ВОЗ (2020 г.), ярко выраженные клинические проявления COVID-19 можно охарактеризовать как полиморфные. Клиническая картина болезни у стационарных пациентов характеризовалась повышением температуры тела (83–99%), кашлем (59–82%), общей слабостью (44–70%), потерей аппетита (40–84%), одышкой (31–40%), а также болью в мышцах (11–35%). На самых ранних этапах развития пандемии появились сообщения и о других неспецифических симптомах, таких как боль в горле, заложенность носа, головная боль, диарея, тошнота и рвота, экзантемы [9, 14-16]. Описание клинической картины COVID-19 дают ряд авторов: симптомы интоксикации – фебрильная температура – у 21 пациента (77,7%), субфебрильная – у 6 пациентов (22,3%), головная боль – у 9 пациентов (33,3%); умеренно выраженный катарально-респираторный синдром и боль в горле – у 7 пациентов (25,9%), непродуктивный кашель у 11 пациентов (40,7%) [17]. По результатам других наблюдений, более редко встречались потеря обоняния (аносмия) или вкуса (агевзия), экзантемы, предшествующие или сопутствующие респираторным симптомам [18–20].

Клиническая картина COVID-19 у пациентов в первые дни болезни практически не имела особенностей, отличающих ее от других ОРВИ, что, вне всякого сомнения, создавало огромные трудности в диагностике и дифференциальной диагностике. Описаны три основные клинические формы COVID-19 [21, 22]: ОРВИ легкого течения с поражением верхних

дыхательных путей; вирусная пневмония, не представляющая угрозы для жизни пациента, и тяжелая пневмония, сопровождающаяся развитием острой дыхательной недостаточности (острый респираторный дистресс-синдром).

Были зарегистрированы и другие осложнения в виде острой почечной недостаточности, сепсиса, септического шока (инфекционно-токсического шока), миокардитов, перикардита, нарушения ритма и проводимости [23]. Учитывая, что одним из ведущих патогенетических механизмов при коронавирусной инфекции является повреждение эндотелия сосудов с развитием тромбоваскулита, подтвержденного обнаружением морфологических изменений в структурах головного мозга [24], клинические проявления COVID-19 у части больных манифестировали развитием поражения ЦНС в виде энцефалопатии, энцефалитов, острыми и преходящими нарушениями мозгового кровообращения [25].

Уже на первых этапах развития пандемии были определены основные факторы, являющиеся отягощающими и приводящими к тяжелому течению болезни у высокого процента людей, нуждающихся в госпитализации. Одними из этих факторов являются возраст и коморбидность. Результаты многих проведенных исследований свидетельствуют о взаимосвязи ряда факторов с тяжестью течения COVID-19 и неблагоприятными исходами. К таким факторам относятся: возраст пациента старше 60 лет, гендерная принадлежность, наличие сопутствующей патологии (метаболический синдром, сердечно-сосудистые заболевания, хронические бронхолегочные заболевания) [26–28].

Ассоциация с коморбидностью в подавляющем большинстве случаев была отягощающим фактором. Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями у пациентов с тяжелым течением COVID-19 были артериальная гипертензия (АГ, 30%), сахарный диабет (СД, 19%) и

ишемическая болезнь сердца (ИБС, 8%) [29]. При этом у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии (ОРИТ), доля сопутствующих заболеваний была значительно выше (72,2%) по сравнению с теми, кому госпитализация в ОРИТ не требовалась (37,3%). Что еще раз свидетельствует о статистической взаимосвязи тяжести течения заболевания и коморбидности. Менгер и соавторы проанализировали результаты вскрытия 21 пациента с COVID-19, госпитализированных в университетскую клинику Базеля и кантональную клинику Базельланд (Швейцария), и определили приоритетные причины летальности: дыхательная недостаточность, обусловленная экссудативным диффузным альвеолярным повреждением и массивным капиллярным застоем, часто сопровождающимся микротромбозом. Большинство наблюдаемых страдали одним или несколькими сопутствующими заболеваниями. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 отмечен высокий процент встречаемости сердечно-сосудистых заболеваний. Морфологической основой этих поражений было системное воспаление, прямое повреждение миокарда, разрыв бляшки и коронарный тромбоз [30, 33].

По имеющимся глобальным данным, на период 2010 г. в популяции насчитывалось около 1,39 миллиарда (31,1%) взрослых лиц, страдающих гипертонией. Сравнительно более высокая распространенность АГ среди взрослых наблюдалась в странах с низким и средним уровнем дохода (31,5%, или 1,04 млрд человек), чем в странах с высоким уровнем дохода (28,5%, или 349 млн человек) [34]. Авторами показана роль артериальной гипертензии у возрастной когорты лиц старше 60 лет в развитии более высокого риска тяжелого течения заболевания при заражении SARS-CoV-2.

Как и при многих других респираторных вирусах, в том числе и при гриппе, в начале пандемии были определены группы риска среди населения, куда

входили больные с метаболическим синдромом. Показано, что лица с манифестным СД2 склонны к наиболее тяжелому течению COVID-19, а пациенты с предиабетом по тяжести заболевания занимают промежуточное положение между ними и больными без НУО. Ожирение также относят к весомым факторам риска тяжелого течения COVID-19 среди пациентов с начальными НУО (предиабетом), что отчасти опосредовано предшествующей дисфункцией печени на фоне метаболического синдрома. Есть свидетельства в пользу взаимосвязи нарастания провоспалительных факторов и гиперкоагуляции — и утяжелением COVID-19 у больных с и без НУО. Наибольшую выраженность и стойкость данные нарушения имели на фоне СД2 [35].

Тяжелое течение и высокая летальность отмечались у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в 10,1-19,0% случаев; с сердечно-сосудистыми заболеваниями — в 8,0-14,5% случаев [5] и онкологическими заболеваниями — в 17,2% случаев [9]. сахарным диабетом 2-го типа (17,0-37,3%), хроническими заболеваниями почек, осложненными почечной недостаточностью, а также среди пациентов, получавших гемодиализ, или у реципиентов донорской почки — 11,0% [35].

Пациенты, страдающие различной онкологической патологией, в большей степени подвержены развитию инфекционного заболевания в связи с наличием иммуносупрессии и нарушениями иммунитета из-за проводимой терапии. Ряд онкологических заболеваний могут быть ассоциированы с неблагоприятным прогнозом для пациентов с COVID-19 и являются фактором, повышающим вероятность развития тяжелого течения заболевания с летальным исходом, особенно в ситуациях недавно проведенного хирургического лечения и курсов химиотерапии, а также при наличии онкогематологической патологии, сопровождающейся выраженной

лимфопенией. Некоторые исследователи обосновывают необходимость отсроченной химиотерапии у пациентов со стабильным течением онкологического процесса [35–39].

Некоторые авторы дали количественную оценку сопутствующих заболеваний у пациентов с COVID-19, практически всегда сопутствовало тяжелому течению болезни, особенно у пациентов старшей возрастной категории «65 +», у которых хронические заболевания почек регистрировались с высокой частотой. Так, по данным одного из исследований, у 25,5% пациентов с COVID-19 имело место острое повреждение почек, требующее проведения процедуры гемодиализа, а также повышенный риск развития внебольничной и внутрибольничной пневмоний, которые приблизительно в 3 раза повышают риск смертельного исхода [39]. Верификация подобных случаев, кроме прочего, подтверждалась наличием повышенных значений креатинина и соответствующим снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). У пациентов с ХБП риск смертельного исхода в случае воспаления легочной ткани в 14-16 раз выше, чем в общей популяции, следовательно, хроническая болезнь почек может рассматриваться как важный фактор в системе стратификации рисков неблагоприятного прогноза у пациентов с COVID-19 [40–42]. Пациентам с сочетанной патологией — ХБП и COVID-19 — следует продолжать лечение основного заболевания и получать ГХХ в дни после сеанса гемодиализа [36].

Исследования когорты пациентов в возрасте старше 75 лет, имеющих сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, хронические заболевания почек, осложненные почечной недостаточностью, а также цереброваскулярную болезнь, показывает, что таких пациентов необходимо рассматривать, как группу риска тяжелого течения COVID-19. Пациенты группы тяжелого течения имели ряд сопутствующих заболеваний : СД2

встречался у 14 (19,7%) пациентов, БА – у 2 (2,8%) больных, ХОБЛ – у 3 (4,2%) пациентов, ГБ – у 44 (62,0%) пациентов, ХБП – у 13 (18,3%) человек, ЦВБ – у 11 (15,5%) больных, ожирение – в 17 (23,9%) случаях, заболевания печени – у 3 (4,2%) пациентов, ССЗ – у 48 человек (67,6%) [43].

Тяжелое течение COVID-19 наблюдали и у 78% больных латентной туберкулезной инфекцией, что втрое превышало долю больных с таким течением в группе без латентной туберкулезной инфекции. Авторы отметили более тяжелое течение COVID-19 и у лиц с латентной туберкулезной инфекцией, т. е. с положительным IGRA-тестом (interferon gamma release assay), и у больных туберкулезом [44].

Быстрым и доступным способом оценки степени тяжести заболевания на уровне звена практического здравоохранения явилось использование рутинных лабораторных тестов. Накопленный клинический опыт показал, что в ряде случаев указанные ниже параметры могли служить основанием для оценки тяжести течения инфекционного процесса. У тяжело болеющих пациентов картина периферической крови может характеризоваться лейкопенией, однако в большинстве случаев (82%) сопровождается лимфопенией и тромбоцитопенией (36%). Степень выраженности лимфопении имела решающее значение при оценке степени тяжести и риска прогрессирования заболевания. Более чем у половины тяжело больных пациентов встречалась тромбоцитопения. Низкие показатели тромбоцитов авторами расцениваются как плохой прогностический признак [45]. Тромбоцитопения могла иметь и другой генез, в том числе могла быть лекарственно индуцированной (полипрагмазия, широко применяемая при лечении COVID-19, приводила к нежелательным результатам), что не всегда учитывалось при клинико-лабораторной оценке.

Широко на практике для оценки и прогнозирования риска тяжелого течения комплексно учитывались сдвиги острофазных показателей (СРБ, ферритин, церулоплазмин, прокальцитонин), а также коагулопатических маркеров (D-димер, МНО, АЧТВ, тромбопластин, протромбин), сывороточных ферментов (ЛДГ, КФК, АЛТ, АСТ) и других маркеров, свидетельствующих о развитии синдрома полиорганной недостаточности [46].

Некоторые исследовательские работы выявили более низкие уровни С-реактивного белка у пациентов, которые не нуждались в оксигенотерапии, в сравнении с пациентами, у которых развивалась гипоксемия. Авторы связывают данные изменения с тяжестью течения болезни и высоким риском смерти: у выживших пациентов средний уровень С-реактивного белка составлял около 40 мг/л с интервалом 10-60 мг/л, тогда как у погибших среднее значение составляло 125 мг/л с интервалом от 60 до 160 мг/л [47].

Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови может развиваться при многих бактериальных, вирусных и прочих инфекционных заболеваниях, включая коронавирусную инфекцию (чаще к концу второй недели), и это напрямую связано с плохим прогнозом заболевания и развитием тромбозов [48]. Согласно рекомендациям «ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19» [49], предлагалась стратификация риска коагулопатии у пациентов с COVID-19 с использованием уровня D-димера (заметно повышен), протромбинового времени (удлинено), количества тромбоцитов ($100 \times 10^9/\text{л}$), содержания фибриногена ($< 2,0 \text{ г/л}$) с назначением профилактической дозы низкомолекулярного гепарина (НМГ) в условиях, когда показатель D-димера незначительно повышен, протромбиновое время не изменено, тромбоциты в норме, фибриноген повышен и нет показаний для назначения НМГ по другим клиническим причинам. Маркерами присоединения бактериальных

осложнений у пациентов с COVID-19 традиционно служил уровень прокальцитонина, при повышенных показателях которого можно было предположить развитие коинфекции [50].

Анализ литературы показал, что вариабельность клинических проявлений COVID-19, включающих не только симптомы поражения различных отделов респираторного тракта, обуславливает трудности диагностики и дифференциальной диагностики, особенно на догоспитальном этапе. Опыт, накопленный медицинским научно-практическим сообществом, позволит обобщить все данные об особенностях клинического течения, формах COVID-19, факторах риска тяжелого течения болезни и обоснованно применить его в практическом здравоохранении.

1.2. Характеристика гуморального ответа у пациентов с COVID-19

Появление новых инфекционных болезней дает серьезный импульс к всестороннему изучению клинико-эпидемиологических, патофизиологических, микробиологических, диагностических и профилактических аспектов этих инфекций. Не стала исключением и эпидемическая вспышка новой коронавирусной инфекции COVID-19, впервые зарегистрированная как тяжелая пневмония неизвестной этиологии в г. Ухань провинции Хубей (КНР) в декабре 2019 г., охватившая многие страны мира, в том числе и Россию. Всемирная организация здравоохранения 30 января 2020 г. сообщила о чрезвычайной ситуации международного характера в области общественного здравоохранения, 11 марта ВОЗ официально объявила о пандемическом характере вспышки [51]. Опыт 2-летнего наблюдения пациентов различных групп с COVID-19 позволил в определенной мере изучить особенности иммунологического ответа при новой коронавирусной инфекции, ассоциированной с SARS-CoV-2.

На основании секвенирования генома установлено, что этиологическим агентом COVID-19 является новый коронавирус SARS-CoV-2, относящийся к семейству *Coronaviridae* группы бета-коронавирусов, в которую входили также два патогенных для человека коронавируса – SARS-CoV и MERS-CoV [52].

Вирус SARS-COV-2 состоит из одноцепочечной РНК, которая кодирует как структурные, так и неструктурные протеины (NSP). К структурным протеинам относятся белок нуклеокапсида (Nc), оболочки (E), мембраны (M) и спайковый гликопротеин (S), участвующий в слиянии вириона с клеткой-хозяином. S-белок состоит, в свою очередь, из двух элементов, S1 и S2: S1 имеет рецептор-связывающий домен RBD, ответственный за прикрепление к рецептору ангиотензин-превращающего фермента ACE-2, а S2 обеспечивает изменения проницаемости и структурной целостности мембраны клетки-хозяина, позволяя вириону проникать внутрь клеток [53]. В отличие от SARS-CoV, в случае возбудителя COVID-19 S-белок более адаптивен для заражения посредством ACE-2 рецептора клеток-хозяина, с последующей более эффективной стратегией как репликации, так и уклонения от иммунного ответа хозяина путем протеолиза S1-компонента белка-шипа, вследствие чего гуморальный иммунный ответ формируется с опозданием [54]. Следующим важным структурным элементом коронавируса является нуклеокапсид, представляющий собой гибкую спираль, состоящую из РНК и молекул нуклеопротеина N, необходимого для проникновения вируса в клетку, связывания его с геномом вирусной РНК и размножения вируса [55]. Не менее важными являются неструктурные протеины (NSP), кодируемые после проникновения вируса в клетку и выхода РНК в цитоплазму. Эти белки направляют репликацию вируса в клетке, и именно на них формируется T-клеточный иммунный ответ [56].

Способность организма отвечать на внедрение возбудителя совокупностью специфических клеточных (фагоциты, Т-лимфоциты и др.) и гуморальных (В-лимфоциты) реакций приводит к элиминации возбудителя и нейтрализации его токсинов. Состояние, формируемое в течение инфекционного заболевания, называется приобретенным (адаптивным) иммунитетом. В обобщенном виде формирование иммунного ответа заключается в следующем. При вирусных инфекциях первым барьером элиминации вируса является кожа и слизистые, защитные свойства которых обусловлены секреторными IgA. IgA взаимодействуют с вирусом и препятствуют его адгезии с эпителиоцитами, блокируя их рецепторы (рис. 1). Интерферон-гамма (IFN- γ), как один из главных факторов противовирусного иммунитета, препятствует накоплению вируса в клетке-мишени путем ингибирования вирусной РНК.

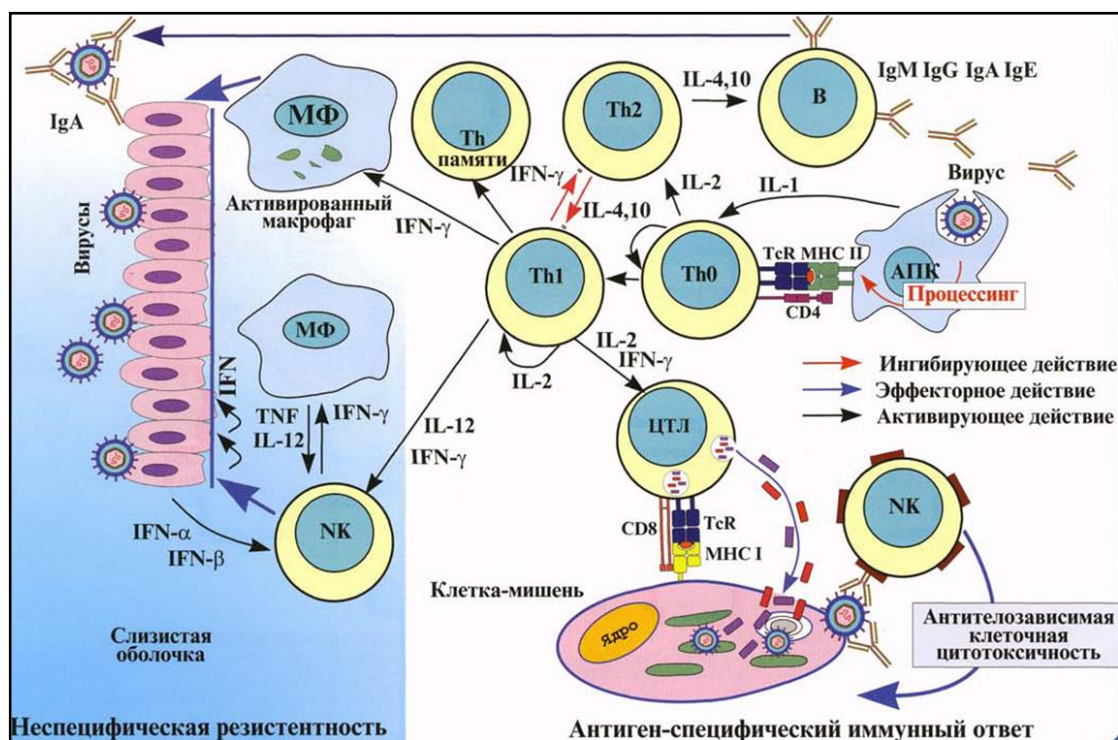


Рисунок 1. Схема противовирусного иммунитета [56]

Однако основной функцией IFN- γ является активация макрофагов. Возбудитель захватывается макрофагами, расщепляется и связывается на

поверхности клеток с комплексом гистосовместимости (HLA I и II классов). Далее следует распознавание антигена специфическими Т- и В-лимфоцитами, происходит их активация, дифференцировка и пролиферация Т-клеток, приводящая к образованию Т-хелперов (CD-4, Th2), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD-8) и Т-клеток памяти. После распознавания антигена Т-хелперы начинают продукцию цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), стимулируя переход В-лимфоцитов к образованию антителопродуцирующих плазматических клеток, которые синтезируют специфические антитела определенных классов иммуноглобулинов (Ig). Антитела могут нейтрализовать вирус после гибели клеток-мишеней или в процессе агглютинации с вирусом изменять поверхностные белки, блокируя проникновение вируса в клетку с последующим фагоцитозом и лизисом возбудителя. Описаны и другие формы активности антител в отношении вирионов [58].

При инфицировании SARS-CoV-2 наблюдается длительный лаг — период роста микроорганизма, в течение которого вирус не распознается, что приводит к позднему повышению и в дальнейшем длительному сохранению на достаточно высоком уровне IFN- γ [59]. Запоздалое формирование интерферонового ответа, по-видимому, позволяет вирусу длительное время оставаться незамеченным при внедрении в клетку и распространении в организме человека, «ускользая» от иммунной системы, что является определяющим в иммунопатогенезе COVID-19 [59]. Ранее, при изучении атипичной пневмонии, вызванной коронавирусом SARS-CoV, было показано, что у пациентов с тяжелым течением заболевания не наблюдалось перехода от гиперактивного врожденного иммунного ответа к адаптивному иммунному ответу [60]. На примере вирусных респираторных инфекций, установлено, что, если организм не вырабатывает достаточно сильный специфический иммунный ответ для элиминации вируса, он будет постоянно усиливать

неспецифический воспалительный ответ, что не только не удалит вирус, но и приведет к обширному повреждению ткани и утяжелит проявления инфекции. Ишемическая гипоксия и даже некроз со временем приведут к неконтролируемому воспалительному ответу и вызовут «цитокиновый шторм» [61].

Вариабельность течения COVID-19 в диапазоне от легкого до летального исхода определяется степенью активности различных звеньев иммунитета. Последовательный иммунный ответ можно определить следующим образом: размножение вируса благодаря уклонению от распознавания иммунной системой и подавлению продукции интерферона, «цитокиновый шторм», системная воспалительная реакция [59].

Фактором риска как тяжелого течения COVID-19, так и летального исхода является пожилой возраст, что объясняется снижением с возрастом продукции иммунных клеток (нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток) и повышением уровня провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ-6 по сравнению с лицами среднего возраста. Тяжесть заболевания была связана с низкими значениями ряда показателей: CD3⁺/CD8⁺ (соотношение Т-клеток по комплексу гистосовместимости I и II типов; МНС I, МНС II), CD4⁺, Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток как в периферической крови, так и в лимфоузлах. В ряде случаев отмечаются атрофические изменения основных лимфоидных органов (селезенка и лимфоузлы), а также герминативных центров [62]. При анализе экспрессии PD-1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели) Т-лимфоцитов у пациентов в ОРВИ уровень PD-1 был значительно выше по сравнению с группой пациентов с легким течением COVID-19 [63]. При этом пациенты с более легким течением болезни демонстрировали более выраженный иммунный ответ: к 7-му дню болезни было отмечено повышение уровней IgG и IgM с их дальнейшим ростом до 20 дня. У этих пациентов наблюдался также высокий уровень

активированных CD8⁺-, CD4⁺-Т-клеток, фолликулярных хелперных Т-клеток. Такие пациенты быстро выздоравливали [64].

Однако необходимо акцентировать внимание на том, что в этих условиях сохраняется активность провоспалительных цитокинов, включая IL-6. Рост показателя IL-6 связан, в том числе, с функциональным истощением Т-лимфоцитов вследствие усиления экспрессии PD-1 [65]. Из вышесказанного следует, что коронавирусы в ходе жизненного цикла способны индуцировать механизмы подавления презентации антигенов в комплексе МНС I и МНС II, как результат этого происходит ингибирование иммунных реакций, опосредованных Т-клетками. Все эти факты свидетельствуют о том, что SARS-CoV-2 может обладать ярко выраженными иммуносупрессивными свойствами, что необходимо учитывать для раннего прогнозирования тяжести течения заболевания и назначения адекватной противовирусной терапии в комплексе с иммуотропными препаратами.

Следовательно, можно предположить, что доминирующим при COVID-19 является клеточный иммунитет, аналогичный с другими вирусными инфекциями [66].

Наряду с клеточным иммунным ответом существенную роль в иммунопатогенезе COVID-19 играет и гуморальный иммунный ответ, проявляющийся синтезом специфических антител. Специфические антитела, продуцируемые В-лимфоцитами, могут нейтрализовать вирус и блокировать развитие инфекции [67], а также определить устойчивость организма к повторному заражению идентичным или родственным патогеном. Однако следует отметить, что кинетика гуморального ответа на индивидуальном уровне существенно отличалась и зависела от множества факторов, преобладающими из которых были возраст пациента, тяжесть течения заболевания, наличие других основных заболеваний, а также сроки, прошедшие после выздоровления. Динамика экспрессии иммуноглобулинов к

SARS-CoV-2 схожа с таковой для SARS-CoV [68]. У большинства пациентов формирование специфических антител наблюдается через 5-7 дней с момента начала заболевания [69] и продолжительность иммунного ответа сохраняется в течение не менее 2 лет, что было показано ранее для SARS-CoV [70].

Систематизированные сведения о результатах сравнительного исследования сроков формирования IgM, IgG антител и обнаружения РНК SARS-COV-2 в динамике инфекционного процесса COVID-19 представлены на рис. 2.

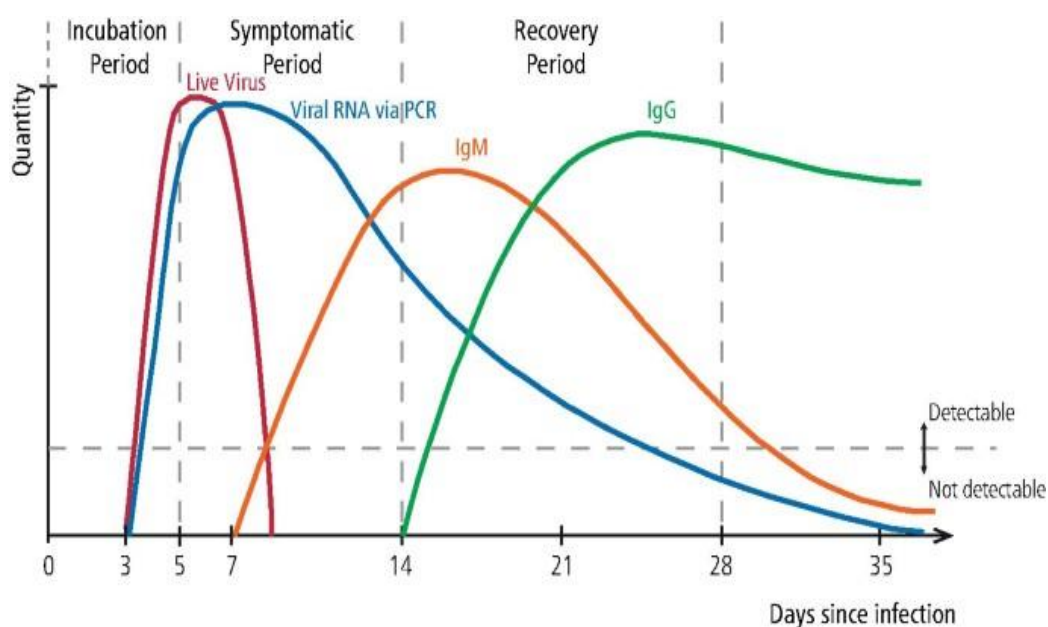


Рисунок 2. Сроки обнаружения IgM и IgG антител SARS-CoV-2 методом ИФА и выявления РНК коронавируса методом ПЦР [8]

После заражения вирусная нагрузка SARS-CoV-2 возрастает до максимального уровня примерно за два дня до появления симптомов заболевания и остается высокой в течение пяти дней, а затем через 7-8 дней уменьшается. Самым ранним антителом, которое появляется в крови, является иммуноглобулин IgM коронавируса SARS-Cov-2: обычно IgM

обнаруживаются на 5-7 день после появления симптомов в 85,4% случаев, достигают пика через неделю, но снижаются раньше, чем IgG, и могут сохраняться в течение 2 и более месяцев. При этом обнаружение специфических IgM у пациентов с уже подтвержденным диагнозом и с подозрением на SARS-CoV-2 происходило в 75,6% и 93,1% случаев соответственно [69]. Этими же авторами подтверждена более высокая эффективность ИФА для обнаружения IgM по сравнению с ПЦР после 5,5 дней появления симптомов заболевания (98,6%).

Продукция антител IgA к SARS-COV-2 происходит с 11 дня болезни в 92,7% случаев, достигает максимума через 3-4 недели и снижается к 1,5-2 месяцам после заражения [71].

Примерно с 14 дня и позже определяются специфические антитела класса G к SARS-CoV-2 в 77,9% случаев [69], которые достигают максимального уровня на 6-7 неделе после начала заболевания и затем медленно снижаются, однако остаются высокими на протяжении нескольких месяцев, выполняя защитную функцию [4, 9, 72]. Следовательно, сразу после заражения большинство людей имеют широкий спектр антител к SARS-CoV-2, что соответствует периоду от поликлонального ответа до В-клеточного отбора [8]. При этом обнаруживалось, что у большинства пациентов развивался устойчивый антительный ответ между 17 и 23 днями после начала заболевания. Спустя 4–8 месяцев после заражения остаются только антитела к RBD и S-белку класса IgG, а также антитела класса G к Nc в 99%, 96% и 90% образцов соответственно от исходного уровня антител [8]. По данным других исследователей [73] IgM и IgG к SARS-CoV-2 выявлялись практически одновременно уже на ранней стадии развития инфекции, превышая результативность ПЦР на 4 и 7 день заболевания, что теоретически предполагает наличие у данных пациентов вторичной реакции на инфицирование или, что более вероятно, зависит от используемого

диагностического теста, как это было описано ранее при атипичной пневмонии [74]. Оба класса иммуноглобулинов достигали максимального значения к 22-28 дню, через 3-4 месяца уровень IgM снижался, а уровень IgG оставался в это время на максимальном значении и на 7 месяце очень резко снижался.

Как правило, выявление IgM и IgA к спайковому (S) белку свидетельствует о недавнем инфицировании вирусом SARS-CoV-2, подтверждая наличие раннего иммунного ответа при COVID-19 после встречи с вирусом. Уровень антител IgG к нуклеокапсидному белку Nc и рецептор-связывающему домену RBD S-белка также свидетельствует о наличии или перенесённой ранее инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, что служит общепризнанным способом оценки постинфекционного иммунитета [75-77].

Установлена корреляция обнаружения уровней антител IgG к RBD и IgG к Nc [78]. Кроме того у лиц, имеющих IgG к RBD SARS-CoV-2, после перенесенного заболевания вероятность повторного заражения в закрытом коллективе (дом престарелых) в течение 6 месяцев составляла менее 1%, но защита от повторного заражения снижалась с возрастом и была связана с низким уровнем нейтрализующих антител после первичной инфекции [79]. Лица, имеющие высокие титры нейтрализующих антител Ig G к RBD, после перенесенного заболевания были защищены от повторного заражения SARS-CoV-2 [80,81].

Для выявления различных классов иммуноглобулинов M, A и G к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека в различные периоды болезни или после перенесенной инфекции применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА) [71, 73, 82].

Специфичность ИФА составляет 93,7-96,0% для IgM и 90,2-100% для IgG, чувствительность – 77,2-100% для IgM и 94,9-99,3% для IgG [73, 83].

Эффективность ИФА зависит от того, какой антиген применяется в диагностической тест-системе. Если это будут S-антиген или RBD, тест-система будет выявлять защитные антитела, нейтрализующие SARS-CoV-2, тогда как нейтрализующая способность антител к нуклеокапсиду (Nc) существенно ниже [84]. Это подтверждается данными по обнаружению иммуноглобулинов классов М и G к структурным белкам SARS-CoV-2 (табл. 1).

Таблица 1. Выявление IgM и IgG к структурным белкам SARS-CoV-2 методом ИФА [85]

Класс иммуноглобулинов	Структурные белки SARS-CoV-2 (антиген)	Число положительных результатов (%)
IgM	спайковый гликопротеин (S)	76%
	рецептор-связывающий домен (RBD)	55%
	нуклеокапсида (Nc)	15%
IgG	спайковый гликопротеин (S)	89%
	рецептор-связывающий домен (RBD)	97-100%
	нуклеокапсида (Nc)	менее 89%

Показана наибольшая эффективность ИФА при обнаружении IgM к спайковому гликопротеину S (76%) и в меньшей степени — к RBD (55%). При этом авторами установлено, что антитела IgM к RBD не определялись через 3

месяца, а в отношении S-белка достигли низкого уровня через 6 месяцев. Соответствующие специфические антитела IgG к RBD, S и Nc обнаруживались с достаточно высокой частотой и сохранялись практически на этом уровне в течение 6 месяцев [85].

Доказано, что в ответ на RBD организм генерирует нейтрализующие антитела, которые определяют резистентность хозяина к внедрившемуся вирусу [86]. Напротив, Nc, хотя и содержится в организме в значительно большем количестве, чем RBD, но вырабатываемые при этом антитела к нуклеокапсиду имеют более низкую нейтрализующую активность и свидетельствуют главным образом о факте инвазии вируса в восприимчивый организм. Также имеются данные, что у серопревалентных к Nc лиц чаще встречается бессимптомное течение или вирусоносительство [87]. Подобная особенность Nc обусловлена его ролью в репликации вируса, связывании его с геномом вирусной РНК и формировании рибонуклеопротеинового ядра, но не в фиксации вируса с рецепторами восприимчивой клетки [55].

В метаанализе [7], основанном на 57 публикациях, авторы обнаружили различия в чувствительности тестов к антителам групп IgA, IgM и IgG. Суммарные антитела показали низкую чувствительность тестов в течение первой недели с момента появления симптомов (менее 30,1%). Затем отмечалось повышение чувствительности серологической диагностики на второй неделе до 72,2%, с достижением максимальных значений на третьей неделе до 91,4 %. При подозрении на COVID-19 имело место незначительное количество ложноположительных результатов. Исходя из полученных данных, авторы спрогнозировали следующие показатели выявления заболевших в зависимости от степени распространенности COVID-19: при 50% распространенности в среднем 43 зараженных лица не будут диагностированы, а 7 случаев из 1000 исследованных окажутся

ложноположительными при тестировании на IgM через 15–21 день после появления симптомов. При 20% распространенности заболевания 17 зараженных будут иметь ложноотрицательные результаты, а 10 будут ложноположительными. При более низкой распространенности (5%) будет в среднем 4 ложноотрицательных случая и 12 ложноположительных тестов на 1000 исследований. Обобщая, авторы приходят к выводам, что в первую неделю с момента появления симптомов чувствительность тестов на антитела слишком низкая для окончательной верификации диагноза COVID-19. Можно рассчитывать на ретроспективный результат серологических тестов с выявлением соответствующего спектра антител преимущественно через 15 или более дней после появления симптомов.

По данным Топтыгиной А.П. и др. [88], только 57% переболевших COVID-19 имели высокий уровень гуморального ответа, а 43% – низкий, при этом уровень гуморального иммунитета был не одинаков у разных пациентов и зависел от степени тяжести заболевания, а также сроков, прошедших после выздоровления. Авторы установили, что через 9–12 месяцев у определенной группы переболевших сохраняются достаточно высокие уровни антител, хотя чаще специфические IgG антитела сохраняются от 3 до 5-6 месяцев.

Аналогичные результаты получены другими исследователями. Так, Li K. et al. [89] на основе результатов изучения клинических проявлений новой коронавирусной инфекции установили связь уровней антител от степени тяжести течения заболевания. Так, у пациентов с тяжелым течением заболевания уровень RBD-специфических антител IgG обнаруживался на первой неделе заболевания у 70,8% больных, возрастал на пятой неделе до 100% и отмечался в 1,5 раза выше, чем в группе пациентов с легким и среднетяжелым течением COVID-19. По другим данным показано, что спустя 2-4 месяца после выздоровления уровень IgG к RBD и их нейтрализующая

способность были примерно одинаковыми и не коррелировали с тяжестью заболевания [90].

Li K. с соавторами [89] продемонстрировали, что наработка специфических IgG антител к S-, N-белку и RBD происходит на одну неделю позже у пациентов со средним и тяжелым течением заболевания по сравнению с пациентами, имеющими легкое течение COVID-19. Кроме того, уровни специфических антител класса IgG к S-белку и RBD отмечались в 2 раза выше у выздоровевших пациентов с отрицательным ПЦР SARS-CoV-2, чем у ПЦР-положительных пациентов. Было также отмечено, что реконвалесценты с низким уровнем антител при выписке имеют большую вероятность положительного контрольного ПЦР на РНК SARS-CoV-2, что подтверждает прогностическую ценность ИФА. Для пациентов со средним или тяжелым течением заболевания чувствительность ИФА на специфические IgG антитела составила 58,8-76,5% на 5-9 день и 93,8-100% на 10-18 день [91].

Однако стоит отметить, что не у всех заболевших COVID-19 происходит формирование специфических IgG или IgA антител [71]. У пациентов с тяжелым течением заболевания наблюдался отсроченный, но более выраженный антительный ответ [71].

Согласно данным Wölfel R et al., 2020 [82] сероконверсия IgG-антител к SARS-CoV-2 имела место у 50% пациентов на 7 день болезни, а к 14 дню болезни у 100% заболевших, в то время как выделение вирусной РНК из ротоглотки и мокроты у некоторых пациентов сохранялось длительно, превышая сроки купирования симптомов (вплоть до 20 дня). На основании установления срока контагиозности вируса в течение 8 дней Denning. D с соавторами [8] предложили использовать обнаружение IgG-антител к SARS-CoV-2 как альтернативу ПЦР, для выявления заразности пациентов при проведении медицинских манипуляций.

Исследование профилей сывороточных IgM и IgG в группах 63 бессимптомных носителей показало наличие специфических антител у IgM и IgG против белков S1 и Nc в 55,5%. Анализ выработки нейтрализующих антител продемонстрировал их отсутствие у бессимптомных носителей в 38,1% случаев, а у лиц с легким течением заболевания — в 11,8% случаев. Нейтрализующие антитела у бессимптомных пациентов постепенно исчезали в течение 2 месяцев [92, 93]. Для пациентов со средним или тяжелым течением заболевания чувствительность ИФА на специфические IgG-антитела составила 58,8-76,5% на 5-9 день и 93,8%-100% на 10-18 день [91]. Также было показано, что В-клетки, вырабатывающие нейтрализующие антитела, специфичные для SARS-CoV, могут перекрестно нейтрализовать инфекцию SARS-CoV-2 [94].

Как было отмечено выше, наличие IgG к RBD домену свидетельствует об образовании защитных вирус-нейтрализующих антител [75, 95, 96, 97]. В основе реакции нейтрализации вируса лежит способность к блокированию взаимодействия вируса с рецептором ангиотензин-превращающего фермента ACE-2, расположенного, в частности, на эпителии легочных альвеол, и ингибированию внедрения вируса в клетку-хозяина [97-99]. Показан более высокий уровень IgG к RBD у тяжелых больных, чем у больных лёгкой или бессимптомной формой COVID-19 [71, 100]. Мерой выработки нейтрализующих антител в процессе реинфекции (или иммунизации) является индекс авидности (сила связывания антитела к антигену SARS-CoV-2, выраженная в процентной доле высокоаффинных антител), который коррелируется с ростом титра вирус-нейтрализации [96]. Повышение авидности антител происходит постепенно в течение 3 месяцев в процессе селекции и созревания В-лимфоцитов – продуцентов антител класса G, что приводит к формированию устойчивого гуморального иммунитета при повторном заражении (или после иммунизации). При этом показано, что

только иммуноглобулины IgG с высоким индексом авидности способны нейтрализовать вирус. Также вакцинация приводит к развитию стойкого первичного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти [75], которые уже могут продуцировать IgG с высокой авидностью и обеспечивают защиту организма при повторном контакте с вирусом. Показана прямая корреляция между индексом авидности и титром нейтрализующих антител [101].

Известно, что приобретенный иммунитет к SARS-CoV-2 не является пожизненным: его продолжительность составляет от 6 до 30 месяцев [75]. После перенесенной инфекции около 0,15-0,87% пациентов могут быть повторно инфицированы [102], что свидетельствует о недостаточно сформированном у данных пациентов «защитном» иммунитете. Также установлено, что у некоторых вакцинированных заболевших доля высокоаффинных IgG в сыворотке низкая и они подвержены риску реинфекции и/или тяжелого течения заболевания [103].

Таким образом, проведенный анализ литературы по оценке гуморального ответа к SARS-CoV-2 показал, что иммунный ответ при COVID-19 отличается вариабельностью. Большинство авторов выделяют следующие сроки выработки антител: IgM – 7-21 дни болезни, IgG – 14-35 дни болезни, при этом сроки элиминации антител составляют: IgM – 3-4 мес. и IgG до 6-7 мес. Кинетика гуморального ответа на индивидуальном уровне существенно отличалась и зависела от множества факторов, преобладающими из которых были возраст пациента, тяжесть течения заболевания, наличие других основных заболеваний, а также сроки, прошедшие после выздоровления. Отмечено, что у пациентов с тяжелым течением заболевания наблюдается отсроченный, но более выраженный антительный ответ. Вместе с тем персистенция нейтрализующих антител в большинстве случаев наблюдается до полугода. У пациентов, перенесших COVID-19, и вакцинированных лиц установлено увеличение индекса авидности с течением времени, прошедшего

от начала заболевания или срока вакцинации. Следует отметить, что оценка гуморального ответа с точки зрения диагностики в ряде случаев является дополнительным методом, особенно когда ПЦР-тестирование не дает ответа об инфицировании SARS-CoV-2.

1.3. Подходы к диагностике COVID-19 на современном этапе

Диагностика новой коронавирусной инфекции базируется на комплексе клинических, общих и специфических лабораторных методов исследования. Последние приобретают ведущее значение для подтверждения этиологии новой инфекционной болезни. В настоящее время разработаны и применяются молекулярно-генетические, направленные на обнаружение специфических фрагментов РНК коронавируса, и серологические методы исследования, направленные на выявление специфических антител.

Молекулярно-генетические методы исследования

Полимеразная цепная реакция. «Золотым стандартом» специфической диагностики новой коронавирусной инфекции является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), основанная на амплификации нуклеиновых кислот [104]. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, быстротой (в течение 5-6 часов) постановки реакции, минимизацией получения ложноположительных результатов. ОТ-ПЦР позволяет не только оперативно подтвердить клинический диагноз COVID-19, но и выявлять бессимптомных носителей вируса, имеющих эпидемиологическое значение в плане распространения инфекции.

Разработка данных диагностических тестов стала возможной после официального опубликования китайскими учеными геномной последовательности вируса SARS-Cov-2 в общедоступных базах данных в

начальном периоде развития эпидемии [105]. В качестве мишеней для ОТ-ПЦР используют различные специфические для SARS-CoV-2 участки генома вируса: нуклеокапсид (N), белок шипа (S), оболочки (E), трансмембранный протеин, хеликазу (Hel), фрагмент РНК-полимеразы (RdRp) и др. [113]. От выбора РНК-мишеней зависит аналитическая чувствительность реакции, которую можно повысить путем комбинации 2-3 специфических генов (табл. 2).

В настоящее время в мире выпускается более тысячи диагностических ПЦР тест-систем, только в России зарегистрировано уже более 300 тест-систем. Принятая для тест-систем аналитическая чувствительность метода ОТ-ПЦР составляет 10^3 – 10^5 копий на 1 мл, меньшей чувствительностью обладают праймеры зонда RdRp-SARSr, но дают меньше ложноположительных результатов. Однако сравнительное изучение различных тест-систем по генам-мишеням в исследуемом материале до настоящего времени не проводилось, и результаты подобного исследования в доступной литературе отсутствуют [107].

Чаще используемые в России диагностические наборы «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), согласно инструкциям по применению, имеют аналитическую чувствительность соответственно 1×10^5 и 1×10^3 копий /мл.

Таблица 2. Определение генов-мишеней у SARS-CoV-2 в тест-системах ПЦР, используемых в некоторых странах ведущими производителями [107, 108]

Страна и организация	Рекомендуемые гены-мишени
----------------------	---------------------------

Китай, China CDC	N (nucleocapsid phosphoprotein), ORF1ab
Германия, Charite	N, E (envelope protein), RdRP (ORF1ab)
Гонконг, Гонконгский университет (HKU)	N, ORF1b-nsp14
Япония, National Institute of Infectious Diseases	S (surface glycoprotein), ORF1a, ORF10
США US CDC, Atlanta	N (три варианта набора олигонуклеотидов для выявления последовательности гена N)
Франция, Париж, Институт Пастера	Two targets in RdRP
Таиланд, Национальный Институт Здоровья	N
Россия, ООО НПФ «Литех»	RdRp, E
Россия, ООО «ДНК-Технология ТС»	N, E (1), E (2)
Россия, ООО «Компания Алкор Био»	ORF1ab, ORF8, N
Россия, Компания «ИнтерЛабСервис»	upE геном MERS-Cov и ген Pol SARS-Cov
Россия, Институт «Вектор»	ORF1a

Материалом для исследования служат пробы из верхних (назофарингеальные и орофарингеальные мазки, слюна) и нижних (мокрота и бронхоальвеолярный лаваж) дыхательных путей пациентов [109]. У большинства пациентов положительная ОТ-ПЦР в мазках из носоглотки обнаруживается в последние три дня инкубационного периода, достигает пика на 5-6 день и снижается к третьей неделе.

Реакция считается положительной до 40-го порогового цикла (Ct) (количество циклов репликации вируса, необходимое для получения флуоресцентного сигнала и отрыва его от фонового уровня) (рис.3).

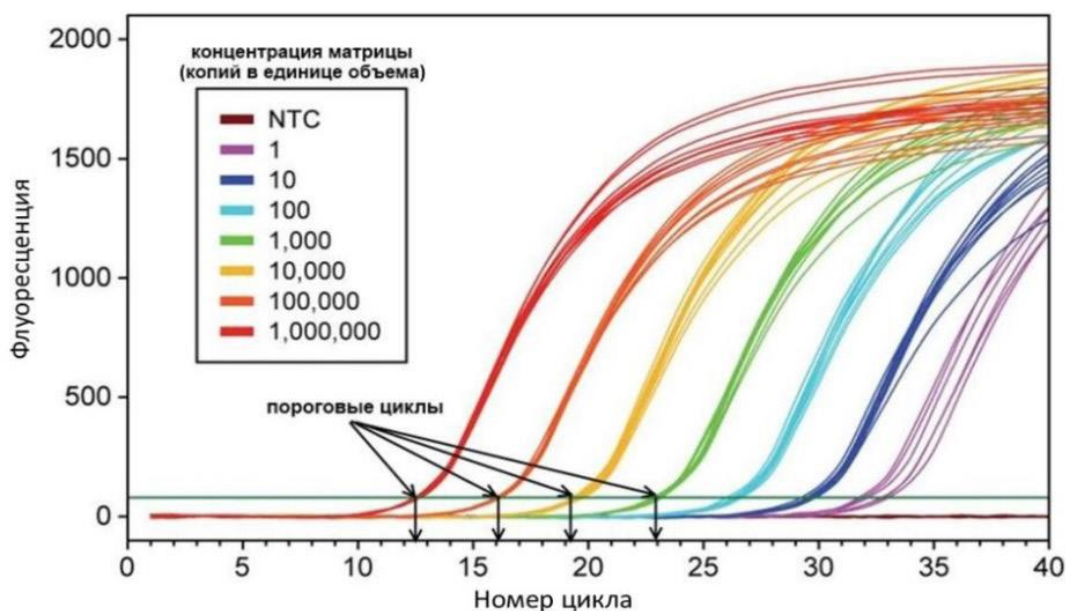


Рисунок 3. График накопления флуоресцентного сигнала ОТ-ПЦР в реальном времени.

Значение Ct обратно пропорционально количеству искомой ДНК в реакции (вирусная нагрузка), т.е. чем больше количество ДНК в пробе, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл, а чем меньше количество искомой ДНК, тем большее количество циклов необходимо для достижения порогового цикла.

Установлено, что высокая вирусная нагрузка чаще определяется у больных с тяжелым течением заболевания, чем с легким. У тяжелобольных пациентов положительный результат может наблюдаться и после 3-х недель с начала заболевания, в отличие от легкой степени течения инфекции. Однако обнаружение РНК SARS-Cov-2 не доказывает наличие жизнеспособного вируса. Поэтому рекомендуемые сроки забора материала — из верхних

дыхательных путей первые 5 дней от начала появления симптомов и до 14 дня в случае исследования мокроты и бронхоальвеолярного лаважа у госпитализированных пациентов [106]. Частота обнаружения РНК SARS-COV-2 при исследовании слюны равна 95% [110], бронхоальвеолярного лаважа – 92%, мокроты – 72%, мазков из носоглотки – 63%, мазков из ротоглотки – 32% , фекалий – 29%, крови – 1%, в моче не обнаружена [111]. Отмечено, что детекция вируса в фекалиях не является признаком острого периода инфицирования. Генетический материал вируса может сохраняться в фекалиях до 10 и более дней после выздоровления [112-114].

Диагностическая чувствительность ПЦР, по данным разных авторов, составляет менее 30-50% (на 14-21 день заболевания), 70-71% (9-11 день), до 80% (на 6 день) и более 90% (на 1-3 день). У некоторых больных вирусная РНК может обнаруживаться всего несколько дней, у других пациентов – на протяжении нескольких недель. Пациенты с тяжелым течением заболевания остаются ПЦР-положительными дольше, чем пациенты с легким течением COVID-19 [112].

На результативность теста ПЦР оказывает влияние доза инфицирования, несоблюдение сроков обследования, погрешности в правилах забора, транспортировки, хранения биоматериала и нарушение пробоподготовки образцов [115, 116]. Ограничением применения ОТ-ПЦР является его трудоемкость, необходимость специального дорогостоящего лабораторного оборудования для амплификации, дорогостоящих наборов реагентов и обученного персонала [6].

Не исключается вероятность получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, обусловленных мутациями в геноме возбудителя, качеством диагностических тест-систем и отсутствием в их составе внутреннего контроля, низкой вирусной нагрузкой, наличием ингибиторов ПЦР в биоматериале, а также риском кросс-контаминации между

образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК [107, 117].

Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP). Необходимость разработки безинструментальных технологий обнаружения нуклеиновых кислот привела к развитию методов изотермической амплификации. Метод LAMP, разработанный для диагностики и мониторинга MERSCoV [118], SARS-CoV [119] и SARS CoV-2 [120], позволяет проводить амплификацию в одной пробирке в условиях постоянной температуры (обычно 60°C), без переноса жидкости. В качестве амплифицирующего фрагмента используется ген ORF1ab. LAMP относится к числу перспективных методов ускоренной диагностики COVID-19 «у постели больного» и характеризуется в 100 раз большей аналитической чувствительностью, чем ОТ-ПЦР [121]. Метод характеризуется быстротой постановки (от 15 до 40 минут) и не требует дорогостоящих реагентов и высокотехнологичного оборудования. По данным разных авторов, диагностическая чувствительность LAMP при COVID-19 составляет 88,9-97,6% [122, 123].

Технология CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Является перспективным направлением лабораторной диагностики COVID-19, поскольку не требует специального лабораторного оборудования. CRISPR-система состоит из прямых повторяющихся последовательностей геномных участков вируса, которые разделены уникальными спейсерами. Тесты основаны на способности системы CRISPR узнавать специфические геномные участки РНК и вырезать их с помощью нуклеаз – Cas-белков, образуя систему CRISPR-Cas. Система, обладая ферментативными свойствами, расщепляет РНК-мишень вируса, с помощью процесса изотермической амплификации синтезируются специфические фрагменты нуклеиновых кислот, выявляемые флуоресцентным свечением [124].

В настоящее время для обнаружения РНК SARS-CoV-2 разработана платформа SHERLOCK с использованием рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и флуоресцентного репортера комплекса CRISPR-Cas13 [125] и платформа AIOD-CRISPR с применением пары комплексов Cas12a-crРНК [126]. Тесты обнаруживают ген N SARS-CoV-2, обладают высокой аналитической чувствительностью (4,6 копий РНК вируса/мл) и специфичностью, позволяют проводить количественное определение РНК в течение 40 минут [124]. Также описан метод обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 с использованием Cas12 нуклеазы и тонкослойной хроматографии, получивший название SARS-CoV-2 DETECTOR test. Тест обладает сравнимой с ПЦР чувствительностью (10 копий/мл), обнаруживает ген E и ген N коронавируса, но имеет преимущество по времени (не более 40 минут) и доступности используемого оборудования [127].

Иммунохроматографический анализ на определения антигенов (ИХА). Данный тест основан на мембранной технологии по принципу сэндвич-варианта иммуноанализа. Нитроцеллюлозная мембрана сенсibilизирована моноклональными антителами (МКА), направленными против антигена нуклеокапсида SARS-CoV-2. Если проба содержит SARS-Cov-2, то при внесении образца в лунку пластиковой тест-кассеты происходит взаимодействие комплекса конъюгат-SARS CoV-2 с МКА, что проявляется через 10 минут окрашенной тестовой (Т) и контрольной (С) линиями (рис. 4).

Преимуществом ИХА-теста является 97% специфичность и быстрота постановки (10 минут), однако чувствительность ИХА при анализе мазков из носоглотки составила 33,3% (3 из 9 положительных в ОТ-ПЦР) [128], при исследовании слюны антиген был обнаружен в 47,8% (4 из 7 положительных в ОТ-ПЦР образцах) [129]. Результативность теста зависит от вирусной нагрузки и периода течения заболевания — так, вероятность получения

ложноотрицательного результата возрастает спустя 5-7 дней от начала появления симптомов и снижения вирусной нагрузки [107].

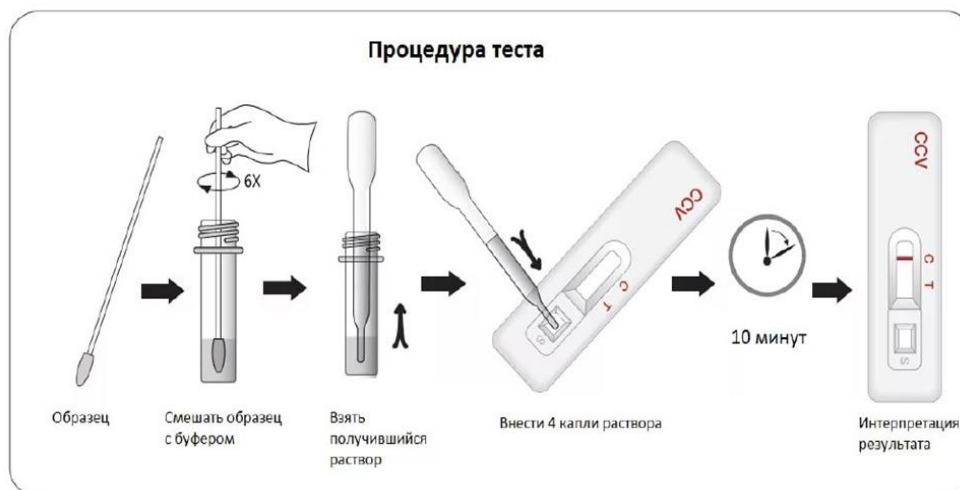


Рисунок 4. Схема проведения иммунохроматографического анализа на определение антигена SARS-Cov-2 [130]

Серологические методы для выявления антител SARS-CoV-2

Серологические методы исследования были разработаны с использованием в качестве мишени высокоантигенных структурных белков шипа (S), субъединицы S1, нуклеокапсида (N), домен-связывающего рецептора RBD SARS-CoV-2 для выявления иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови, плазме или цельной крови. Серологические исследования могут быть качественными и количественными, показывая различную диагностическую чувствительность и специфичность.

У большинства людей антитела IgM и IgG вырабатываются в течение нескольких дней или недель после появления симптомов заболевания, что ограничивает применение серологических методов для ранней диагностики коронавирусной инфекции [5, 82, 131]. Антитела IgA играют важную роль в мукозальном иммунитете (иммунитет слизистых оболочек), который обеспечивает местную защиту от вируса, и появляются раньше, чем IgG, что

позволяет использовать тест на IgA для ранней диагностики заболевания, а у пациентов с повторной отрицательной ОТ-ПЦР вместе с IgG служить критерием подтверждения COVID-19 [132]. Также установлено, что уровень IgA был выше, чем IgM, в течение 20 дней (срок наблюдения), IgG по данным авторов обнаруживались чаще с 10 дня появления симптомов заболевания [133].

Проведение серологических исследований важно для выявления COVID-19 у лиц с отрицательным ПЦР, но положительной компьютерной томографией; у лиц с предварительным клинико-эпидемиологическим диагнозом COVID-19 при отрицательном ПЦР или его отсутствии; для выявления бессимптомных носителей; при определении выработки нейтрализующих антител у реконвалесцентов, больных с реинфекцией и вакцинированных; для отбора доноров сыворотки и оценки популяционного иммунитета.

К недостаткам серологических методов можно отнести невысокую чувствительность — до 60% в острый период развития болезни (0-8 день), необходимость обнаружения антител против 2 антигенов SARS-CoV-2 для исключения ложноотрицательных результатов, возможность ложноположительных результатов у пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани или нарушениями пуринового обмена [134].

Иммуноферментный анализ (ИФА). Метод основан на образовании комплекса антиген-антитело, выявляемого с помощью второго антитела, конъюгированного с ферментной меткой. При последующем добавлении субстратной смеси развивается ферментативная реакция, интенсивность окрашивания которой оценивается с помощью спектрофотометра, хотя возможна и визуальная (качественная) оценка реакции. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию в образце антител к SARS-CoV-2. Преимущества метода: высокая чувствительность, возможность

полуколичественного учета результатов, быстрота постановки реакции, возможность определения сроков инфицирования человека.

Материалом для ИФА является сыворотка крови или плазма больного, в которых определяют наличие у пациента антитела IgA, IgM или IgG к SARS-CoV-2. Для уточнения диагноза рекомендуется исследование парных сывороток крови с интервалом 2-4 недели, нарастание титра антител свидетельствует о развитии инфекционного процесса [134]. Результаты исследования на основе ИФА, посвященные изучению гуморального иммунитета, подробно освещены в разделе 1.2. Обобщающее заключение по диагностической ценности ИФА можно свести к следующему: 1) IgA и IgM обнаруживаются через 3-6 дней после появления симптомов заболевания в 93,0% и 85,5% случаев соответственно, IgG обнаруживаются в течение 10-18 дней в 78% случаев [69]; 2) эффективность обнаружения IgM превышает ОТ-ПЦР спустя 5 дней после появления симптомов [135]; 3) удельный вес подтверждения диагноза COVID-19 увеличивался до 98,5% при применении метода ИФА на IgM и ОТ-ПЦР [69]; 4) при комбинированном применении ИФА на IgM и IgG диагностическая чувствительность ИФА возрастала до 87,3% [135].

Иммунохемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA/ИХЛА). Аналог ИФА, где в качестве субстрата к комплексу антиген-антитело присоединяются люминофоры – вещества, светящиеся в ультрафиолете, а количественный уровень содержания специфических антител определяется на специальных приборах-анализаторах – люминометрах. Метод обладает высокой пропускной способностью. При исследовании 176 сывороток крови от 125 пациентов с подтвержденным COVID-19 диагностическая специфичность ИХЛА оценена как 100% (ДИ 96,3-100%), а диагностическая чувствительность в сроки 15-25 дней после появления симптомов заболевания составила 95,5% (ДИ 84,9-99,2%) [136].

Магнитно-хемилюминесцентный иммуноферментный анализ (ECLIA) представляет собой сэндвич-иммуноанализ с двойным антителом, в котором нуклеокапсид и пептид шиповидного белка SARS-CoV-2 используются в качестве рекомбинантных антигенов для обнаружения IgM и IgG против SARS-CoV-2. С помощью этого анализа IgM и IgG выявлялись с первых дней после появления симптомов, а к 17-19 дню от начала симптомов в 100% случаев были положительными по IgG и к 20-22 дню – 94,1% случаев по IgM. Средний срок сероконверсии как для IgM, так и для IgG составил 13 дней после появления симптомов. Наблюдались три типа сероконверсии: синхронная сероконверсия IgM и IgG; сероконверсия IgM раньше, чем IgG, и сероконверсия IgG раньше, чем IgM [5].

Иммунохроматографический анализ определения антител (ИХА). Быстрый качественный метод определения сывороточных антител (IgG, IgM или суммарно IgG+IgM) в цельной крови, плазме, сыворотке крови или слюне «у постели пациента» (point-of-care – POC). Принцип метода: при внесении исследуемой крови в специальную лунку тест-кассеты она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с жидкостью движется конъюгат, содержащий антитела с красителем. Если в крови присутствует исследуемый антиген, то происходит его связывание с антителом, что проявляется в виде окрашивания тест полоски. Свободные антитела с красителем мигрируют далее вдоль полоски и взаимодействуют со вторичными антителами в контрольной зоне, где и наблюдается вторая окрашенная (контрольная) полоса (рис. 5).



Рисунок 5. Схема проведения ИХА-теста на определение антител к SARS-CoV-2 [130]

Преимущества метода: портативность тест-кассеты, ранние сроки обследования (с 3-го дня появления симптомов заболевания), быстрота (результат в течение 10-30 минут), отсутствие потребности в лабораторном оборудовании.

Показано, что для IgM диагностическая чувствительность составила 57%, диагностическая достоверность 69% и диагностическая специфичность 100%, для IgG — соответственно 81%, 86% и 100% [137]. Диагностическая чувствительность, равная 82%, наблюдалась в тестах, выявляющих суммарные IgG и IgM. Метод обладает меньшей чувствительностью, чем ПЦР, и используется как дополнительное средство диагностики.

Определение вирус-нейтрализующих антител. В сыворотке крови вакцинированных или переболевших обнаруживаются антитела, способные нейтрализовать вирус. Вирус-нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 направлены к рецептор-связывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса и при взаимодействии с ним блокируют способность вируса связываться с рецептором ACE-2 на поверхности коронавируса [98, 99]. Нейтрализующая способность антител выявляется в культуре клеток *in vitro* на основании отсутствия цитопатического действия

вируса или ингибирования бляшкообразования. Метод трудоемок, занимает до 5 дней и применяется на этапе идентификации вируса при его изоляции. Исследования с живым вирулентным вирусом проводятся в лабораториях, отвечающих требованиям биологической безопасности при работе с возбудителями I-II групп патогенности [138].

Альтернативой традиционным культуральным методам «нейтрализации антител» применяются тест-системы, основанные на ИФА с рекомбинантными пептидами RBD и ACE-2 рецептором. Величина титров связывания IgG, специфичных для RBD, сильно коррелировала с нейтрализацией вируса [139]. Предполагается, что защитные антитела сохраняются в сыворотке до 300 дней и их уровень может зависеть от возраста, пола, степени тяжести перенесенного заболевания и других факторов [140, 141]. У вакцинированных лиц, не болевших COVID-19, вирус-нейтрализующие антитела формировались в 83,3% случаев через 14 дней после первой дозы и в 100% случаев через 28 дней после второй дозы введенной вакцины, при этом вакцинированные переболевшие лица имели более высокие титры нейтрализующих антител к COVID-19 [140].

Таким образом, на современном этапе рекомендуемый алгоритм лабораторной специфической диагностики COVID-19 включает выявление РНК SARS-CoV-2 и серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA. Интерпретация результатов исследований методами амплификации нуклеиновых кислот и определения антител к SARS-CoV-2 должна проводиться с учетом клинических и эпидемиологических данных.

В главе представлен обзор накопленных данных по гуморальному иммунному ответу в отношении вируса SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19. Дана характеристика антительного ответа, нейтрализующей способности

IgG к RBD, авидности. Показано, что основной мишенью для выработки нейтрализующих антител является RBD-домен. В настоящее время «золотым стандартом» лабораторной диагностики COVID-19 является ОТ-ПЦР. Продолжаются исследования с целью разработки новых технологий молекулярно-биологических экспресс-тестов, основанных на изотермической амплификации, хемилюминесценции, CRISPR/Cas технологии и др. Серологическая диагностика COVID-19 имеет важное значение для оценки иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию.

Дальнейшее изучение и анализ динамики формирования антител классов IgM, IgG и IgA к S-белку и IgG к Nc и RBD у пациентов с COVID-19 в различные периоды заболевания в зависимости от тяжести течения инфекции позволит разработать и рекомендовать более совершенные методы диагностики для включения в тактику обследования стационарных больных с COVID-19.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Пациенты, находившиеся под наблюдением

На первом этапе был проведён ретроспективный анализ историй болезни 190 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ №4 ДЗМ г. Москвы в период с мая по июнь 2020 года с диагнозом U07.1/ U07.2 «Коронавирусная инфекция, вызванная COVID-19».

Под нашим динамическим наблюдением находилось 206 пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в период с 15.04.2020 по 2.03.2021 г. с диагнозом «Коронавирусная инфекция, COVID-19, вирус идентифицирован» (U07.1 по МКБ). Наблюдения проводились в первую и вторую волны пандемии, в этот период мониторинг пациентов стационаров города Москвы показал, что наиболее распространенными вариантами вируса SARS-CoV-2 были штаммы Wuhan-Hu-1 и Дельта (B.1.617.2, G/452R.V3, 21A).

Критерии включения: стационарные пациенты с COVID-19, госпитализированные на 1-10 дни болезни, детекция РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в биоматериале.

Критерии исключения: стационарные пациенты с COVID-19, госпитализированные после 10 дня болезни, отсутствие РНК SARS-CoV-2 в биоматериале, возраст моложе 18 лет, беременность, системные заболевания.

Все стационарные пациенты были разделены на три группы тяжести: легкую, среднетяжелую и тяжелую (критические пациенты не вошли в работу), согласно критериям ВОЗ 2021 года (табл. 3).

Таблица 3. Критерии тяжести течения коронавирусной инфекции по ВОЗ (2021)

Степень тяжести	Критерии
Легкое течение	Наличие клинических проявлений, соответствующих определению случая COVID-19, без признаков вирусной пневмонии или гипоксии
Среднетяжёлое течение	Наличие пневмонии, лихорадка, кашель, затрудненное и учащенное дыхание, SpO ₂ ≥ 90% на атмосферном воздухе (оценивать индивидуально, учитывая коморбидный фон и пороговую норму)
Тяжёлое	Наличие критериев средней тяжести + хотя бы один из следующих признаков: ЧДД ≥ 30 вдохов/мин; тяжелый респираторный дистресс синдром; SpO ₂ < 90% при дыхании атмосферным воздухом
Критическое	<ul style="list-style-type: none"> • ОРДС • Сепсис • Септический шок • Острый тромбоз

Нами осуществлялся ретроспективный мониторинг 23 реконвалесцентов новой коронавирусной инфекции (COVID-19), находившихся под наблюдением от 4 до 6 месяцев и более после перенесенного заболевания и выписанных из стационара.

У каждого пациента было получено информированное согласие на участие в исследовании. Пример представлен в таблице 4.

Таблица 4. Информированное согласие пациентов

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ	
На участие в научном исследовании «Модификация подходов к клинико-лабораторному обследованию пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)»	
и на обработку персональных данных	
Я, Иванов Иван Иванович,	
(фамилия, имя, отчество)	
«16» июля 1965 года рождения, (далее – Участник) настоящим	
<p>1. Даю добровольное согласие на участие в научном исследовании «Модификация подходов к клинико-лабораторному обследованию пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)» (далее – Исследование), подтверждаю ознакомление с Информационным листком добровольца – Участника Исследования.</p> <p>2. Я уведомлен о том, что в рамках Исследования у Участника будет произведено взятие биоматериала:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ мазок из ротоглотки ➤ забор крови из вены <p>3. Я уведомлен о том, что отбор материала из носоглотки/ротоглотки абсолютно безопасен для пациента, однако в ходе процедуры я могу испытать дискомфорт</p> <p>4. Я проинформирован что данная процедура выполняется одноразовым инструментом и не может привести к инфицированию.</p> <p>6. Я проинформирован о том, что результаты моего участия в данном Исследовании носят научно-исследовательский характер</p> <p>7. Я проинформирован, что участие в данном исследовании принесет мне пользу, т.к. мне будет выполнен ряд дополнительных исследований, что позволит провести более комплексную оценку моего состояния.</p> <p>8. Я проинформирован, что участие в исследовании добровольное и что я имею право изменить свое решение на любом этапе исследования и прекратить участие в нем без объяснения причин.</p> <p>9. Я понимаю, что в ходе реализации исследования будет собрана информация, которая будет рассматриваться как конфиденциальная. Никому и никогда не будут сообщаться мои персональные ФИО, за исключением случаев, предусмотренных в настоящем согласии, и случаев обязательного предоставления указанной информации в соответствии с требованиями законодательства.</p> <p>11. Я имел(а) возможность задавать все интересующие меня вопросы и получил(а) исчерпывающие ответы на них. Настоящий документ является неотъемлемой частью моей медицинской карты.</p> <p>12. Я удостоверяю, что текст моего информированного согласия на медицинское вмешательство мною прочитан, мне понятен, полученные разъяснения мне понятны и меня удовлетворяют.</p> <p>13. Настоящее согласие действительно в течение не менее, чем пяти лет после завершения участия Участника в Исследовании.</p>	
Подпись добровольца _____	ФИО / _____ /
Подпись врача-исследователя _____	ФИО / _____ /
Дата _____	Число _____ месяц _____ 20__ год
(пишется добровольцем)	
Время _____	

Таблица 5. Диагностический материал

Материал для исследования	1 забор	2 забор
Мазок из носоглотки/ротоглотки	1-10 день болезни	11-21 день болезни
Венозная кровь	1-10 день болезни	11-21 день болезни

Материалом для исследования служили назофарингиальные мазки и венозная кровь пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения города Москвы.

Дизайн исследования представлен на рисунке 6.

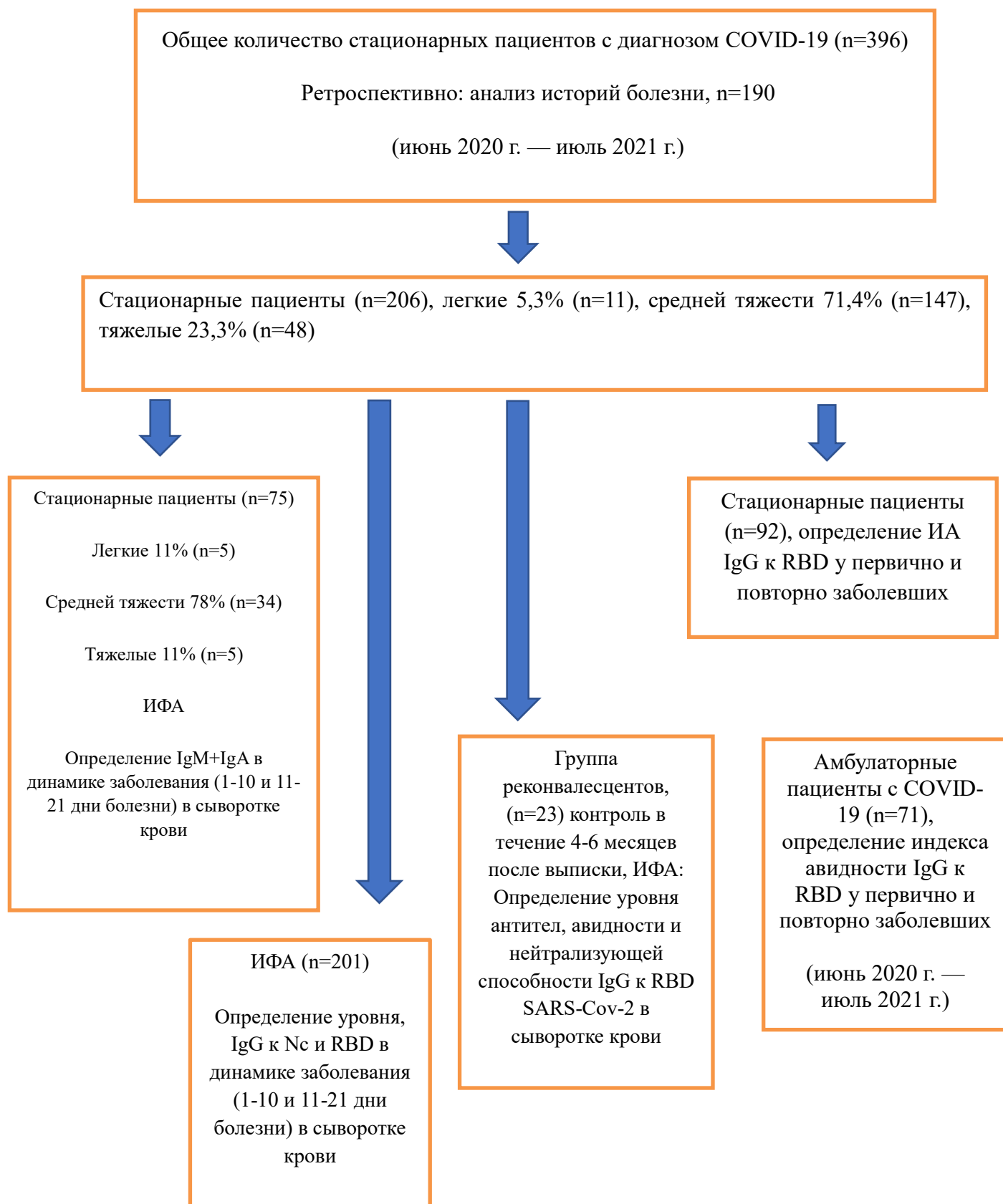


Рисунок 6. Дизайн исследования

2.2. Общеклинические, лабораторные и инструментальные методы исследования.

Всем пациентам проводилось: сбор анамнеза morbi, эпидемиологического анамнеза, клинический осмотр. Также исследование клинического анализа периферической крови, биохимический анализ крови, коагулограмма. Исследования проводились на базе клинико-диагностического отделения ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ», в ГБУЗ №4 ДЗМ по принятым стандартам и зарегистрированным методикам.

Клиническое исследование крови проводилось на аппарате Pentra XL 80, где определяли уровни эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, тромбоцитов. Биохимическое исследование крови проводилось на аппарате Beckman Coulter AU680 и включало: аспартатаминотрансферазу (АЛАТ), аланинаминотрансферазу (АСАТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), билирубин общий, билирубин прямой, креатининкиназу, глюкозу, мочевины, креатинин, общий белок, лактатдегидрогеназу (ЛДГ), С-реактивный белок (СРБ), ферритин. Показатели свертываемости крови: Д-димер определяли на аппарате ACL elite pro. При наличии показаний определяли уровень прокальцитонина.

Оценку гематологических показателей проводили с учётом референсных значений, предписанных в инструкции к аппаратам: Pentra XL 80, Beckman Coulter AU680, ACL elite pro и по общепринятым стандартам.

Всем пациентам, согласно стандартам Временных методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) версия 6 от 24.04.2020/ Временных методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) версия 7 от 03.06.2020 оказания медицинской помощи больным с COVID-19, проводили спиральную

компьютерную томографию органов грудной клетки (КТ ОГК), рентгенографию легких, КТ ОГК, УЗИ и анализ ЭКГ.

Методы и объем исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6. Методы и объем исследований.

Методы	Объем исследований
1. Общеклинические и биохимические методы:	
1.1. Клинический анализ крови	792
1.2. Биохимический анализ крови	790
1.3. Коагулограмма: Д-димер	388
1.4. Ферритин, ИЛ-6	433
1.5. КТ ОГК	535
2. Молекулярно-генетический метод:	
2.1. Выявление РНК вируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках методом ОТ-ПЦР.	609
3. Серологический метод:	
3.1. Определение антител IgM+A к SARS-CoV-2 в крови методом ИФА.	162
3.2. Определение антител IgG к RBD SARS-CoV-2 в крови методом ИФА.	424
3.3. Определеие антител IgG к Nc SARS-CoV-2 в крови методом ИФА.	424
3.4. Определение индекса avidности антител IgG к RBD SARS-CoV-2 в крови методом ИФА.	207
3.5. Определение нейтрализующих антител IgG к	41

RBD SARS-CoV-2, в крови методом ИФА.	
---	--

2. 3. Молекулярно-генетические методы диагностики

Определение РНК SARS-CoV-2. Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), направленный на обнаружение специфических фрагментов вирусной РНК SARS-CoV-2 при исследовании мазков из носа и ротоглотки с использованием следующих тест-систем: «SARS-CoV-2 FRT» (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва), «РеалБест РНК SARS-CoV-2 (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» (ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск. Все тест-системы зарегистрированы в установленном порядке и разрешены для использования на территории РФ. Подготовку материала, методику постановки и учет реакции проводили согласно инструкции, прилагаемой к этим диагностическим препаратам.

Определение вирусной нагрузки. Относительное количество РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью калибровочной прямой, для построения которой при каждой постановке анализа тестировали калибровочные стандарты. Калибровочные стандарты представляли собой рекомбинантные конструкции, содержащие амплифицируемый фрагмент генома SARSCoV-2 с известной концентрацией. Так как сравнение количества фрагментов было относительным, то РНК фрагменты не использовались. Стадия обратной транскрипции контролировалась прохождением ПЦР по внутреннему РНК контролю предусмотренному системой. Показатель Ct (cycle threshold – количество циклов) менее, чем 40, клинически соответствует положительной ОТ-ПЦР.

2.4. Серологические методы исследования

2.4.1. Детекция иммуноглобулинов классов M+A к S-белку SARS-CoV-2 методом ИФА

Для детекции специфических IgM и IgA антител к спайковому S-белку коронавируса SARS-CoV-2 в различные периоды болезни применяли тест-систему «COVID-19 ELISA IgM+IgA» производства «ВИРСЕЛЛ С.Л.» («Vircell, S.L.», Испания). Измерения оптической плотности проводили с использованием спектрофотометра для микропланшетов Multiscan FC, работающего с программным обеспечением Skanit, версия 4.1 (Thermo Scientific).

Материал для исследования и его подготовка: венозная кровь забиралась один раз в 5-7 дней в течение всего госпитального периода в пробирки с активатором свертывания крови для ускорения процесса тромбообразования.

Постановка реакции: для сорбции в 96-луночные ИФА-планшеты (VIRCELL микропланшет COVID-19), вносили по 25 мкл ELISA сорбента IgG во все лунки за исключением лунок, предназначенных для контролей. Затем по 5 мкл каждого образца и затем по 75 мкл раствора для разведения сыворотки (VIRCELL буфер для разведения сыворотки) в каждую лунку за исключением лунок, предназначенных для контролей. Затем по 100 мкл положительного контроля (VIRCELL IgM+IgA, положительный контроль), по 100 мкл cut-off контроля (VIRCELL IgM+IgA контроль порогового уровня) (в дублях) и по 100 мкл отрицательного контроля (VIRCELL IgM+IgA, отрицательный контроль) в лунки для контролей. После этого производилась инкубация ИФА-планшетов при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 45 минут, и 5 раз отмывали буфером для промывки (VIRCELL буфер для промывки). Затем вносили по 100 мкл раствора конъюгата IgM+IgA (VIRCELL конъюгат) в каждую лунку. После

этого производилась инкубация ИФА-планшетов при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, и 5 раз отмывали буфером для промывки (VIRCELL буфер для промывки). Добавили раствор субстрата (VIRCELL раствор субстрата ТМВ). Затем инкубировали планшеты в течение 20 минут при комнатной температуре, добавили по 50 мкл стоп-раствора (VIRCELL стоп-раствор). Измерения оптической плотности проводили с использованием спектрофотометра для микропланшетов Multiscan FC. Индекс антител больше 8 оценивался как положительный результат, меньше 6 — как отрицательный, при сомнительном результате ($6 < \text{индекс антител} < 8$) проводилось повторное исследование материала.

2.4.2. Детекция специфические IgG антител к структурным белкам нуклеокапсида (Nc) и рецептор-связывающего гликопротеида шиповидного белка S (RBD) коронавируса SARS-CoV-2

Для проведения ИФА использовали рекомбинантный фрагмент рецептор-связывающего домена (RBD) S1 шиповидного белка SARS-CoV-2 (RBD № 8COV1, Хайтест, Россия), экспрессированный в эукариотических клетках, и рекомбинантный белок нуклеокапсида (Nc), экспрессированный в *Escherichia coli*.

Постановка реакции. Для сорбции в 96-луночные ИФА-планшеты (Costar 2592, Corning, USA) вносили по 100 мкл раствора 1 мкг/мл рекомбинантного белка в ФСБ и инкубировали ночь при $+40^\circ\text{C}$. На следующий день планшеты блокировали 2 часа при комнатной температуре буфером с 0,5% казеина S002X (ХЕМА, Россия). Образцы исследуемых сывороток разводили 1:100 в ИФА-дилуэнте S011 (ХЕМА, Россия). В качестве положительного контроля использовали сыворотки реконвалесцентов с диагнозом COVID-19, подтверждённым ОТ-ПЦР, а в качестве отрицательного — архивные образцы сывороток, собранные до 2020 года. ИФА-планшеты

инкубировали 1 час при 37°C и трижды отмывали фосфатным буфером с 0,1% Твин-20. После отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора поликлональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) (Novex A18823, USA) и инкубировали 1 час при 37°C. Затем планшеты отмывали 6 раз и добавляли в лунки по 100 мкл раствора субстрата 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (R055, ХЕМА, Россия). Через 10 минут останавливали реакцию, внося в лунки 10% HCl. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм с помощью Multiscan FC (Thermo Scientific, USA). Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм с помощью Multiscan FC (Thermo Scientific, USA), результат выражали в виде индекса позитивности (ИП, выражаемого в signal/cut-off, S/CO). Интерпретацию результатов проводили по следующим критериям: результат анализа на определения антител класса G считается положительным, если для исследуемого образца $KП \geq 1,1$, отрицательным — если $KП < 0,9$. Результат определения антител класса G считали сомнительным, если $0,9 \leq KП < 1,1$, и в таких случаях повторяли исследование. Для оценки диагностической чувствительности и специфичности использовались сыворотки крови здоровых лиц (n=48) и пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом ОРВИ (n=64), собранные в 2019 году. Диагностическая эффективность теста выражается процентным отношением истинных (и положительных, и отрицательных) результатов теста к общему числу полученных результатов.

2.4.3. Детекция нейтрализующих антител (IgG) к рецептор-связывающему домену (RBD) методом ИФА

Исследование уровня нейтрализующих IgG антител, связывающих RBD вируса с рецептором ACE-2, проводили с помощью коммерческой тест-системы «SARS-CoV-2-ИФА анти-RBD» (MT-И-С1-04.192, МедипалТех, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Диагностическая

чувствительность набора составляет 92% (интервал 86,28–100%, с доверительной вероятностью 95%). Образцы исследуемых сывороток смешивали с биотинилированным рекомбинантным человеческим рецептором ACE-2 и вносили смесь в лунки ИФА-планшетов, сорбированных рекомбинантным RBD. После инкубации и отмывки в лунки добавляли ПХ, конъюгированную со стрептавидином. Для визуализации реакции использовали субстратный раствор ТМБ. Оптическая плотность в лунках была обратно пропорциональна концентрации в образце антител, способных блокировать связывание ACE-2 с RBD. Коэффициент ингибирования (КИ) вычисляли по формуле $КИ = (1 - ОП_{обр} / ОП_{отр}) \times 100\%$, где $ОП_{обр}$ — ОП исследуемого образца, а $ОП_{отр}$ — ОП отрицательного контроля, не содержащего антител. Нейтрализующая способность антител считалась высокой, если образец сыворотки ингибировал связывание RBD с ACE-2 более, чем на 30%; промежуточной — если КИ был от 20 до 30%, и низкой для образцов с КИ менее 20%.

2.4.4. Измерение avidности антител

Авидность IgG антител, специфичных к RBD SARS-CoV-2, определяли с помощью набора «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» (МТ-И-С1-03.192, МедипалТех, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Диагностическая чувствительность набора составляет 100% (интервал 86,28 – 100%, доверительный интервал (ДИ) 95%). Образцы положительных сывороток в дубликатах вносили в лунки планшета, сорбированных RBD. После инкубации и отмывки в лунки вносили либо фосфатно-солевой буфер (ФСБ, нативные условия), либо раствор мочевины (денатурирующие условия). Далее проводили реакцию как обычный непрямой ИФА. Индекс avidности (ИА), пропорциональный устойчивости антител к денатурации, рассчитывали как соотношение ОП при 450 нм в лунках с денатурирующим агентом и ФСБ.

Антитела в образцах с ИА>50% считали высокоавидными, между 40 и 50% — с переходной авидностью, <40% — низкоавидными.

2.5. Статистические методы исследования

Обработка результатов исследований проводилась методами вариационной статистики и корреляционного анализа с использованием программного пакета Statistica 12.6, RGui (x64 bit), SPSS Statistics. Для первичной подготовки таблиц были использованы: программный пакет Excel, Origin Pro 8 и Google Sheets. С целью оценки прогностической ценности вероятности использовали теорему Байеса.

2.5.1. Методы вариационной статистики, применяемые для оценки клинико-лабораторных показателей

Статистический анализ количественных признаков. Статистический анализ количественных признаков проводился с использованием параметрических методов: расчет среднего арифметического – \bar{x} , ошибки среднего – Sx , среднеквадратичного отклонения – σ , критерий Фишера — сравнений дисперсий двух независимых выборок. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$ (где M — среднее арифметическое, m — среднеквадратичное отклонение).

Отличия между выборками, распределенными по нормальному закону, оценивались по параметрическому критерию Стьюдента:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

где \bar{x}_1, \bar{x}_2 — среднее арифметическое выборок, s_1, s_2 — стандартные отклонения выборок, n_1, n_2 — объем первой и второй выборки соответственно.

Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ согласно таблице критических значений t-критерия Стьюдента.

Медиана и значения 25-75 перцентилей использовались для оценки результатов анализа и представления в виде "бокс-плот" и ящичных диаграмм, концы хвостов которых отражают минимальное и максимальное значение в выборке.

Статистический анализ качественных признаков. Статистический анализ качественных признаков проводился с помощью четырехпольных таблиц. После чего подсчет производился точным двусторонним критерием Фишера, ϕ -критерием, критерием χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса, критерием χ^2 и методом сопряженности Пирсона. Критерий χ^2 использовался в случае, если ожидаемые частоты ячеек таблицы сопряженности были более 5. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ согласно таблице критических значений критерия χ^2 . Для малых выборок использовался точный критерий Фишера (двусторонний). Была применена четырехпольная таблица (таблица 7) для статистической обработки данных.

Таблица 7. Пример четырехпольной таблицы для статистических расчётов

Н — число наблюдений	Исход	Без исхода
Наличие фактора риска	C_1	C_2
Отсутствие фактора риска	C_3	C_4

Конечное соотношение для расчёта точного критерия Фишера:

$$P = \frac{(C_1 + C_2)!(C_3 + C_4)!(C_1 + C_3)!(C_2 + C_4)!}{N!(C_1!C_2!C_3!C_4!)} ;$$
 для оценки распределения χ^2 - $P =$

$\sum \frac{(|f^0 - f^e| - 0.5)^2}{f^e}$, где f^0 — наблюдаемая частота события, f^e — ожидаемая частота события, 0,5 — поправка Йейтса на непрерывность распределения для частоты бинарных событий; для оценки поправки на правдоподобие

использовалась формула $\Lambda\chi^2 = 2 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m C_{ij} \ln \frac{f_{ij}^0}{f_{ij}^e}$; оценка ϕ -критерия

производилась по формуле $\phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$, коэффициент взаимной сопряженности

Пирсона рассчитывался по формуле $C = \sqrt{\frac{\chi^2}{\chi^2 + n}}$, где n — число наблюдений.

Интерпретацию силы взаимосвязи по ϕ -критерию производили согласно рекомендации Rea и Parker (таблица 8):

Таблица 8. Критерии оценки силы связи по Rea и Parker

Значение критерия	Сила взаимосвязи	Уровень достоверности
<0,1	Несущественная	достоверно
0,1-0,2	Слабая	достоверно
0,2-0,4	Средняя	достоверно
0,4-0,6	Относительно сильная	достоверно
0,6-0,8	Сильная	достоверно
0,8-1,0	Очень сильная	достоверно

Минимальное значение последовательно уменьшалось или увеличивалось на 1 с сохранением маргинальных сумм.

Программный код (для RGui) для расчёта матриц по Фишеру:

```
X<- matrix(c(C1,C2,C3,C4), ncol = 2);
```

```
fisher.test(X).
```

Программный код (для RGui) для расчёта матриц по Пирсону:

```
X<- matrix(c(C1,C2,C3,C4), nrow = 2, byrow = true);
```

```
chisq.test(N).
```


2.5.2. Методы вариационной статистики, применяемые для оценки показателей гуморального ответа

Статистический анализ качественных признаков. Статистический анализ качественных признаков проводился с помощью критерия хи-квадрат, критерия Макнемара, а при невыполнении условий этого критерия применялся точный критерий Фишера. Обработка таблиц сопряженности проводилась с использованием программы SPSS Statistics ver. 26 (IBM, USA) и языка программирования R. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ количественных признаков При анализе количественных признаков сначала проводился анализ на нормальность распределения признака (с помощью критериев Шапиро–Вилкоксона и/или Колмогорова–Смирнова). Различные группы сравнивались между собой с помощью критерия Стьюдента при приближении распределений к нормальному согласно тестам, описанным выше, или с помощью теста Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса в случае значимых отличий от нормального распределения ($p < 0,05$). Для зависимых признаков использовался одновыборочный критерий Вилкоксона и парный t-критерий Стьюдента (в случае распределения величин близкого к нормальному). Все вычисления проводились с помощью языка программирования R с использованием пакета nortest и программы SPSS Statistics ver. 26 (IBM, USA). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 9. Критерии оценки уровня значимости

Критерий	Описание
Критерий проверки на нормальность Шапиро–Уилка	Распределение считалось близким к нормальному при $p \geq 0,05$
Критерий проверки на нормальность Колмогорова–Смирнова	Распределение считалось близким к нормальному при $p \geq 0,05$
Критерий хи-квадрат Пирсона	Различия считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Точный тест Фишера	Различия считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Критерий Манна–Уитни	Различия считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Критерий Краскелла–Уоллиса	Различия считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Критерий Стьюдента	Различия считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Критерий Вилкоксона	Изменения считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Парный критерий Стьюдента	Изменения считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$
Критерий Макнемара	Изменения считались статистически значимыми при $0 < p < 0,05$

Глава 3. Клиническая характеристика пациентов с COVID-19

3.1. Ретроспективный анализ историй болезни пациентов с COVID-19, находившихся в стационаре в период с апреля по июль 2020 г.

Нами проведён ретроспективный анализ историй болезни 190 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ №4 ДЗМ г. Москвы в период с мая по июнь 2020 года с диагнозом U07.1/ U07.2 «Коронавирусная инфекция, вызванная COVID-19». Ретроспективный вирусологический мониторинг за указанный период пандемии показал, что в Москве и Московской области преобладали штаммы Ухань – Wuhan-1 (EPI_ISL_402123), появившиеся в конце 2019 года в Китае. Ведущими клиническими проявлениями тяжелого течения COVID-19 были: длительная гектическая лихорадка, сухой упорный кашель, выраженная слабость, тяжелый острый респираторный синдром.

Диагноз был подтвержден этиологически у 132 (69,5%) пациентов обнаружением РНК SARS-Cov-2 в секрете носоглотки методом ОТ-ПЦР, в 45 (23,7%) случаях методом иммуноферментного анализа (ИФА) (обнаружение антител класса G и M к SARS-Cov-2), в 13 (6,8%) случаях основанием для постановки диагноза COVID-19 служили: данные эпидемиологического анализа, наличие типичного клинического симптомокомплекса, результаты дополнительных методов обследования (анализ визуализационных данных: обзорная рентгенография легких, КТ ОГК, лабораторные тесты). Лечение стационарных пациентов с COVID-19 проводилось согласно временным клиническим рекомендациям (Версия 6 от 28.04.2020) [142]. Терапия включала препараты с предполагаемым противовирусным действием (хлорохин, гидроксихлорохин, лопинавир+ритонавир, азитромицин в комбинации с гидроксихлорохином), препараты интерферонов.

Патогенетическая терапия осуществлялась с помощью ряда лечебных средств: моноклональные антитела (тоцилизумаб, сарилумаб), ингибиторы JAK1 и JAK2 киназ (барицитиниб), гормональные препараты (метилпреднизолон, дексаметазон). С целью профилактики развития коагулопатий и ДВС-синдрома проводилась антикоагулянтная терапия (нефракционированный гепарин, эноксапарин натрия); для профилактики и лечения присоединившихся бактериальных осложнений применялась антибиотикотерапия. Пациентам с дыхательной недостаточностью назначалась кислородная поддержка при падении показателя сатурации (SpO_2) менее 92% через лицевую маску или назальные канюли; при самостоятельном дыхании — потоком до 15 литров в минуту. При сохранении уровня гипоксемии пациентам рекомендовалась прон-позиция (укладывание пациента на живот) с высокой поточной оксигенацией (ВПО) потоком 30-60 литров в минуту. При неэффективности данных мер пациентов переводили на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) и/или экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО) в условиях ОРИТ.

Ретроспективный анализ позволил выделить основные демографические показатели: из 190 пациентов 90 (47,4%) составили мужчины; 100 (52,6%) — женщины, госпитализированные в среднем на $10,0 \pm 7,4$ день заболевания. Средняя продолжительность пребывания пациентов в стационаре составила $12,5 \pm 4,9$ дней.

Пациенты были распределены по степени тяжести течения заболевания на категории среднетяжелых и тяжёлых согласно временным клиническим рекомендациям (Версия 6 от 28.04.2020) [142]. Критерии распределения по тяжести представлены в таблице 10. Среднетяжелое течение болезни наблюдалось у 62,6% госпитализированных (рисунок 7).

Таблица 10. Критерии тяжести заболевания пациентов с COVID-19

Признак	Среднетяжелые	Тяжелые
ЧДД	>22/мин	>30/мин
SpO ₂	<95%	≤93%
PaO ₂ /FiO ₂	-	≤300 мм рт.ст.
Температура, °С	38	≥38
Снижение сознания, ажитация	-	+
СРБ, мг/л	>10	-
Пневмония, % по КТ	Пневмония (подверженная с помощью КТ легких)	Прогрессирование изменений в легких, типичных для COVID-19 пневмонии, по данным рентгенографии и/или КТ, в том числе увеличение распространенности выявленных изменений более чем на 25%, а также появление признаков других патологических состояний
Сознание	Ясное	Снижение уровня сознания, ажитация
Нарушение гемодинамики	-	Систолическое АД менее 90 мм рт.ст. Или диастолическое АД менее 60 мм рт.ст., диурез менее 20 мл/час
Лактат артериальной крови	-	>2 ммоль/л
qSOFA, баллы	0-1	2



Рисунок 7. Распределение пациентов по степени тяжести заболевания

Клиническая картина COVID-19 в группе среднетяжелого течения отличалась вариабельностью и была представлена следующими симптомами и синдромами: синдром интоксикации встречался в 119 (100%) случаях, одышка — в 73 (60,2%), кашель — в 93 (78,2%), катарально-респираторный синдром, преимущественно проявляющийся першением и чувством дискомфорта в горле, гиперемией ротоглотки, составил 55 (46,2%), поражение ЖКТ — 8 (6,7%), нарушение обоняния (дизосмия) в 5 (4,2%), нарушение вкуса (дисгевзия) — 4 (3,4%), миалгии — в 3 (2,5%), артралгии — 1 (0,8%), экзантемы — 2 (1,7%), дизурические явления — 2 (1,7%). Возрастной состав пациентов этой группы был представлен следующим образом: пациенты в возрасте 15-44 лет составляли 14 человек (12%), подавляющее большинство составили пациенты возраста 45-64 лет — 56 человек (47%), в возрасте 65-74 лет — 33 человека (28%), 75-84 лет — 14 человек (12%), старше 85 лет — 2 человека (1%).

Частота сочетанной патологии в группе среднетяжелого течения COVID-19 составила 62,2%, при этом регистрировались следующие нозологические формы (рисунок 8): сахарный диабет второго типа (СД2) у 23 (19,3%) пациентов, (J45) бронхиальная астма (БА) у 4 (3,3%) больных, (J44) хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) у 4 (3,3%) пациентов, (I11) гипертоническая болезнь (ГБ) у 58 (48,7%) пациентов, (N18) хроническая болезнь почек (ХБП) у 6 (5,0%) человек, (I67) цереброваскулярная болезнь (ЦВБ) у 2 (1,7%) больных, (E66) ожирение в 24 случаях (20,2%), хронические заболевания печени у 2 (1,7%) пациентов, хроническая сердечно-сосудистая патология (за исключением ГБ и ЦВБ) у 44 человек (37,0%).

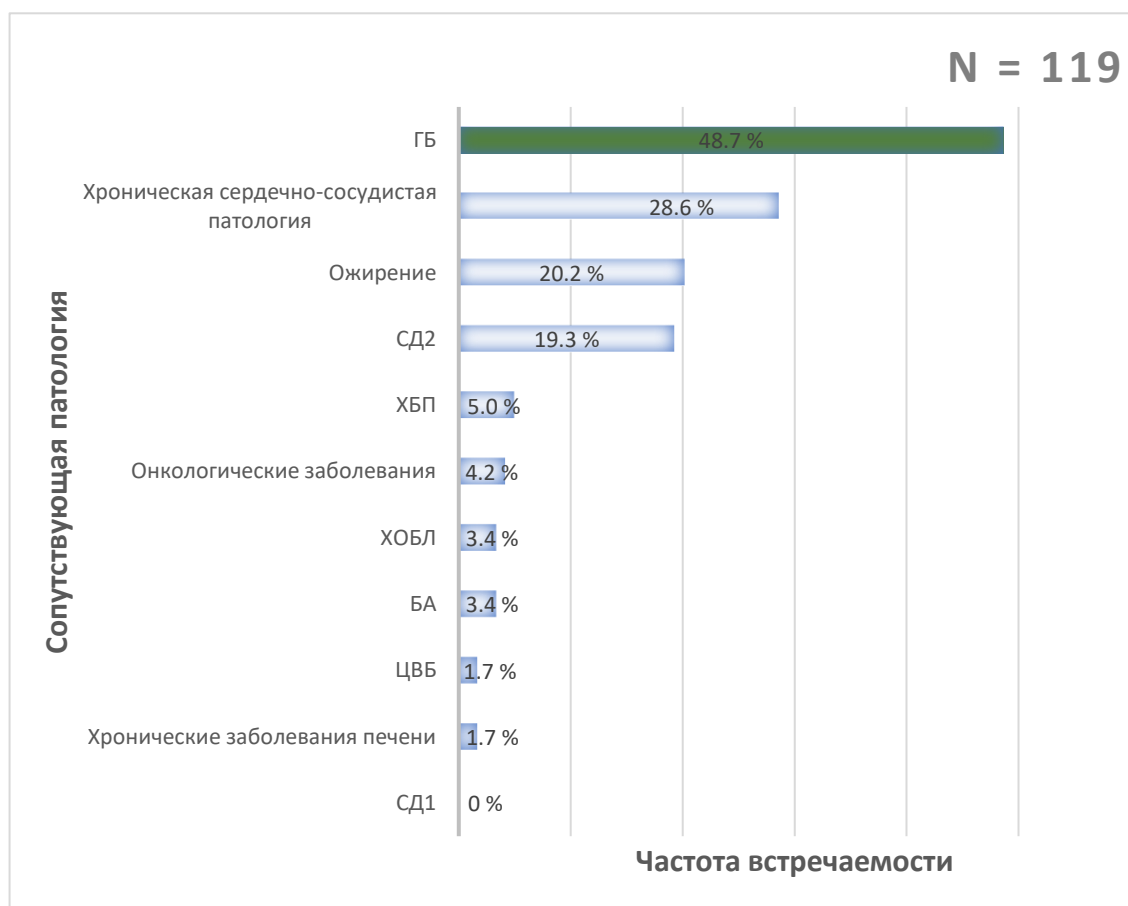


Рисунок 8. Сопутствующие заболевания у пациентов группы среднетяжелого течения

Тяжелое течение болезни в первую волну пандемии 2020 года в стационаре города Москвы отмечено у 71 (37,4%) пациентов. Возрастной состав распределился следующим образом: возрастная категория 15-44 лет — 7 человек (9,8%), 45-64 лет — 23 человека (32,4%), 65-74 лет — 23 человека (32,4%), 75-84 лет — 13 человек (18,3%), старше 85 лет — 5 человек (7,0%).

Клиническая симптоматика включала развитие интоксикации у 100% пациентов, одышки, затруднения дыхания — у 65 (92%) больных, кашля — у 36 (51,1%), катарально-респираторного синдрома — в 9 (12,7%) случаях, миалгий — у 2 (2,8%) пациентов, симптомов поражения ЖКТ — у 2 (2,8%), нарушения обоняния, кожных проявлений и артралгий — по 1 случаю (1,4%).

Частота сопутствующих заболеваний в группе тяжелого течения заболевания составила 87,3% и включала следующие патологии (рисунок 9): СД2 встречался у 14 (19,7%) пациентов, БА у 2 (2,8%) больных, ХОБЛ — у 3 (4,2%) пациентов, гипертоническая болезнь у 44 (61,9%) пациентов, ХБП у 13 (18,3%) человек, ЦВБ у 11 (15,5%) больных, ожирение в 17 (23,9%) случаях, заболевания печени у 3 (2,0%) пациентов, хроническая сердечно-сосудистая патология (за исключением ГБ и ЦВБ) у 48 (67,6%) человек. Частота сопутствующих заболеваний в группе тяжелого течения заболевания составила значительно более высокие цифры 87,3%, преимущественной патологией, коррелирующей с тяжестью, были: сахарный диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания, гипертоническая болезнь, хронические обструктивные заболевания легких.

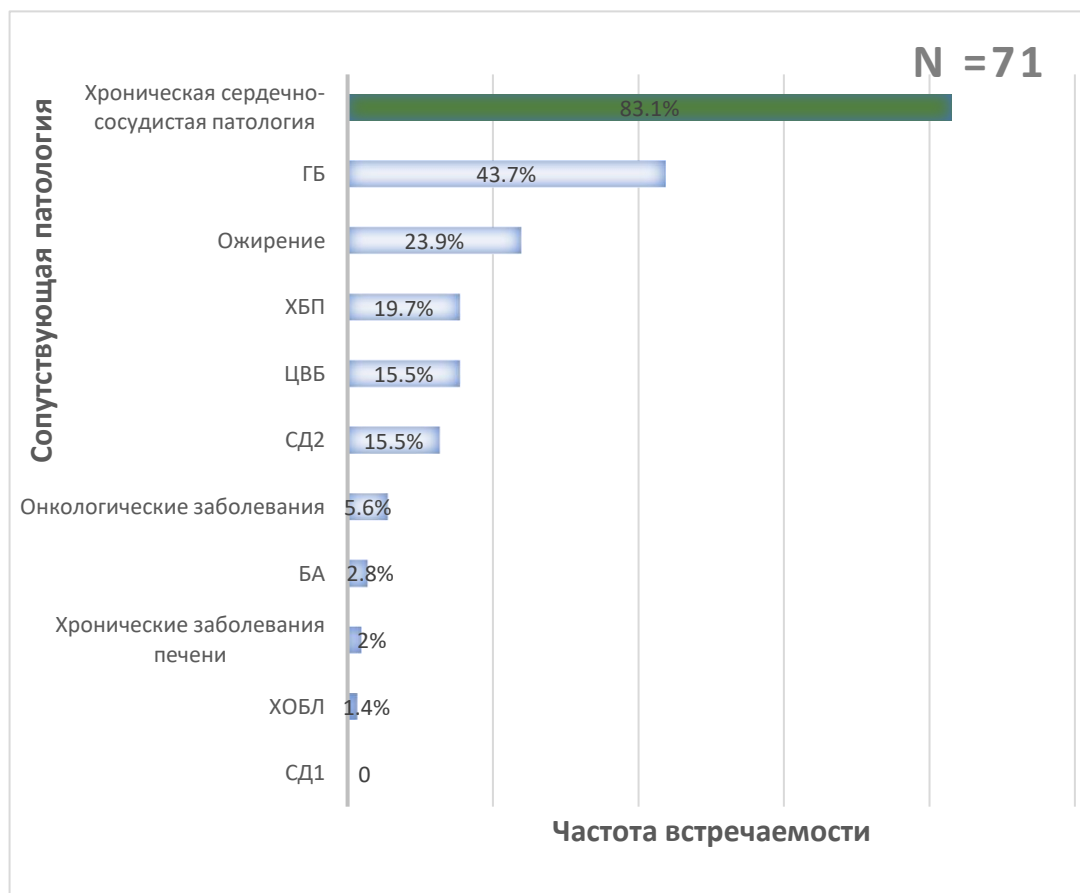


Рисунок 9. Сопутствующие заболевания в группе пациентов с тяжелым течением болезни

Хронические заболевания печени в группах среднетяжелого и тяжелого течения были представлены: циррозом печени и гепатитами различного генеза (аутоиммунный, лекарственный, вирусный, токсический). Спектр хронических сердечно-сосудистых заболеваний включал: ИБС (стенокардия, атеросклеротический кардиосклероз, нарушения ритма, постинфарктный кардиосклероз), церебральный атеросклероз, ХСН, тромбоз, кардиомиопатию, аневризму аорты. Хронические заболевания почек представлены хроническими пиелонефритами и гломерулонефритами, в том числе с почечной недостаточностью.

Учитывая то обстоятельство, что диагностический алгоритм обязательно включал проведение КТ ОГК, как один из основных методов постановки определенного диагноза, у 185 пациентов в динамике заболевания представлен анализ результатов этих исследований. Данный анализ показал, что у подавляющего большинства группы среднетяжелого течения отмечены изменения, характерные для КТ-2 (объем поражения легких от 25 до 50%), – у 58 (48,8%), у 19 (15,9%) больных изменения соответствовали КТ-1 (объем поражения легких от 0 до 25%), тогда как КТ-3 (объем поражения легких 50-75%) отмечено у 33 (27,7%) и КТ-4 (процент поражения свыше 75%) — у 6 пациентов (5%). В случаях тяжелого течения заболевания у большинства пациентов поражение легких соответствовало КТ-3 – 42,3% (35 человек). По сравнению с группой среднетяжелого течения процент пациентов с КТ-4 вырос до 29% (20 человек). В свою очередь количество пациентов с КТ-2 снизилось до 15,5 % (11 пациентов), как и КТ-1 — 4,2 % (3 случая). Пациентам этой группы чаще требовалась дополнительная кислородная поддержка: перевод на ИВЛ — у 26 (36,6%) и ЭКМО — 1 (1,4%) (таблица 11).

Таблица 11. Структура методов кислородной поддержки у пациентов в различных группах течения

	Среднетяжелые n = 119		Тяжелые n = 71	
	n	%	n	%
Без поддержки	74	62,2%	27	38,0%
С маской	24	20,2%	9	12,7%
С канюлей	21	17,7%	28	39,4%
ИВЛ	0	0,0%	26	36,6%
ЭКМО	0	0,0%	1	1,4%

Новая коронавирусная инфекция, глобально охватившая человеческую популяцию, поставила перед клиницистами много вопросов, включая оценку лабораторных гематологических тестов. Нами был проведен анализ особенностей течения и лабораторных маркеров тяжести течения заболевания.

Спектр основных лабораторных показателей в группах пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 представлен в таблице 12.

Таблица 12. Гематологические показатели в группах среднетяжелых и тяжелых пациентов с COVID-19

Маркеры/ исследование (норма)	Среднетяжелое течение	Тяжелое течение
Протромбин (70-118%)	65,54% (среднее) Минимальное - 13,0% Максимальное - 116,4% Медиана - 79,9%	117,25% (среднее) Минимальное - 95,5% Максимальное - 139,0% Медиана - 117,3%
МНО (0,85-1,15)	1,14 (среднее) Минимальное - 1,14 Максимальное - 0,89 Медиана - 1,08	1,23 (среднее) Минимальное - 0,89 Максимальное - 4,2 Медиана - 1,13
Д-димер (0-250 мкг/л)	848,5 мкг/л (среднее) Минимальное - 61 мкг/л Максимальное - 5000 мкг/л Медиана - 497 мкг/л	1006,7 мкг/л (среднее) Минимальное - 100 мкг/л Максимальное - 5000 мкг/л Медиана - 527 мкг/л
ЛДГ (120-246 ед/л)	262,19 ед/л (среднее) Минимальное - 138 ед/л	377,3 ед/л (среднее) Минимальное - 206 ед/л

	Максимальное - 569 ед/л Медиана - 75 ед/л	Максимальное - 742 ед/л Медиана - 343 ед/л
С-реактивный белок (0-5 мг/л)	79,05 мг/л (среднее) Минимальное – 20 мг/л Максимальное - 359 мг/л Медиана – 58 мг/л	159,9 мг/л (среднее) Минимальное - 50 мг/л Максимальное - 471 мг/л Медиана - 131 мг/л
Тромбоцитопения (180 - 400 тыс/мкл)	33,61% (частота встречаемости)	28,16% (частота встречаемости)
Лейкопения (4 - 9x10 ⁹ /л)	21,85% (частота встречаемости)	38,1% (частота встречаемости)
Лимфопения (18-40%)	43,69% (частота встречаемости)	49,29% (частота встречаемости)
1-й–10-й дни болезни	Калий 4,18 ± 0,44 ммоль/л (норма 3,40 - 5,30 ммоль/л) Натрий 138,61 ± 3,86 ммоль/л (норма 135,00 - 155,00 ммоль/л)	Калий 4,03 ± 0,65 ммоль/л (норма 3,40 - 5,30 ммоль/л) Натрий 131,77 ± 32,13 (норма 135,00 -155,00 ммоль/л)
11-й–20-й дни болезни	Калий 4,23 ± 0,58 ммоль/л Натрий 140,95 ± 4,58 ммоль/л	Калий 4,30 ± 0,90 ммоль/л Натрий 138,39 ± 17,70 ммоль/л
21-й–30-й дни болезни	Калий 4,1 ± 0,47 ммоль/л Натрий 141,51 ± 3,08 ммоль/л	Калий 4,71 ± 0,79 ммоль/л Натрий 135,00 ± 25,19 ммоль/л

В группе тяжелого течения достоверно чаще встречался повышенный уровень показателей Д-димера, ЛДГ, СРБ (($p \leq 0,05$)).

В группе тяжелых пациентов 33 (46%) находились в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), 19 (27%) из которых — случаи с летальным исходом. Распределение пациентов в зависимости от исходов заболевания и гендерный состав группы летальных представлены на рисунке 10.

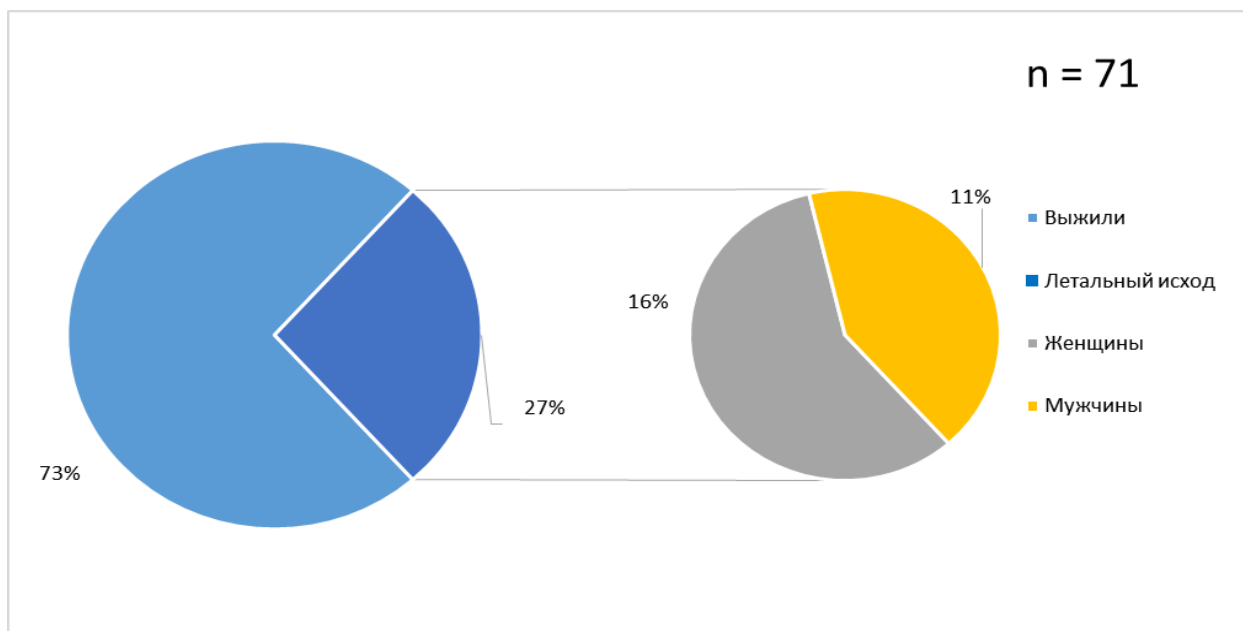


Рисунок 10. Пациенты тяжелого течения
в зависимости от исходов заболевания

Статистический анализ данных выявил, что рост числа летальных случаев у пациентов с COVID-19 коррелировал с возрастом (доверительный интервал по χ^2 - $p=0,002$). На рисунке 11 представлено распределение пациентов в соответствии с причинами смерти и сопутствующими заболеваниями.

При сравнении групп тяжелого и среднетяжелого течения болезни была обнаружена связь между тяжестью течения и сопутствующей патологией. Причем, по нашим данным, следующие патологии: сердечно-сосудистые заболевания (относительно сильная взаимосвязь, коэффициент сопряженности Пирсона — 0,467), хроническая болезнь почек (средняя взаимосвязь, коэффициент сопряженности Пирсона — 0,256) и цереброваскулярная болезнь (средняя взаимосвязь коэффициент сопряженности Пирсона — 0,265) являются значимыми факторами риска, ассоциированными с тяжелым течением заболевания. По данным мета-анализа Gansevoort R.T. (2020) с соавторами, хронические заболевания почек

являются одним из факторов риска тяжести и летальности COVID-19, что коррелирует с полученными нами данными [134]. Связь возраста и показателя летальности у пациентов с COVID-19 проанализирована в исследовании Omori R. [143] с соавторами. В нашем исследовании возраст «75+» имеет среднюю взаимосвязь с летальным исходом (доверительный интервал по χ^2 - $p=0,002$). Стоит отметить, что сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания многими исследованиями выделялись как значимый фактор риска тяжелого течения COVID-19. Корреляция между наличием хронического заболевания и тяжестью течения представлена на рисунке 12.

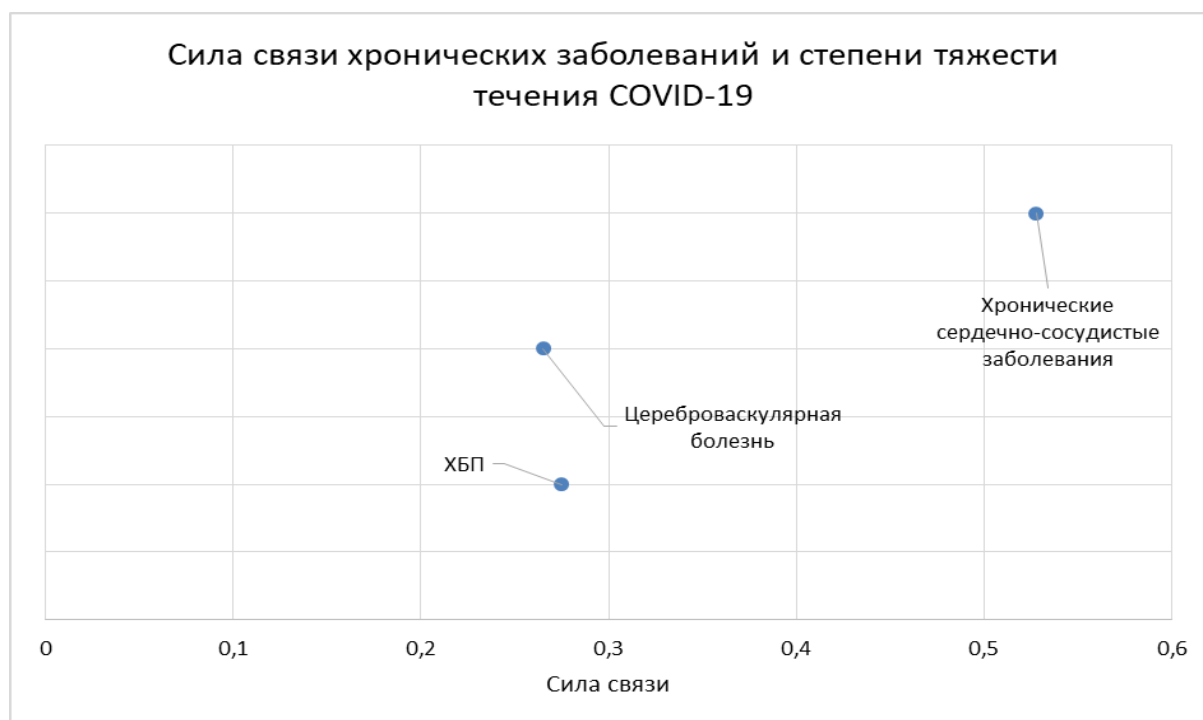


Рисунок 12. Результаты корреляционного анализа и оценка тяжести течения COVID-19 в ассоциации с сопутствующей патологией

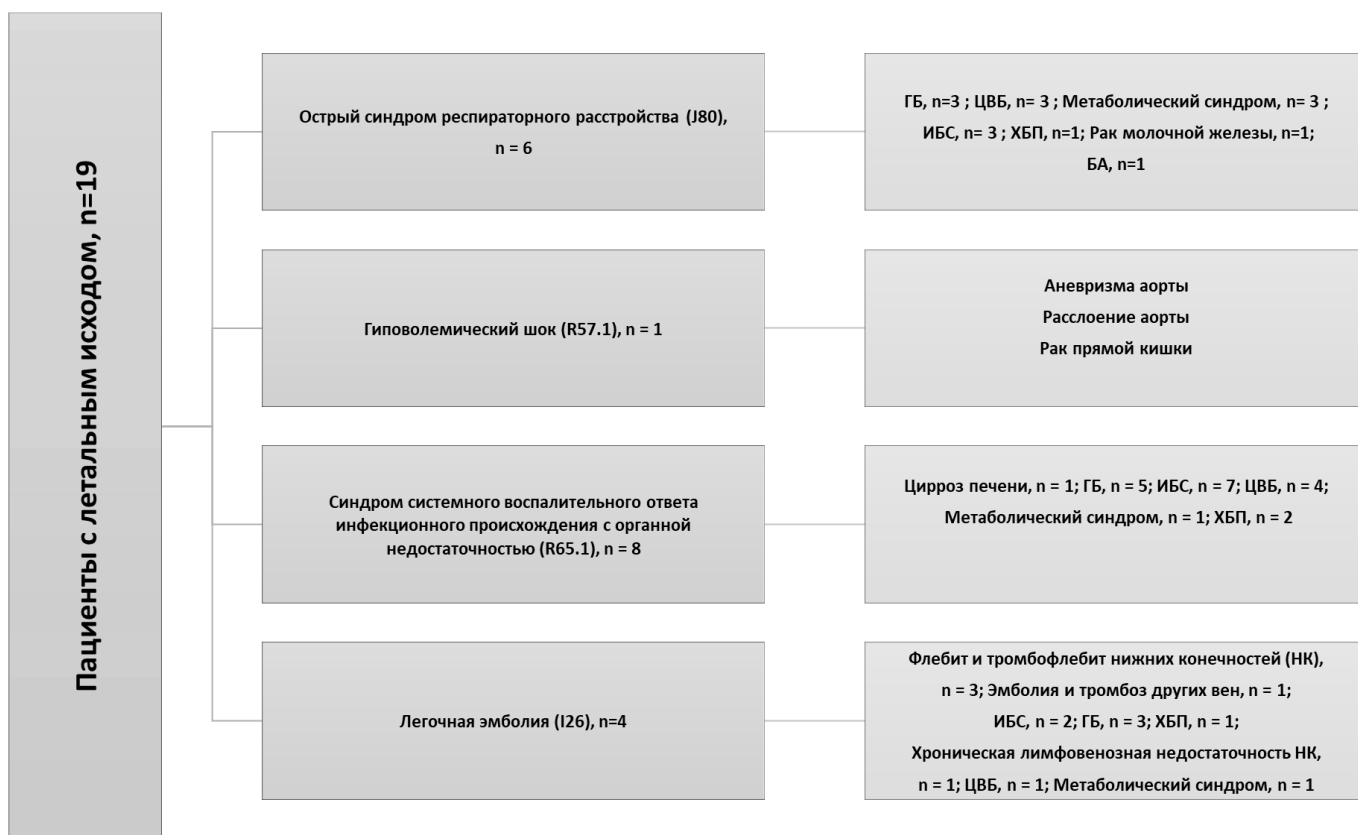


Рисунок 11. Структура случаев с летальным исходом COVID -19

Исходы коронавирусной инфекции зависели от множества факторов: количества полученной дозы инфекционного возбудителя, адекватности иммунного ответа организма, наличия или отсутствия ряда врожденных протективных факторов, сроков госпитализации и начала терапии. Существенное значение имеют также правильно выработанные стратегии терапии, своевременность и адекватность назначения антикоагулянтной терапии, отсутствие полипрагмазии, и прочее. Анализ исходов у пациентов ОРВИ показал, что все 19 клинических наблюдений с летальным исходом (100% случаев) включали пациентов с одним или несколькими сопутствующими заболеваниями. Самым сильным фактором в диагностическом и терапевтическом аспектах была индивидуальная реакция

на встречу с вирусом, а именно развитие системного воспалительного ответа; по нашим данным, частота его развития составила 42,1%. Формирование коагулопатии, как в рамках ДВС-синдрома, так и автономно, включая ТЭЛА, отмечалось в 21,1% случаев.

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ первых стационарных пациентов с новой коронавирусной инфекцией показал:

Клиническая картина заболевания у стационарных пациентов отличалась полиморфизмом симптомов и проявлений. Наиболее частыми симптомами/ синдромами были: интоксикация, одышка, затруднение дыхания, кашель, миалгии, диспепсия; реже развивались аносмия, дизгевзия, экзантемы. Определена ассоциация тяжелого течения COVID-19 у пациентов в возрасте 75+ со следующими коморбидными состояниями: сердечно-сосудистыми заболеваниями, хроническими заболеваниями почек, цереброваскулярными болезнями.

3.2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19, находившихся в стационаре в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г

Самостоятельно был проведен мониторинг и анализ данных 206 пациентов, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в период с 15.04.2020 по 2.03.2021 г. с диагнозом «Коронавирусная инфекция, COVID-19, вирус идентифицирован» (U07.1 по МКБ). При лабораторном исследовании назофарингеальных образцов, проведенном в первые госпитальные сутки, РНК SARS-CoV-2 была обнаружена у 63,2% пациентов. Диагноз COVID-19 у 36,8% был подтвержден комплексно — при повторном исследовании мазка

и по результатам компьютерной томографии (КТ) легких. Наблюдения проводились преимущественно во вторую и третью волны пандемии, в то время, когда наиболее распространенным вариантом штамма SARS-CoV-2 являлся Дельта (B.1.617.2, G/452R.V3, 21A).

Все пациенты были разделены по степени тяжести заболевания, согласно критериям ВОЗ: к пациентам с легким течением относились больные с подтвержденным диагнозом COVID-19 без признаков вирусной пневмонии или гипоксии, к группе пациентов средней тяжести болезни относились больные с клиническими признаками пневмонии (лихорадка, кашель, затрудненное и учащенное дыхание), включая показатель $SpO_2 \geq 90\%$ при дыхании комнатным воздухом. В группу тяжёлых пациентов были включены больные с клиническими проявлениями пневмонии (лихорадка, кашель, затрудненное и учащенное дыхание) при наличии хотя бы одного из следующих дополнительных признаков: частота дыхания ≥ 30 вдохов/мин; тяжелый респираторный дистресс; $SpO_2 < 90\%$ при дыхании комнатным воздухом. При развитии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) состояние расценивалось как критическое. Распределение пациентов по степени тяжести течения заболевания представлено на рисунке 13.

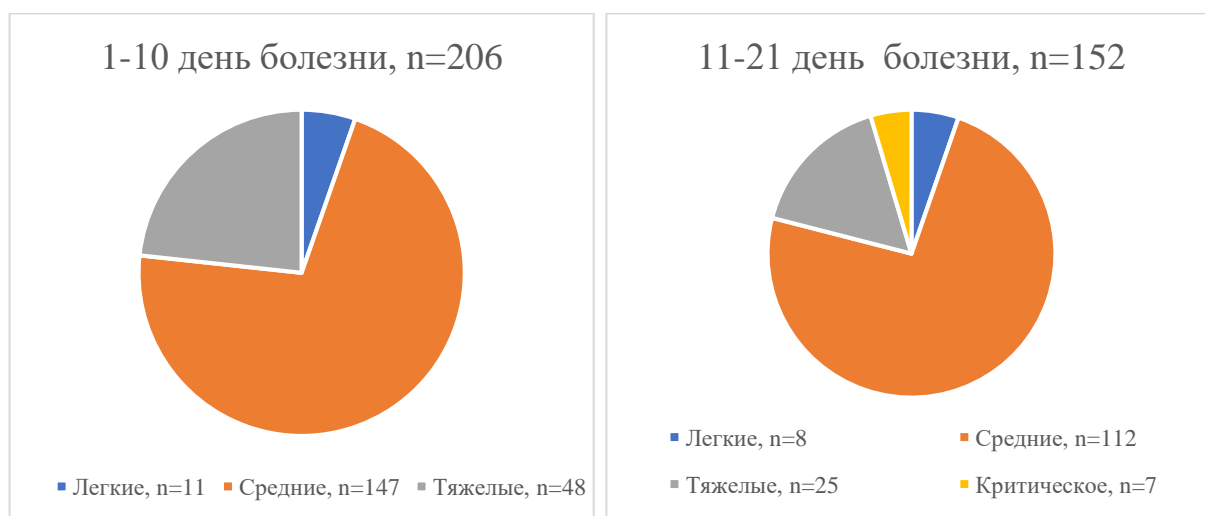


Рисунок 13. Распределение пациентов по степени тяжести течения COVID-19

Приводим демографические показатели обследуемых групп: мужчины в данной выборке составили 96 человек (46,6%); женщины — 110 человек (54,4%). Средний возраст пациентов 66 ± 14 лет. Средняя длительность госпитализации составила 10 ± 5 дней.

Основную группу (71,4–73,7%) пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19 составили больные, имеющие среднетяжелое течение (таблица 13). Динамическое наблюдение за пациентами в группах показало негативные изменения соотношения в силу ухудшения, наступившего в период с 11 по 21 день болезни: в группе легких 1 (9,1%) пациент перешел в группу средней тяжести, у средних 15 (10,0%) пациентов перешли в группу тяжелого течения заболевания, в группе тяжелых пациентов у 7 человек (14,5%) наблюдалось критическое течение.

Таблица 13. Демографическая характеристика пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19

Исследуемые параметры	n=206, 1-10 дни болезни			n=152, 10-21 дни болезни,			
	Легкая степень тяжести абс. (%)	Средняя степень тяжести абс. (%)	Тяжелое течение абс. (%)	Легкая степень тяжести абс. (%)	Средняя степень тяжести абс. (%)	Тяжелое течение абс. (%)	Критическое течение абс. (%)
Пациенты	11 (5,34%)	147 (71,4%)	48 (23,3%)	8 (5,3%)	112 (73,7%)	25 (16,4%)	7 (4,6%)
<i>Пол</i>							
Мужчины	4 (36%)	72 (48%)	20 (9,7%)	4 (2,6%)	54 (35,5%)	14 (9,2%)	-
Женщины	7 (63%)	75 (51%)	28 (13,6%)	4 (2,6%)	58 (38,2%)	11 (7,2%)	7 (4,6%)

Возраст							
25-49 лет	6 (54,5%)	22 (15%)	2 (1,0%)	3 (2,0%)	15 (10,0%)	-	1(0,7%)
50-59 лет	2 (18%)	26 (18%)	5 (2,4%)	1 (0,7%)	21 (13,8%)	3(2,0%)	1(0,7%)
60-69 лет	2 (18%)	43 (29%)	13 (6,3%)	1 (0,7%)	31 (20,4%)	12 (8,0%)	2 (1,3%)
Старше 70 лет	1 (9%)	56 (27,2%)	28 (13,6%)	3 (2,0%)	45 (30,0%)	10(6,6%)	3 (2,0%)

Клиническая картина COVID-19 принципиально не изменилась при наблюдении за течением болезни во вторую и третью волны пандемии. В таблицах 14 и 15 представлены основные клинические проявления у пациентов разных групп.

Таблица 14. Основные клинические проявления у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести на 1-10 дни болезни, n=206

3	Степень тяжести по ВОЗ		
	Легкая абс. (%)	Средняя абс. (%)	Тяжелая абс. (%)
Температура	(N=11)	(N=147)	(N=48)
37.3 – 38.0	-	48 (33%)	16 (34%)
38.1 – 39.0	2 (29%)	46 (31%)	15 (31%)
39.1-выше	-	9 (6%)	4 (8%)
Снижение сатурации менее 96%	-	(N=147) 115 (78%)	(N=48) 44 (92)
Интоксикационный синдром	(N=11) 11 (100%)	(N=147) 146 (99%)	(N=48) 48 (100%)
Катаральный синдром	(N=11) 4 (36%)	(N=147) 53 (36%)	(N=48) 18 (37,5%)

Кашель	(N=11)	(N=147)	(N=48)
	10 (91%)	138 (94%)	43 (90%)
Сухой	(N=10)	(N=138)	(N=43)
	8 (80%)	110 (80%)	33 (77%)
Влажный	(N=10)	(N=138)	(N=43)
	2 (20%)	28 (20%)	10 (23%)
Диспепсические расстройства	(N=11) 4 (36%)	(N=147) 26 (18%)	(N=48) 4 (8%)
Экзантемы	(N=11) 2 (18%)	(N=147) 2 (1%)	(N=48) 1 (2%)
Аускультативные проявления (наличие хрипов)	(N=11) 2 (18%)	(N=147) 86 (59%)	(N=48) 32 (67%)
Миалгии	(N=11) 3 (27%)	(N=147) 47 (32%)	(N=48) 21 (44%)
Гепатомегалия	-	(N=147) 8 (5%)	(N=48) 4 (8%)
Спленомегалия	(N=11) -	(N=147) 2 (1%)	(N=48) 2 (4%)
Дизосмия	(N=11) 4 (36%)	(N=147) 39 (27%)	(N=48) 11 (23%)
Дисгевзия	(N=11) 3 (27%)	(N=146) 28 (19%)	(N=48) 12 (25%)

Таблица 15. Избранные показатели, характеризующие функцию дыхательной, сердечно-сосудистой систем и лихорадочного синдрома у пациентов различных групп тяжести

Степень тяжести по ВОЗ	Легкая (N = 11)	Средняя (N = 147)	Тяжелая (N = 48)
------------------------	--------------------	----------------------	---------------------

Сатурация, % M±m	96,6±0,6	88,1±5,5	80,4±0,8
ЧСС M±m Средняя (N = 147)	93,4±0,3	90,6±1,9	90,2±0,6
ЧДД M±m Тяжелая (N = 48)	18±0,1	22,9±0,390	24,9±0,5
Температура, °C	37,4±0,2	37,79±0,07	37,84±0,03

Сравнительная оценка клинической картины показала, что у пациентов с легким течением заболевания чаще регистрируются боль в животе (9%) и диарея (36%) в сравнении с пациентами со средним (1% и 18% соответственно) и тяжелым (6% и 8% соответственно) течением заболевания, ($p \leq 0,05$). У больных с легким течением достоверно чаще встречалась диарея ($p \leq 0,05$).

Таблица 16. Результаты исследования периферической крови у пациентов с различной тяжестью течения COVID-19

Исследуемые параметры	n=202, 1-10 дни болезни			n=152, 10-21 дни болезни			
	Легкая степень тяжести, абс (%)	Средняя степень тяжести, абс. (%)	Тяжелое течение, абс. (%)	Легкая степень тяжести, абс. (%)	Средняя степень тяжести, абс. (%)	Тяжелое течение, абс. (%)	Критическое течение, абс. (%)
Пациенты	7 (3%)	147 (72,8%)	48 (23,8%)	8 (5,3%)	112 (73,7%)	25 (16,4%)	7 (4,6%)
Лейкоцитоз	3 (42,9%)	18 (12,3%)	17 (37%)	1 (14,3%)	31 (29,3%)	12 (48%)	6 (85,7%)
Лейкопения	-	17 (11,6)	3 (6,5%)	1 (14,3%)	6 (5,7%)	1 (4%)	-

Лимфопения	4 (57,1%)	56 (38,6%)	33 (73,3%)	3 (42,9%)	38 (36,2%)	13 (52%)	7 (100%)
Лимфоцитоз	-	4 (2,8%)	1 (2,2%)	1 (14,3%)	-	3 (12%)	-
Повышение СРБ	5 (71,4%)	136 (95,1%)	47 (97,9%)	4 (57,1%)	71 (65,1%)	12 (52,2%)	4 (66,7%)
Тромбоцитопения	3 (42,9%)	102 (70,4%)	26 (56,5%)	2 (33,3%)	19 (2,7%)	8 (32%)	5 (71,4%)
Тромбоцитоз	1 (14,3%)	1 (0,7%)	5 (10,9%)	1 (16,7%)	34 (31,8%)	7 (28%)	1 (14,3%)

Оценка гематологических лабораторных показателей (таблица 16) у пациентов с COVID-19 при поступлении (1-10 дни болезни) показала, что наличие лейкоцитоза (коэффициент сопряженности Пирсона 0,372, средняя сила связи, $p \leq 0,05$), лимфопении (коэффициент сопряженности Пирсона 0,401, относительно сильная сила связи, $p \leq 0,05$), тромбоцитоза (коэффициент сопряженности Пирсона 0,343, средняя сила связи, $p \leq 0,05$), а также повышение уровня СРБ (коэффициент сопряженности Пирсона 0,512, сильная сила связи, $p \leq 0,05$) соотносятся с тяжестью течения заболевания. При этом уже в условиях стационара (11-21 дни болезни) у пациентов с тяжелым течением сохраняющаяся лимфопения (коэффициент сопряженности Пирсона 0,872, очень сильная сила связи, $p \leq 0,05$) и тромбоцитопения (коэффициент сопряженности Пирсона 0,430, относительно сильная сила связи, $p \leq 0,05$) являются факторами риска перехода в критическое состояние.

Значения лабораторных показателей пациентов с COVID-19 представлены в таблицах 17 и 18.

Г. Хуанг и соавторы в работе 2020 года показали, что имеется значительная корреляция между повышенным количеством лейкоцитов и

сниженным количеством лимфоцитов у пациентов с тяжелыми случаями COVID-19 по сравнению с пациентами с легкими случаями [14].

Таблица 17. Лабораторные показатели пациентов с COVID-19 различных групп тяжести 1-10 день болезни

Исследуемые параметры	Первая точка исследования (при поступлении), n=202		
	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	Тяжелое течение
Пациенты n (%)	7 (3,5%)	147 (72,8%)	48 (23,8%)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Медиана 9,5 Мин 5,0 Макс 10,7	Медиана 6,2 Мин 1,8 Макс 63,3	Медиана 207 Мин 126 Макс 358
Эритроциты, x10 ¹² /л	Медиана 4,6 Мин 4,1 Макс 5,6	Медиана 4,7 Мин 2,5 Макс 7,1	Медиана 4,6 Мин 2,6 Макс 9,9
Гемоглобин, г/л M±m	148,1 ± 13,3	141,0 ± 17,6	138,8 ± 18,7
Гематокрит, % M±m	44,6 ± 5,4	42,6 ± 5,3	41,6 ± 5,3
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Медиана 207 Мин 126 Макс 358	Медиана 154 Мин 28 Макс 331	Медиана 173 Мин 68 Макс 549
Лимфоциты, %	Медиана 17,5 Мин 8,3 Макс 31,9	Медиана 19,5 Мин 1,3 Макс 93,0	Медиана 14,8 Мин 3,5 Макс 88,0
Моноциты, % M±m	6,2 ± 1,8	8,6 ± 3,8	6,7 ± 2,7

Эозинофилы, %	Медиана 0,6 Мин 0,2 Макс 2,1	Медиана 0,5 Мин 0,0 Макс 5,0	Медиана 0,5 Мин 0,0 Макс 1,1
Базофилы, %	Медиана 0,2 Мин 0,1 Макс 0,5	Медиана 0,2 Мин 0,0 Макс 2,0	Медиана 0,2 Мин 0,0 Макс 2,6
АСТ, Ед/л - 1 день	Медиана 32 Мин 14 Макс 76	Медиана 36 Мин 14 Макс 266	Медиана 42 Мин 7 Макс 177
АЛТ, Ед/л - 1 день	Медиана 24 Мин 9 Макс 64	Медиана 27 Мин 6 Макс 426	Медиана 26 Мин 8 Макс 111
ЩФ, мкмоль/(мин,л) - 1 день	Медиана 64 Мин 29 Макс 112	Медиана 64 Мин 27 Макс 316	Медиана 65 Мин 37 Макс 1057
Билирубин общий, мкмоль/л	Медиана 8 Мин 6 Макс 19	Медиана 10 Мин 3 Макс 219	Медиана 9 Мин 2 Макс 42
Билирубин прямой, мкмоль/л	Медиана 3 Мин 1 Макс 3	Медиана 2 Мин 1 Макс 103	Медиана 2 Мин 1 Макс 24
Креатининкиназа, мкмоль/(мин.л)	Медиана 123 Мин 13 Макс 384	Медиана 145 Мин 11 Макс 1696	Медиана 108 Мин 21 Макс 907
Глюкоза, ммоль/л	Медиана 6,4 Мин 5,2 Макс 10,3	Медиана 7,8 Мин 4,0 Макс 29,8	Медиана 8,9 Мин 4,0 Макс 23,2
Креатинин, мкмоль/л	Медиана 89,0 Мин 47,0 Макс 121,0	Медиана 83,0 Мин 23,3 Макс 27,6	Медиана 84,5 Мин 53,0 Макс 375,0
Мочевина, ммоль/л	Медиана 89,0 Мин 47,0	Медиана 6,5 Мин 2,2	Медиана 6,5 Мин 2,2

	Макс 121,0	Макс 59,0	Макс 59,0
Общий белок, г/л M±m	66,7±25,7	68,3±6,8	65,7±11,0
ЛДГ, ЕД/л	Медиана 198 Мин 126 Макс 340	Медиана 283 Мин 81 Макс 778	Медиана 365 Мин 189 Макс 758
СРБ, мг/л - 1 день	Медиана 89,0 Мин 47,0 Макс 121,0	Медиана 6,5 Мин 2,2 Макс 59,0	Медиана 6,5 Мин 2,2 Макс 59,0
Д-димер	-	Медиана 282 Мин 0 Макс 2522	Медиана 380 Мин 90 Макс 7500
Ферритин	-	Медиана 539 Мин 24 Макс 1500	Медиана 647 Мин 18 Макс 1500
ИЛ-6	Медиана 11 Мин 8 Макс 14	Медиана 16 Мин 2 Макс 801	Медиана 34 Мин 2 Макс 1000

Таблица 18. Лабораторные показатели пациентов с COVID-19 различных групп на 11-21 дни болезни

Исследуемые параметры	Вторая точка исследования (11-21 день болезни), n=152			
	Легкое течение	Средняя степень тяжести	Тяжелое течение	Критическое течение
Пациенты n (%)	8 (5,3%)	112 (73,7%)	25 (16,4%)	7 (4,6%)

Лейкоциты, x10 ⁹ /л	Медиана 7,1 Мин 3,6 Макс 10,6	Медиана 7,3 Мин 1,6 Макс 40,0	Медиана 9,0 Мин 3,7 Макс 24,7	Медиана 12,5 Мин 7,0 Макс 43,8
Эритроциты, x10 ¹² /л	Медиана 4,7 Мин 4,0 Макс 5,0	Медиана 4,6 Мин 2,6 Макс 6,9	Медиана 4,4 Мин 2,8 Макс 5,9	Медиана 4,2 Мин 2,9 Макс 5,5
Гемоглобин, г/л М±m	142,0±9,7	139,1±20,1	136,2±13,5	124,6±19,8
Гематокрит, % - 1 день М±m	41,7±2,6	43,4±20,5	40,2±4,3	37,6±5,5
Тромбоциты, x10 ⁹ /л	Медиана 232 Мин 177 Макс 444	Медиана 272 Мин 53 Макс 571	Медиана 235 Мин 69 Макс 619	Медиана 98 Мин 17 Макс 321
Лимфоциты, %	Медиана 25,1 Мин 11,6 Макс 43,2	Медиана 22,3 Мин 0,4 Макс 83,0	Медиана 16,3 Мин 1,6 Макс 80,0	Медиана 13,0 Мин 10,0 Макс 16,3
Моноциты, % М±m	7,6±2,6	6,8±3,3	6,4±3,2	4,8±1,9
Эозинофилы , %	Медиана 1,9 Мин 0,8 Макс 4,3	Медиана 1,0 Мин 0,0 Макс 5,4	Медиана 1,0 Мин 0,0 Макс 4,3	Медиана 0,0 Мин 0,0 Макс 1,4
Базофилы, %	Медиана 1,1 Мин 0,5 Макс 4,9	Медиана 0,7 Мин 0,0 Макс 4,2	Медиана 0,7 Мин 0,0 Макс 1,3	Медиана 0,0 Мин 0,0 Макс 0,7
АСТ, Ед/л	Медиана 28 Мин 21 Макс 43	Медиана 40 Мин 12 Макс 189	Медиана 33 Мин 15 Макс 119	Медиана 232 Мин 177 Макс 444
АЛТ, Ед/л	Медиана 37 Мин 13	Медиана 51 Мин 7	Медиана 77 Мин 13	Медиана 53 Мин 21

	Макс 46	Макс 447	Макс 242	Макс 111
Билирубин общий, мкмоль/л	Медиана 8 Мин 5 Макс 11	Медиана 9 Мин 4 Макс 34	Медиана 11 Мин 1 Макс 26	Медиана 13 Мин 10 Макс 38
Билирубин прямой, мкмоль/л	Медиана 2 Мин 1 Макс 3	Медиана 2 Мин 1 Макс 31	Медиана 2 Мин 1 Макс 13	Медиана 3 Мин 1 Макс 13
Креатининки наза, мкмоль/(мин .л)	-	Медиана 77 Мин 17 Макс 238	Медиана 68 Мин 45 Макс 341	Медиана 465 Мин 71 Макс 732
Глюкоза, ммоль/л	Медиана 6,9 Мин 5,2 Макс 8,2	Медиана 6,0 Мин 4,1 Макс 23,0	Медиана 6,6 Мин 3,9 Макс 23,0	Медиана 6,3 Мин 4,5 Макс 15,4
Креатинин, мкмоль/л	Медиана 74,0 Мин 43,0 Макс 106,0	Медиана 77,0 Мин 12,3 Макс 238,0	Медиана 68,0 Мин 45,0 Макс 341,0	Медиана 465,5 Мин 71,0 Макс 732,0
Мочевина, ммоль/л	Медиана 6,7 Мин 3,2 Макс 14,3	Медиана 7,0 Мин 1,6 Макс 18,6	Медиана 7,4 Мин 3,4 Макс 30,8	Медиана 41,5 Мин 10,3 Макс 58,6
Общий белок, г/л M±m	60,7 ± 6,8	60,8±6,4	52,6±14,2	52,7±7,9
ЛДГ, ЕД/л	-	Медиана 308 Мин 106 Макс 73	Медиана 345 Мин 219 Макс 861	Медиана 599 Мин 261 Макс 717
СРБ, мг/л	Медиана 1,0 Мин 0,0 Макс 38,0	Медиана 8,0 Мин 0,0 Макс 164,0	Медиана 7,0 Мин 0,0 Макс 130,0	Медиана 8,0 Мин 1,0 Макс 298,0

Д-димер, мг/л	-	Медиана 278 Мин 0 Макс 3846	Медиана 345 Мин 219 Макс 861	Медиана 6130 Мин 2379 Макс 7260
Ферритин, мкг/л	Медиана 541 Мин 260 Макс 669	Медиана 567 Мин 95 Макс 1655	Медиана 697 Мин 100 Макс 1500	Медиана 945 Мин 207 Макс 1500
ИЛ-6 пг/мл	-	-	-	Медиана 800 Мин 371 Макс 1000

Отдельно был проведён анализ динамики изменения уровня лимфоцитов в зависимости от тяжести с помощью критерия Стьюдента. Результаты представлены на рисунке 14.

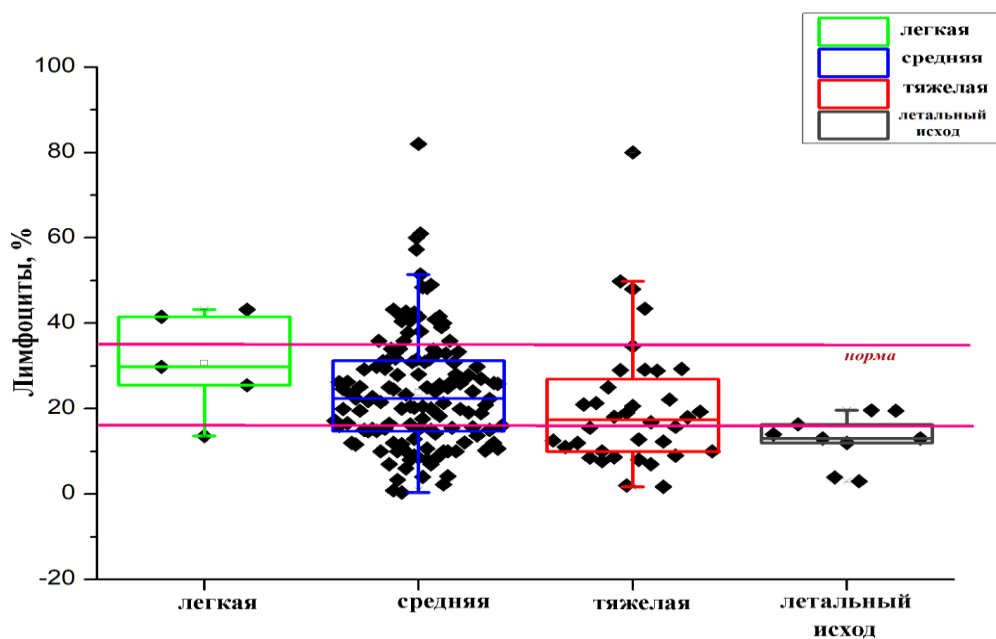


Рисунок 14. Связь степени тяжести с уровнем лимфоцитов у пациентов с COVID-19.

Таким образом нами отмечено, что чем сильнее тяжесть заболевания, тем ниже процентное содержание лимфоцитов. У пациентов с летальным исходом отмечалась выраженная лимфопения ($p < 0,01$) на 11-21 день болезни.

Одним из лабораторных критериев тяжести являлся уровень СРБ: у тяжелых пациентов на 1-10 день болезни показатель СРБ в 1,5 превышал таковой в сравнении с пациентами других групп ($p < 0,01$); в группе пациентов с критическим течением заболевания уровень СРБ на 11-21 день болезни достигал 298 мл/л.

По полученным нами данным, в группе пациентов с критическим течением на 11-21 день болезни уровни показателя Д-димера и ферритина были значительно выше, чем в других группах ($p \leq 0,05$).

Также был проведен анализ наличия сопутствующей патологии у пациентов с COVID-19 различных групп тяжести при поступлении. В группе пациентов с легким течением болезни 4 (36%) человека имело ГБ, ССЗ – 3 (27%) пациента, новообразование в активной форме – 1 (9%) человек. В группе пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 ГБ страдали 112 (76%) пациентов, ССЗ – 59 пациентов (40%), СД 2 типа – 39 пациентов (26%), хронические заболевания легких встречались у 16 пациентов (11%), хроническими заболеваниями ЖКТ страдали 30 пациентов (20%), хронические заболевания почек встречались у 18 человек (12%), БА – 8 пациентов (5%), новообразования в активной форме – 12 пациентов (8%). В группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 ГБ в анамнезе встречалась у 44 (92%) пациентов, ССЗ страдали 29 пациентов (60%), СД 2 типа – 14 пациентов (30%), хронические заболевания легких встречались у 7 пациентов (15%), хронические заболевания ЖКТ у 10 пациентов (21%) данной группы, хронические заболевания почек имели место у 11 человек (23%), БА – 3 пациентов (6%), новообразования в активной форме у 7 пациентов (15%).

Структура коморбидной патологии у пациентов разных групп тяжести представлена на рисунке 15.

19

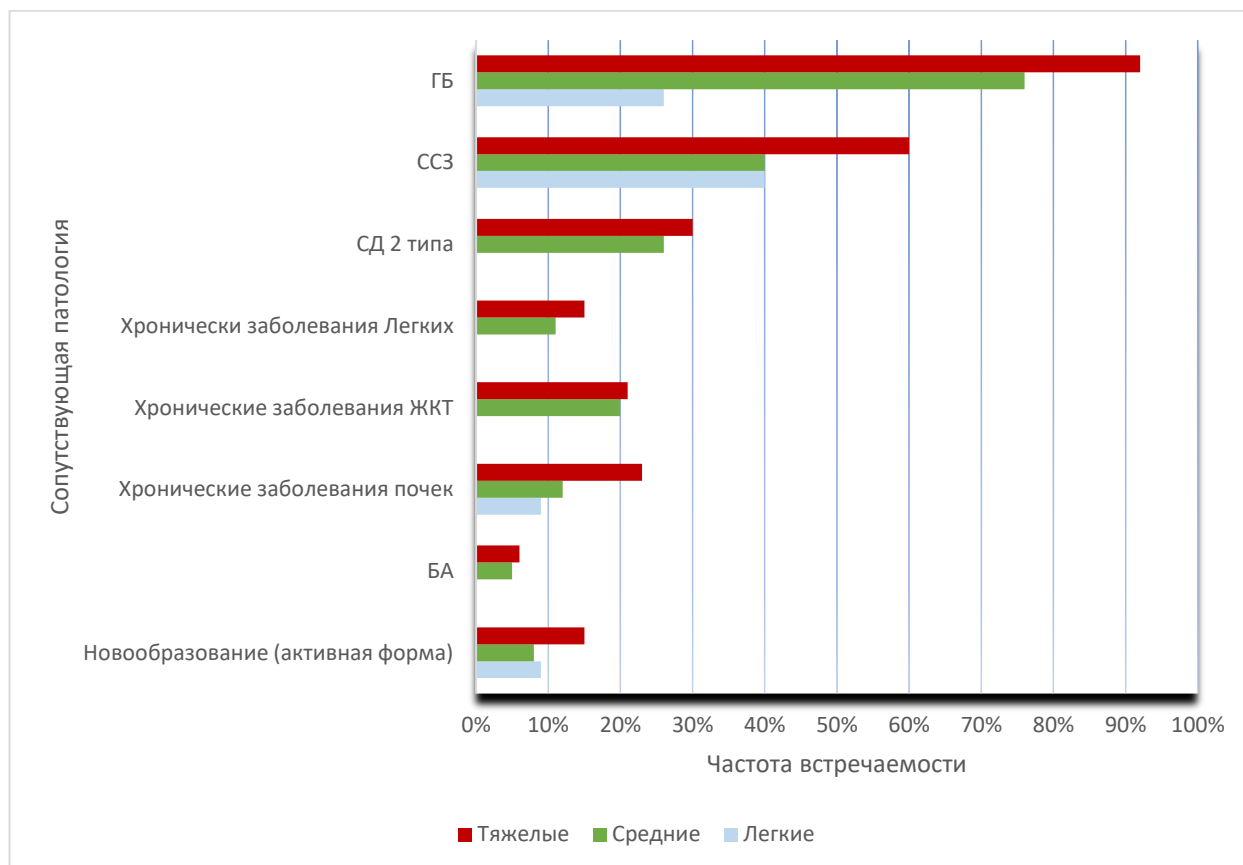


Рисунок 15. Характеристика сопутствующей патологии у пациентов с COVID

ССЗ включают: ИБС Постоянная форма фибрилляций предсердий, ИБС, ПИКС, Ишемическая кардиомиопатия, ИБС атеросклероз, ИБС Стенокардия ИБС АСКС, ИБС АВ блокада, ХСН, ХГИМ, Открытое овальное окно, Проплапс митрального клапана. *Хронические заболевания легких включают:* ХОБЛ, Хронический бронхит, Туберкулез, Гидроторакс. *Хронические заболевания ЖКТ включают:* ГЭРБ, Хронический гастродуоденит, ЖКБ, Хронический панкреатит, Язвенная болезнь ДПК, Полипоз толстой кишки, ЖКБ, Хронический калькулезный холецистит, Хронический гастрит. *Хронические заболевания почек включают:* ХБП, Хронический пиелонефрит, Киста почки,

Хронический цистит, Нефропатия смешанного генеза (гипертонического, диабетического), мочекаменная болезнь, Хронический цистит. *Новообразования (активная форма) включают:* неоплазма 12-перстной кишки, РМЖ, злокачественное новообразование уха и наружного слухового прохода, новообразование легкого, аденома предстательной железы, рак кожи, рак матки, злокачественное новообразование головного мозга, рак щитовидной железы, полипы сигмовидной и прямой кишки.

Анализ полученных данных позволяет рассматривать некоторые коморбидные заболевания в качестве факторов риска тяжелого течения COVID-19. По нашим данным, такие сопутствующие патологии как: ГБ (коэффициент Пирсона составляет 0,684, сильная связь, $p \leq 0,05$), ССЗ (коэффициент Пирсона составляет 0,355, средняя сила связи, $p \leq 0,05$), СД2 (коэффициент Пирсона составляет 0,258, средняя сила связи, $p \leq 0,05$) коррелировали с отягощением состояния пациентов, что соотносится с данными международных исследований. К примеру, Фелпс и коллеги показали, что в датской когорте пациентов с COVID-19 в возрасте старше 40 лет наблюдалось лишь умеренное влияние сердечно-сосудистых заболеваний [144]. В то же время Баррон с коллегами в своем исследовании подобных пациентов в Великобритании продемонстрировали, что диабет 1-го и 2-го типа были независимо связаны со значительным увеличением вероятности внутрибольничной смерти от COVID-19 [145]. Вместе с тем, ГБ является одним из наиболее частых сопутствующих заболеваний при COVID-19, и в целом у пациентов с ССЗ повышен риск тяжелого течения заболевания и его осложнений [146].

На рисунке 16 представлена частота встречаемости ряда клинических симптомов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей патологии.

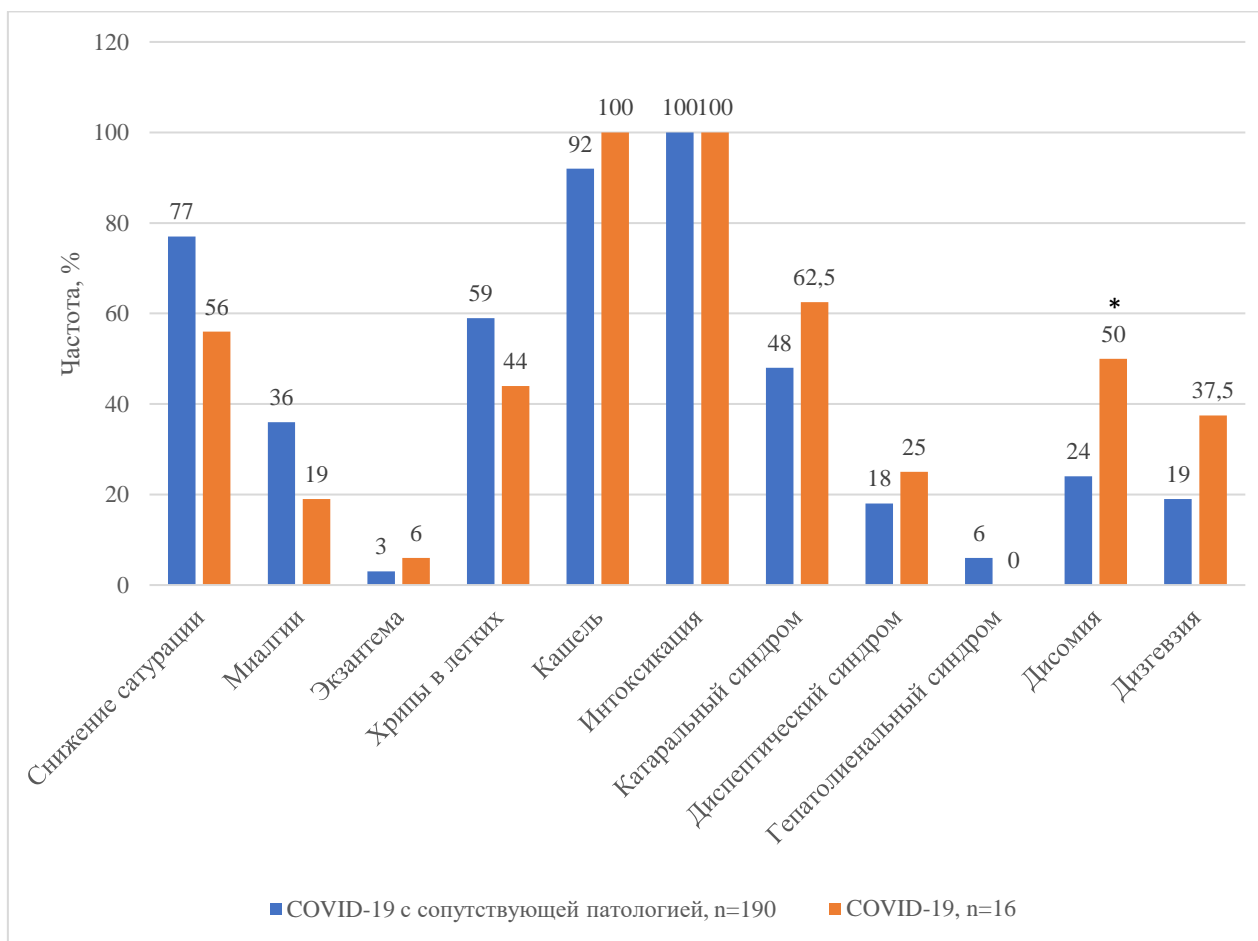


Рисунок 16. Частота различных клинических проявлений COVID-19 в зависимости от наличия сопутствующей патологии

Анализ представленных данных показал, что нарушение обоняния чаще встречается у пациентов с COVID-19 без сопутствующей патологии ($p \leq 0,05$).

Из 206 пациентов при поступлении изменения на КТ наблюдались у 190 пациентов, что составляет 92,2%. Данные по КТ ОГК представлены в таблице 19.

Таблица 19. КТ ОГК пациентов с COVID-19 динамике

	Среднетяжелое n=142	Тяжелое n=53	Критическое n=0	P (различия статистически значимы (p<0,05))
1-10 дни от начала симптомов, n = 190 (среднетяжелые и тяжелые)				
КТ 1	54 (37,8%)	7 (14,9%)	-	0,004* (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)
КТ 2	74 (51,7%)	21 (44,7%)	-	0,401 (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)
КТ 3	13 (9,1%)	16 (34,0%)	-	<0,001* (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)
КТ 4	1 (0,7%)	2 (4,3%)	-	0,090 (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини Хохберга)
11-21 дни от начала симптомов, 2 точка КТ, известна тяжесть и результаты КТ для n = 110 среднетяжелых, тяжелых и критических пациентов				
	Среднетяжелое n=65	Тяжелое n=17	Критическое n=0	P (сравнение только среднетяжелых с тяжелыми)
КТ 1	21 (32,3%)	2 (11,8%)	-	0,093 (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)
КТ 2	30 (46,2%)	5 (29,4%)	-	0,214 (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность

				Бенджамини–Хохберга)
КТ 3	12 (18,5%)	7 (41,2%)	1 (50,0%)	0,048* (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)
КТ 4	2 (3,1%)	3 (17,6%)	1 (50,0%)	0,025* (критерий хи-квадрат с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга)

* различия статистически значимы ($p < 0,05$)

В начале пандемии согласно Временным методическим рекомендациям (версии 7, 8) всем стационарным пациентам проводилось КТ органов грудной клетки для подтверждения или исключения поражений легких. Сравнительный анализ поражения легких в группах среднетяжелого (9,1%) и тяжелого течения (34,0%) показал, что достоверно ($< 0,001$) чаще КТ 3 встречалась в группе тяжелого течения.

Характеристика пациентов с COVID-19, находившихся на лечении в ОРИТ

Из 206 пациентов с COVID-19, поступивших в стационар в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г., в отделении ОРИТ находилось 19 (9,2%) пациентов, из которых 13 (6,3%) имели летальный исход. Все пациенты были госпитализированы на 6 ± 2 день болезни. Средний возраст пациентов составил 74 ± 14 лет. Пациентов женского пола было 13 человек (68%), мужского 6 (32%). Все пациенты имели сочетанную коморбидную патологию. Структура сопутствующих заболеваний представлена на рисунке 17.

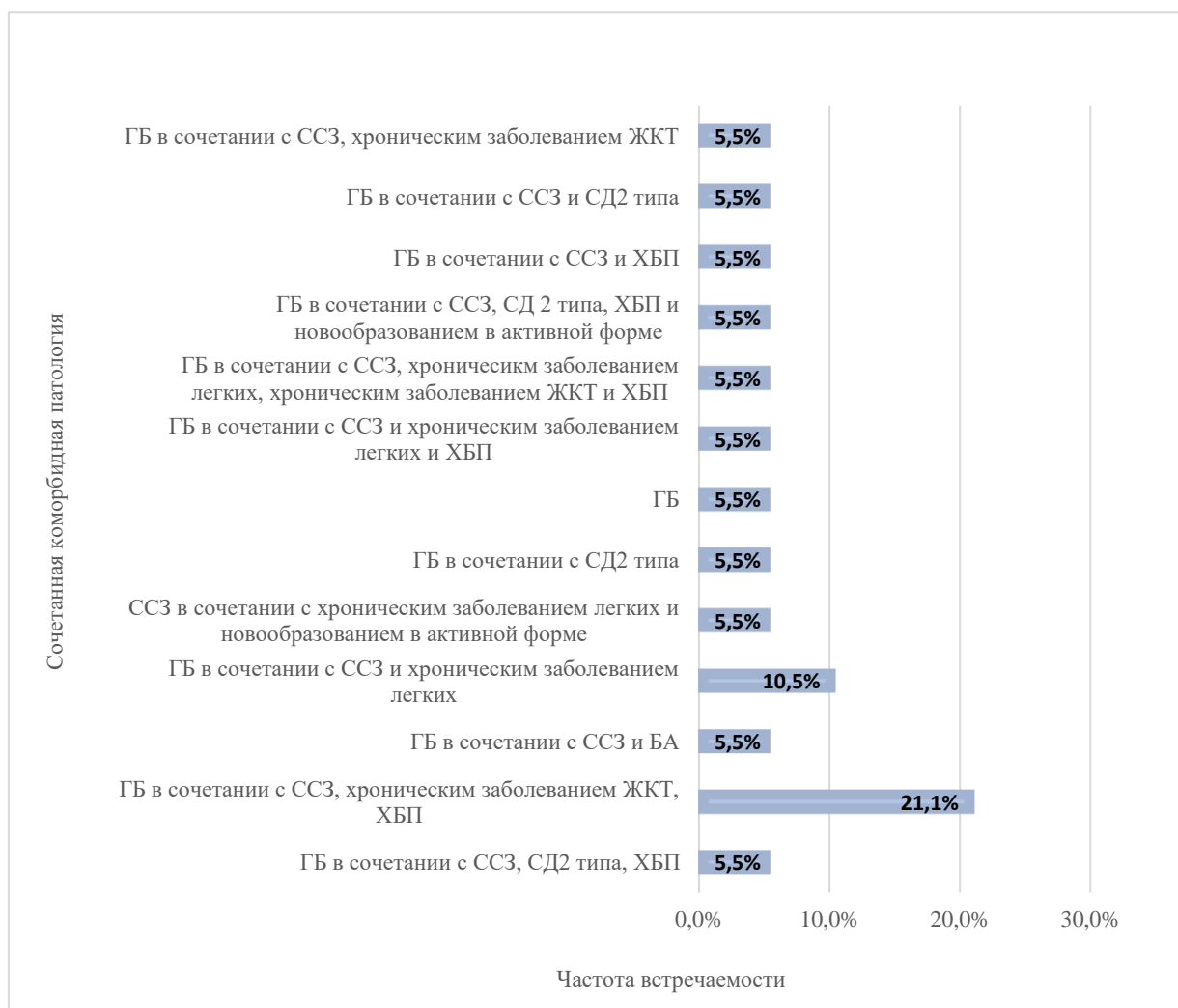


Рисунок 17. Коморбидный фон у пациентов COVID-19, госпитализированных в ОРИТ (n=19)

При статистическом анализе взаимосвязи сопутствующей патологии и тяжести выявлено: ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания (относительно сильная взаимосвязь, коэффициент сопряженности Пирсона 0,467), ХБП — хроническая болезнь почек (средняя взаимосвязь, коэффициент сопряженности Пирсона 0,256) и ЦВБ — цереброваскулярная болезнь (средняя взаимосвязь коэффициент сопряженности Пирсона 0,265) являются значимыми факторами риска, ассоциированными с тяжелым течением

заболевания. ГБ — гипертоническая болезнь (коэффициент Пирсона составляет 0,684, сильная связь), ССЗ (коэффициент Пирсона составляет 0,355, средняя сила связи), СД2 (коэффициент Пирсона составляет 0,258, средняя сила связи) влияли на тяжесть течения COVID-19 ($p < 0,05$) [6]. У пациентов с легким течением COVID-19 на 1-10 дни заболевания чаще встречаются боль в животе и диарея ($p = 0,05$).

На рисунке 18 представлена структура летальных исходов пациентов ОРИТ. Наиболее частой причиной летального исхода являлся острый синдром респираторного расстройства (ОРДС — 61,5%), значимый фактор — коагулопатия в исходе ТЭЛА (30,7%).

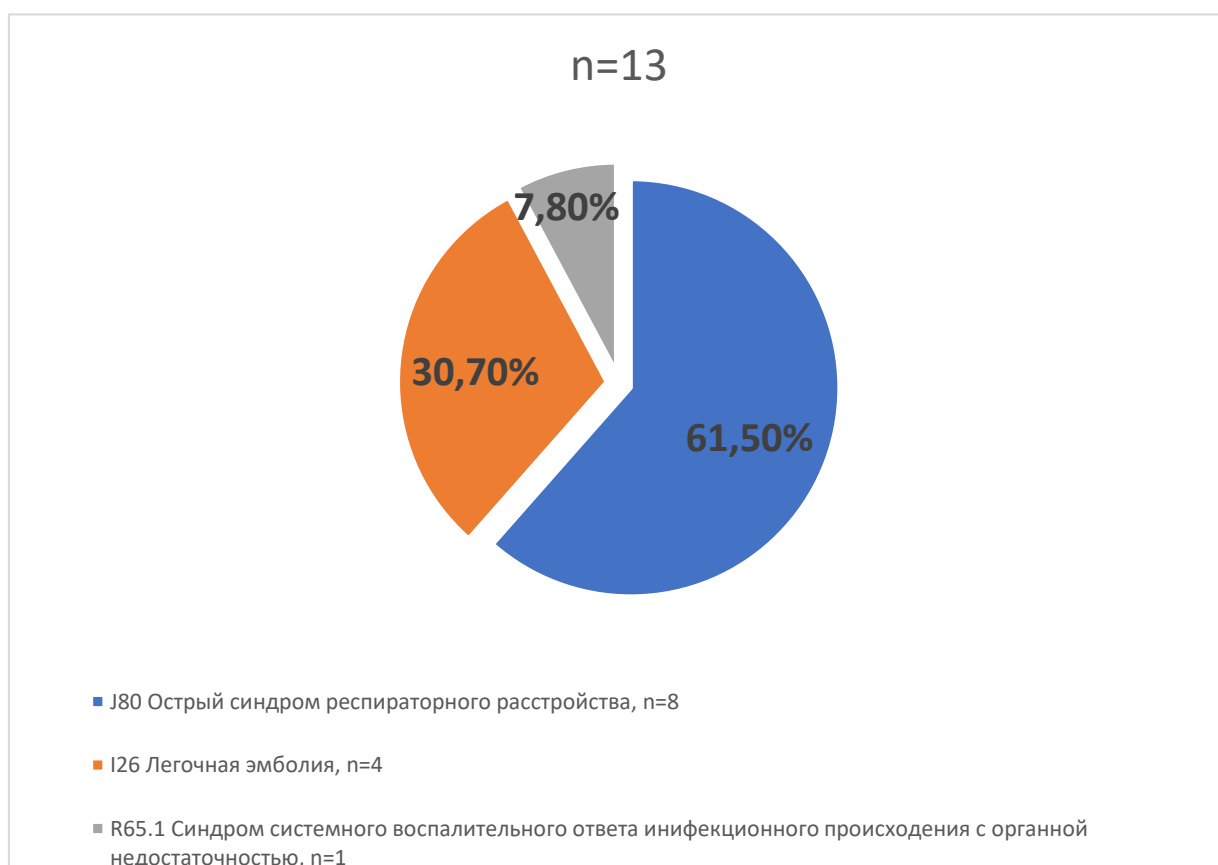


Рисунок 18. Структура летальных исходов пациентов ОРИТ

Терапия в данной группе проводилась согласно Временным методическим рекомендациям, Версия 8 (03.09.2020) [147]. Терапия данной категории пациентов включала: этиотропные препараты (фавипиравир, гидроксихлорохин, азитромицин в сочетании с гидроксихлорохином, интерферон-альфа, ремдесивир и умифеновир). Патогенетическая терапия, к которой относятся группы препаратов на основе моноклональных антител, ингибирующих рецепторы ИЛ-6 (левилимаб, тоцилизумаб, сарилумаб), моноклональные антитела, являющиеся антагонистами ИЛ-6 (олокизумаб), моноклональные антитела — ингибиторы рецепторов ИЛ-1 β (канкинумаб); ингибиторы JAK1 и JAK2 киназ (барицитиниб, тофацитиниб), гормональные препараты (метилпреднизолон, дексаметазон). Также проводилась антикоагулянтная терапия (нефракционированный гепарин, эноксапарин натрия), антибиотикотерапия. При развитии у пациента выраженной дыхательной недостаточности и гипоксемии, помимо медикаментозной терапии, была предписана кислородная поддержка при падении показателя SpO₂ менее 92% через лицевую маску или назальные канюли при самостоятельном дыхании потоком до 15 литров в минуту. При сохранении уровня гипоксемии рекомендовалась прона-позиция (укладывание пациента на живот) с высокопоточной оксигенацией (ВПО) потоком 30-60 литров в минуту. При неэффективности данных мер пациентов переводили на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) и/или экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО). При необходимости в условия ОРИТ проводились ЭКМО и ИВЛ.

3.3. Клиническая характеристика реконвалесцентов COVID-19, находившихся под наблюдением с ноября 2020 г. по сентябрь 2021 г.

Нами было проанализировано 21 переболевших COVID-19 и выписанных из стационара №1 ИКБ ДЗМ. Целью включения группы

реконвалесцентов в наблюдения была оценка клинических симптомов и синдромов, их продолжительности, а также исследования некоторых параметров гуморального ответа у этой группы пациентов. Все реконвалесценты находились под нашим наблюдением в период с ноября 2020 г. по сентябрь 2021 г. Наблюдение осуществлялось в динамике начиная с 118 до 155 дней (в среднем $134,5 \pm 6,5$ дня с момента заболевания). Средний возраст наблюдаемых пациентов составил $55,8 \pm 2,1$ года, с небольшим преимуществом мужчин ($n=11$, 52,4%). Пациенты были разделены на две группы по возрасту: группа 38-49 лет и группа 53+ лет. Средний возраст в первой группе составил $42,5 \pm 1,8$ года, а во второй — $61,1 \pm 1,3$ года. Гендерных различий в распределении в этих группах не наблюдалось ($p=1,000$ точный тест Фишера), в первой группе мужчин было 3 (50,0%), а во второй — 8 (53,3%). Анализ основных клинических проявлений в группах реконвалесцентов был проведен на основании динамического наблюдения и осмотра 21 реконвалесцента, с согласия наблюдаемых (пациентами подписан лист информированного согласия). Наиболее частыми постковидными проявлениями в обеих группах были: астено-вегетативные, депрессивные состояния, а также системные проявления (миалгии, артралгии, конъюнктивиты).

Ряд исследователей проводил аналогичные наблюдения [153, 166] и анализ клинических проявлений постковидного синдрома. Так, около 15% пациентов, которые перенесли COVID-19, отмечали неудовлетворительное самочувствие и ощущение неполноценного выздоровления на протяжении от 20 дней до 3 месяцев и более. Симптомы, выявленные у пациентов после острой инфекции, полиморфны и включают: гипертермию, боль, утомляемость; изменения со стороны дыхательной системы (кашель, одышка) и со стороны сердечно-сосудистой системы (сдавливание и боль в грудной клетке, сердцебиение); неврологические и психиатрические изменения

(нейрокогнитивные расстройства, описываемые пациентами как «мозговой туман», нарушение концентрации внимания и памяти, головные боли, нарушения сна, симптомы периферической нейропатии – покалывание и онемение, головокружение, делирий у пожилых); со стороны желудочно-кишечного тракта (боль в животе, тошнота, диарея, нарушения аппетита, включая анорексию), со стороны опорно-двигательного аппарата (боль в мышцах, суставах), психиатрические явления (депрессия, тревога), со стороны органов чувств и глотки (боль в ушах, шум в ушах, нарушения восприятия запаха и вкуса, боль в горле), кожные (сыпь). Причина продолжительно сохраняющихся симптомов мало изучена, но, вероятно, связана с различными патофизиологическими механизмами, в том числе с развитием васкулита [24].

Таблица 20. Частота постковидных проявлений в наблюдаемых группах реконвалесцентов

	Группа 38-49 лет, n=6		Группа 53+ лет, n=15		P (точный тест Фишера), достоверно при $p < 0,05$
	Абс	%	Абс	%	
Аритмии	1	17%	7	46%	0,3359
Одышка при физической нагрузке	1	17%	9	60%	0,1486
Потеря веса	1	17%	0	0	0,2857
Системные проявления	3	50%	14	93%	0,053
Выпадение волос	2	33%	4	26%	1,000
Когнитивные нарушения	2	33%	4	26%	1,000
Расстройства ЖКТ	2	33%	4	26%	1,000
Астено-вегетативный синдром	4	67%	12	80%	0,598
Депрессивные состояния	4	67%	10	66%	1,000
Снижение слуха	0	0	2	13%	1,000

Снижение остроты зрения	0	0	3	20%	0,526
Дисгевзия	0	0	4	26%	0,281
Дизосмия	0	0	5	33%	0,262

В данном исследовании не удалось проследить статистически значимых различий в частоте возникновения осложнений после выздоровления в различных возрастных когортах, однако была отмечена тенденция к увеличению частоты системных проявлений среди пациентов группы 53+ ($p=0,053$). В группе пациентов 38-49 лет системные проявления наблюдались у 3 человек (50%), а в группе «53+» — у 14 (93%).

3.4. Описание клинического случая тяжелого течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Под нашим наблюдением находился пациент N, 57 лет, который поступил в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» на 3 день болезни по экстренным показаниям с жалобами на резко нарастающую одышку, сухой кашель, чувство нехватки воздуха, длительное повышение температуры до 39°C за два дня до госпитализации.

Эпидемиологический анамнез: в течение последних 14 дней контактировал с больными COVID-19. За два дня до госпитализации была госпитализирована жена пациента с диагнозом COVID-19.

Перенесенные заболевания: в анамнезе артериальная гипертензия, обусловленная метаболическим синдромом; однако за последний год пациент прошел диетотерапию и добился снижения веса на 25 кг. Табакокурение с 18 лет, большие физические нагрузки (спортивная борьба, подъем тяжелых снарядов).

Анамнез заболевания: заболел остро, 17.05.2021 года, появились незначительные катаральные явления, температура субфебрильная. Лечился самостоятельно, сухой кашель усиливался, нарастали явления интоксикации, лихорадка фебрильная. Самостоятельно принимал антибактериальные лекарственные средства, гормональные препараты. 19.05.2021 состояние пациента ухудшилось, отмечался выраженный цианоз, одышка усилилась, сатурация до 88%, 19.05.2021 в связи с нарастающей дыхательной недостаточностью был госпитализирован в I ИКБ ДЗМ.

При поступлении состояние было расценено как тяжёлое за счёт наличия синдрома дыхательной недостаточности. Объективные данные: сознание ясное, ориентирован во времени и пространстве; при этом отмечаются ажитация и беспокойство. Дыхание самостоятельное. Сатурация кислорода на атмосферном воздухе 75%, ЧДД 28 в мин. Аускультативно: ослабленное дыхание по всей легочной поверхности с обеих сторон. ССС: АД 112/66 мм.рт.ст., пульс 84 удара в минуту, дефицита пульса не выявлено. Физиологические отправления в норме. Менингеальные знаки отсутствуют. Другие данные объективного обследования без патологических особенностей.

Учитывая тяжесть состояния, выраженную дыхательную недостаточность, пациент из приемного отделения был направлен в ОРИТ. Где на фоне ВПО (55л/мин) был компенсирован, показатель сатурации — 94%. ЧДД — 22 в мин.

Приводим результаты обследования.

На момент поступления результат КТ ОГК: двусторонняя интерстициальная пневмония с высокой степенью вероятности COVID-19. По всем полям обоих легких многочисленные зоны снижения прозрачности

по типу матового стекла. КТ 3-4. Воздушные буллы верхних долей обеих легких.

В динамике на 13 день болезни наблюдалось резкое ухудшение состояния. Произведена интубация трахеи, пациент переведен на ИВЛ. При проведении рентгенографии органов грудной клетки были выявлены признаки напряженного правостороннего пневмоторакса. В связи с развившимся осложнением была проведена правосторонняя плевральная пункция с плевроаспирацией. Повторная рентгенография ОГК показала локальный пневмоторакс на уровне вершины правого легкого, с расправлением правого легкого. Проведенная бронхоскопия на 15 день болезни выявила наличие состоявшегося кровотечения из верхних долей правого и левого легкого. Двусторонний катаральный эндобронхит.

Исследование мазка из ротоглотки на вирус SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР показало положительный результат.

В динамике общий анализ крови характеризовался нарастанием лейкоцитоза (с 9,1 до 15,5x10⁹/л, развитием стойкого нейтрофиллеза до 85,3%. В биохимическом анализе крови определялось повышение ферментов АЛТ (92–121 ЕД/л), АСТ (53–58 ЕД/л); ЛДГ (526–743 ЕД/л). В то время как показатель уровня ферритина с тенденцией к снижению (1451–722 нг/мл). Сохранялся повышенный уровень Д-димера с тенденцией к росту (266–2395 нг/мл).

На ЭКГ (15 день болезни): синусовая тахикардия ЧСС 86 ударов в мин. Отклонение ЭОС влево. Неполная блокада правой ветви левой ножки пучка Гисса. Изменения нижне-боковой стенки ЛЖ. Признаки электрической активности ЛЖ.

КТ ОГК (8 день болезни). КТ-картина течения двусторонней интерстициальной пневмонии, признаки артериальной легочной

гипертензии. (Высокая вероятность COVID-19, КТ 3-4). Воздушные буллы верхних долей обеих легких. (Рисунок 19).

Лечение.

Противовирусная терапия: на 3-й день болезни (1-й день пребывания в стационаре) — фавипиравир 1600 мг 2 раза в сутки с 4-го по 10-й день болезни (2–8-й дни пребывания в стационаре); ремдесивир 200 мг в/в капельно). Антибактериальная терапия: с 3-го по 7-й день болезни цефепим + сульбактам 1000мг+1000мг в/в капельно 2 раза в сутки. С 8-го по 12-й дни болезни линезолид 2 мг/мл в/в 2 раза в сутки, меропенем 1 г в/в 3 раза в сутки. С 13-го по 15-й дни болезни ципрофлоксацин 2 мг в/в 2 раза в сутки. На 4-й день болезни (2-й день госпитализации) был применен ингибитор ИЛ-6 Тоцилизумаб однократно в/в капельно в дозе 400 мг. Пациенту проводилась антикоагулянтная, кортикостероидная терапия весь период пребывания в стационаре. С 3-го по 6-й день болезни ингаляционно был введен сурфактант в дозе 75 мг 3 раза в сутки. С 5-го по 15-й день болезни производилась медикаментозная седация. Находился на ВПО 55 л/мин с 1-го по 13-й день болезни. С 13-го по 15-й дни болезни переведен на ИВЛ в режиме ВІРАР. Верхнее давление (давление вдоха): 21 тбар. Время принудительного вдоха: 1,2 с. Частота принудительных вдохов: 18 1/мин. Нижнее давление (РЕЕР): 5 тбар. Уровень давления поддержки (PS, ASB): 14 тбар. МОД: 7,9 л/мин. Оперативные вмешательства: произведена плевральная пункция с правой стороны на 13-й день болезни.

Несмотря на проводимую терапию состояние больного прогрессивно ухудшалось. Нарастали явления дыхательной недостаточности, по аускультативным и рентгенологическим признакам прогрессировала пневмония, развивался пневмоторакс. Продолжающаяся терапия в сочетании с ИВЛ не принесла выраженного терапевтического эффекта.

Учитывая развитие спонтанного пневмоторакса, пациент был переведен в стационар с наличием круглосуточной хирургической службы.

Заключительный диагноз.

Основной диагноз: U07.1 Коронавирусная инфекция, COVID-19 вирус идентифицирован, тяжелое течение.

Осложнения: J12.8 Внебольничная двусторонняя интерстициальная пневмония (КТ 3-4) J96.0 Острая респираторная недостаточность. J93.0 Спонтанный пневмоторакс. Состояние после дренирования плевральной полости. I74.8 Тромбоэмболия ветвей легочной артерии?

Сопутствующие заболевания: K25.7 Язвенная болезнь желудка вне обострения. Бронхоэктатическая болезнь (верхушек легких)

Приведенный клинический случай является примером тяжелого течения COVID-19, с высокой вероятностью обусловленного поздней госпитализацией, отсутствием своевременной и полноценной терапии, в том числе и оксигенотерапии, а также коморбидностью, ассоциированной с бронхоэктатической болезнью обоих легких.

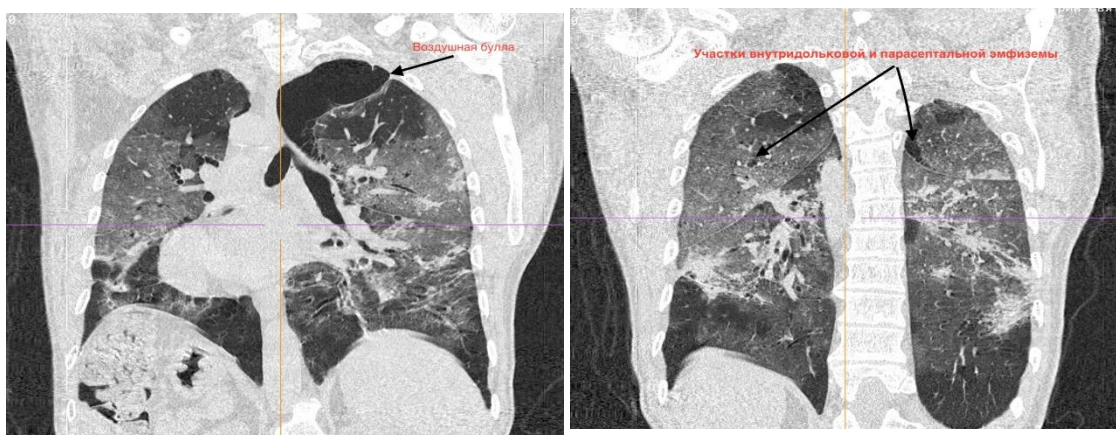


Рисунок 19. КТ-картина течения двусторонней интерстициальной пневмонии, признаки артериальной легочной гипертензии. (Высокая вероятность COVID-19, КТ 3-4). Воздушные буллы верхних долей обоих легких.

Приведенный клинический пример демонстрирует важность своевременной и адекватной терапии пациентов с сопутствующей патологией с целью предупреждения развития различных осложнений (в данном случае такого редкого, как спонтанный пневмоторакс). В дополнение к этому клиницисты должны контролировать активность и адекватность реабилитационных мероприятий у такой категории пациентов.

Проведенный анализ собственных клинических наблюдений стационарных пациентов с новой коронавирусной инфекцией, госпитализированных в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г., позволил выделить ведущие клинические симптомы COVID-19. Клиническая картина заболевания у стационарных пациентов отличалась полиморфизмом проявлений. Наиболее частыми симптомами/синдромами были: интоксикация, одышка, затруднение дыхания, кашель, миалгии, диспептические проявления, реже развивалась anosmia, дизгевзия, экзантемы. Поражение ЖКТ с развитием диспепсического синдрома коррелирует с легким течением болезни. Доказана ассоциация тяжелого течения COVID-19 у пациентов в возрасте 65+ со следующими коморбидными состояниями: сердечно-сосудистыми заболеваниями, хроническими заболеваниями почек, цереброваскулярной болезнью. Наблюдения за реконвалесцентами COVID-19 показали, что частыми постковидными проявлениями были: астено-вегетативные, депрессивные состояния, а также системные проявления (миалгии, артралгии, конъюнктивиты).

Глава 4. Оценка гуморального ответа у стационарных пациентов с COVID-19

Известно, что вирус SARS-CoV-2 имеет четыре основных структурных белка: спайковый белок (S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (Nc). При заболевании наиболее выраженный антительный ответ вырабатывается как к нуклеокапсидному (N), так и к спайковому (S) белку коронавируса. Как правило выявление IgM и IgA к спайковому (S) белку свидетельствует о недавнем инфицировании вирусом SARS-CoV-2, подтверждая наличие раннего иммунного ответа к COVID-19 после встречи с вирусом. Считается, что IgM чаще обнаруживаются в крови на 5-7-й день появления симптомов, достигают пика через неделю и могут сохраняться в течение 2 и более месяцев. IgA антитела экспрессируются с 11 дня болезни, достигают максимума через 3-4 недели и снижаются к 1,5-2 месяцам после заражения [4]. Примерно с 3-й недели или ранее определяются специфические антитела класса G к SARS-CoV-2, которые достигают максимального уровня на 6-7-й неделе после начала заболевания и затем медленно снижаются, однако остаются высокими на протяжении нескольких месяцев, выполняя защитную функцию от инфекции [7,9]. Наличие уровня антител IgG к нуклеокапсидному белку Nc и рецептор-связывающему домену RBD S-белка также свидетельствует о наличии или перенесённой ранее инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, что служит общепризнанным способом оценки постинфекционного иммунитета. Однако вопрос о продолжительности данного иммунитета и насколько он защищает переболевших от повторного заболевания до настоящего времени недостаточно изучен.

Учитывая особенности формирования гуморального иммунитета, в данном разделе диссертационной работы проведён анализ эффективности применения иммуноферментного анализа (ИФА) при определении спектра

иммуноглобулинов классов М, А и G к основным структурным белкам коронавируса SARS-CoV-2 в динамике заболевания в зависимости от тяжести болезни у стационарных пациентов с лабораторно подтверждённым диагнозом COVID-19 для обоснования алгоритма обследования больных и прогнозирования течения заболевания.

Для подтверждения диагноза новой коронавирусной инфекции применяли метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), направленный на обнаружение специфических фрагментов вирусной РНК SARS-CoV-2 при исследовании мазков из носа и ротоглотки. Предварительно для оценки результативности ОТ-ПЦР была обследована группа из 206 пациентов, в т.ч. с лёгким течением 11 чел. ($5,0 \pm 1,5$ %), со среднетяжелым течением 147 чел. ($68,1 \pm 10,1$ %) и с тяжёлым течением 48 чел. ($22,2 \pm 2,8$ %). На 1-10-й день болезни методом ПЦР диагноз подтвержден в $64,3 \pm 3,3$ %, на 11-21-й день от начала симптомов РНК вируса выявлена у $25,5 \pm 0,3$ % ($p \leq 0,05$). Вирусная нагрузка была выше с 11-го по 21-й дни заболевания по сравнению с предыдущим периодом ($6,66E+02 \pm 2,17E+02$ и $4,90E+06 \pm 2,99E+06$ соответственно, $p \leq 0,05$).

4.1. Определение иммуноглобулинов классов М и А к S-белку SARS-CoV-2 у пациентов различных групп тяжести с COVID-19 методом ИФА в динамике заболевания

Для оценки динамики формирования иммунного ответа у пациентов с лабораторно подтверждённым методом ОТ-ПЦР диагнозом COVID-19 проведено определение процента положительных результатов по наличию совокупных специфических IgM и IgA антител к спайковому S-белку

коронавируса SARS-CoV-2 в различные периоды болезни. Всего исследовано 150 образцов сыворотки крови от 88 пациентов.

Установлено, что общая доля серопозитивных (без учета тяжести течения заболевания) в 1-10-й дни болезни составила 72,7%, у 12 пациентов антительный ответ не наблюдался (27%). На 11-21-й дни болезни отмечалась статистически значимая тенденция к увеличению частоты выявления IgM+IgA у этих же больных до 97,7% (критерий МакНемары 0,001, $p \leq 0,05$) (рисунок 20).

Оценка диагностической эффективности ИФА (ДЭ) на выявление антител IgM+IgA у пациентов на 1-10 и 11-21 дни заболевания проведена согласно предложенным ВОЗ критериям. Среди больных с подтверждённым диагнозом положительные результаты в ИФА отмечались на 1-10 день болезни у 32 и на 11-21 день заболевания у 42 заболевших, отрицательные результаты в ИФА на Ig M+IgA на 1-10 день болезни выявлены у 12 пациентов, на 11-21 — у 2 заболевших.

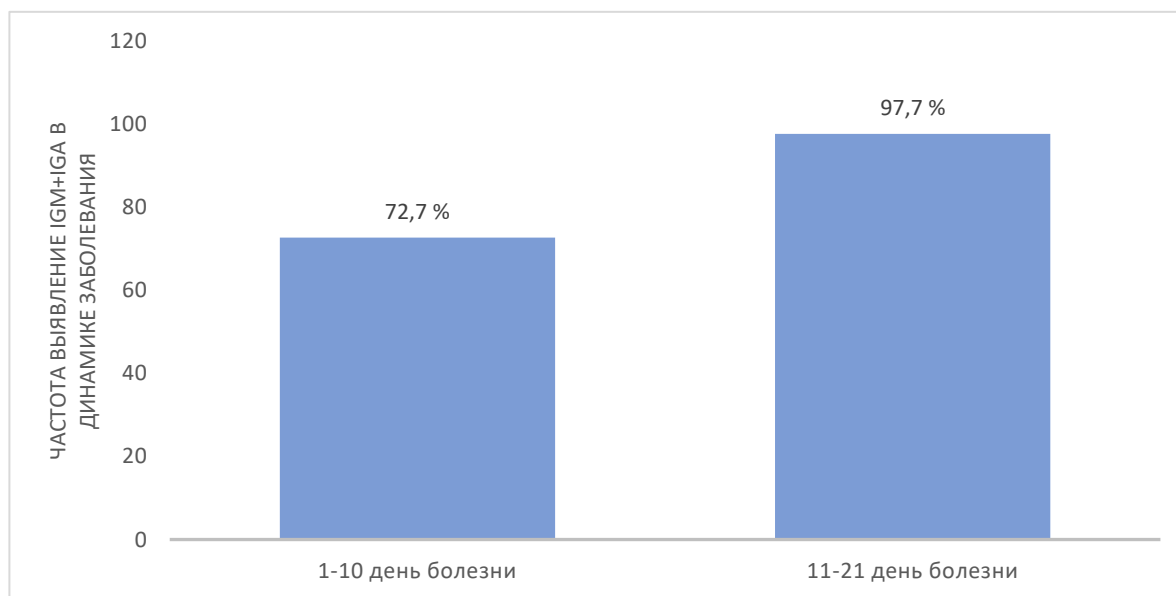


Рисунок 20. Частоты выявления IgM+IgA к S-белку SARS-Cov-2 у пациентов с COVID-19 в динамике заболевания, n=44

Не было обнаружено положительных результатов на IgM+IgA к SARS-Cov-2 у здоровых лиц (48 человек) и 64 больных с лабораторно подтвержденными диагнозами ОРВИ. Показатель диагностической чувствительности (ДЧ) ИФА на COVID в отношении обнаружения иммуноглобулинов IgM+IgA составил на 1-10 день болезни $72,7 \pm 4,21\%$, на 11-21 день болезни — $95,50 \pm 1,96\%$, показатель диагностической эффективности (ДЭ) $92,30 \pm 1,88\%$ (1-10 день болезни) и $98,40 \pm 0,88\%$ (11-21 день болезни).

Положительный результат на специфические иммуноглобулины классов М+А зарегистрирован у всех больных (100%) с лёгким течением с 1 по 14 день болезни, с тяжёлым течением — с 8-21 и со среднетяжелым течением COVID-19 — после 21 дня болезни (таблица 21).

Таблица 21. Частота выявления IgM+IgA к S-белку SARS-Cov-2 в ИФА в динамике заболевания у пациентов с различной тяжестью течения (n=75)

День заболевания	Тяжесть течения	Число больных, абс.	Положительный результат	
			абс.	%
1-7	Легкая	3	3	100
	Среднетяжелая	20	12	60,0
	Тяжелая	2	1	50
8-14	Легкая	3	3	100
	Среднетяжелая	35	26	74,3
	Тяжелая	3	3	100
15-21	Легкая	0	0	0
	Среднетяжелая	6	6	100
	Тяжелая	1	1	100
> 21	Легкая	0	0	0
	Среднетяжелая	2	2	100
	Тяжелая	0	0	0

При этом установлено, что частота выявления IgM+IgA у больных (без учёта тяжести) не имела прямой связи с появлением симптомов в динамике заболевания (критерий точного теста Фишера на 1-й неделе в сравнении со 2-й и 3-й неделями 0,096 и 0,103 соответственно, $p \geq 0,05$). Также отсутствовала статистически значимая зависимость тяжести течения болезни от сроков появления симптомов заболевания (критерий точного теста Фишера для пациентов с лёгким, среднетяжелым и тяжёлым течением заболевания на 1-7 и 8-14 день равен 0,587 и 0,768 соответственно, $p \geq 0,05$). Оценить значимость различий по тяжести течения с началом появления симптомов после 15 дня болезни не представляется возможным, поскольку в этот период уже у всех пациентов обнаруживались антитела к IgM+IgA.

Следующим этапом наших исследований был анализ динамических изменений индекса антител для госпитализированных 44 пациентов с лёгким, среднетяжелым и тяжёлым течением COVID на 1-10 день болезни и на 11-21 день болезни (таблица 22). Всего оценено 88 образцов.

Таблица 22. Динамика уровней индекса антител IgM+A к S-белку SARS-Cov-2 у пациентов с различной тяжестью течения заболевания, n=44

Период	Показатели индекса антител (ИА)	Тяжесть течения заболевания		
		Легкая	Среднетяжелая	Тяжелая
1-10 день болезни	ИА [95% ДИ]	12,45 [6,80-18,17]	26,69 [20,03-33,34]	53,34 [45,88-60,08]
	Медиана ИА	9,8	21,1	52,2
	Межквартильный размах медианы ИА	9,7-16,8	12,4-38,5	50,5-56,2
11-21 день болезни	ИА [95% ДИ]	39,67 [9,15-70,19]	37,22 [31,26 -43,19]	43,44 [12,87-74,02]
	Медиана ИА	46,8±24,6	40,0±16,8	44,6±26,9

	Межквартильный размах медианы ИА	17,4-60,0	22,8-49,0	26,9-60,0
--	----------------------------------	-----------	-----------	-----------

На 1-10 день болезни у пациентов с COVID-19 наименьший показатель индекса антител IgM+IgA выявлен у пациентов с легким (12,45; ДИ 6,80-18,17) и средним (26,69; ДИ 20,03-33,34) течением заболевания (критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони $p_{\text{лег-ср}}=0,237$, $p \geq 0,05$), максимальный индекс антител (53,34; ДИ 45,88-60,80) формировался у пациентов с тяжелым течением заболевания и был статистически значимым по сравнению с индексом антител при легком и среднетяжелом течении заболевания (критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони $p_{\text{лег-тяж}}=0,002$, $p_{\text{ср-тяж}}=0,029$, $p \leq 0,05$) (рисунок 21).

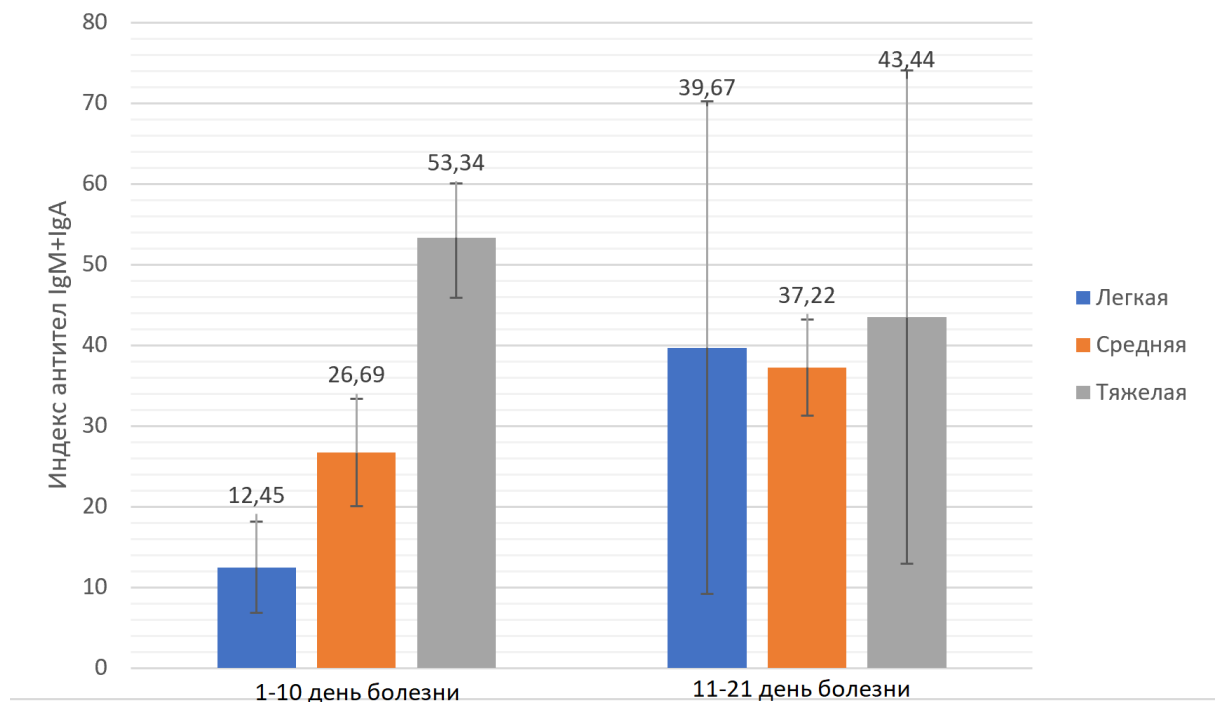


Рисунок 21. Динамика изменения индекса антител IgM+IgA в зависимости от степени тяжести COVID-19

На 11-21 день болезни наблюдалось значительное увеличение индекса антител IgM+IgA при легком (39,67; ДИ 9,15-70,19) и в меньшей степени при среднетяжелом (37,22; ДИ 31,26-43,19) течении болезни. При тяжелом течении COVID-19 индекс антител IgM+IgA на 11-21 день снизился и составил 43,44; ДИ 12,87-74,02. В этот период значимых изменений в показателях индекса антител не выявлено (критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони $p_{\text{лег-ср}}=1,0$, $p_{\text{лег-тяж}}=1,0$, $p_{\text{ср-тяж}}=1,0$, $p \geq 0,05$).

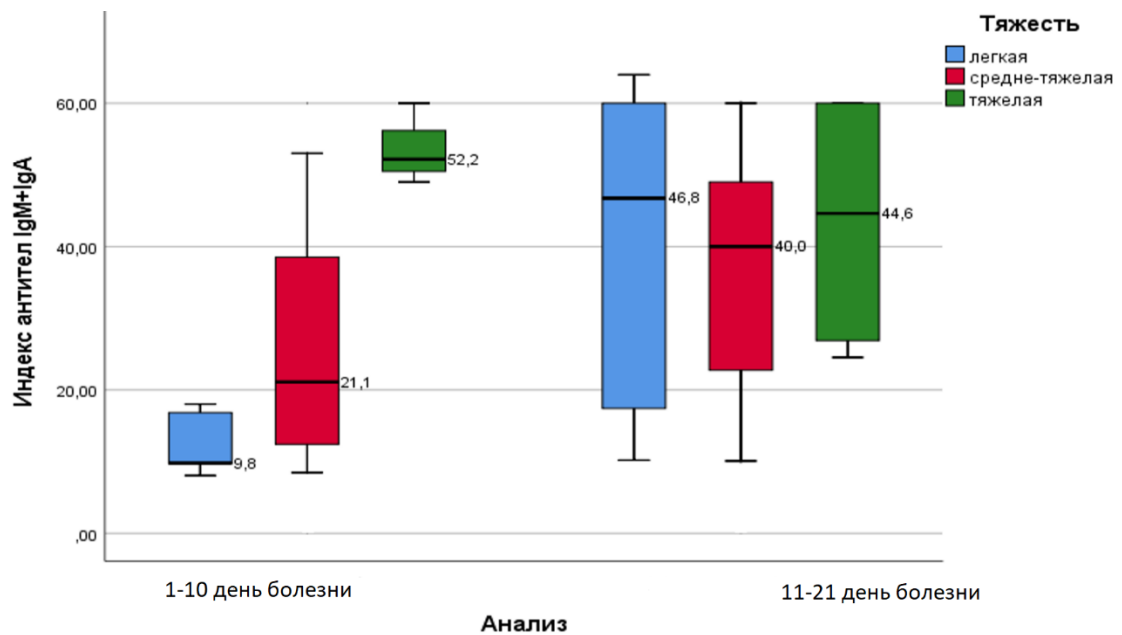
Оценка индекса антител IgM+IgA в динамике заболевания отдельно для каждой тяжести течения болезни позволила выявить следующую закономерность. При лёгком и среднетяжелом течение COVID-19 на 1-10 и 11-21 дни болезни установлены значимые различия в показателях индекса антител (критерий Вилкоксона 0,043 и 0,017 соответственно, $p \leq 0,05$). При тяжёлом течении болезни в эти периоды статистически значимого изменения уровня индекса антител не произошло (критерий Вилкоксона 0,285, $p \geq 0,05$). При этом медианное значение индекса антител увеличивалось в на 11-21 день болезни в 4,8 и 1,9 раз для лёгкого и среднетяжелого течения заболевания соответственно и характеризовалось некоторой тенденцией к снижению при тяжелом течении болезни (рисунок 22).

Таким образом, проведённые серологические исследования по оценке раннего формирования гуморального иммунитета у пациентов, поступивших на стационарное лечение с диагнозом COVID-19, подтверждают выработку специфических IgM и IgA антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2.

На 1-10 день после инфицирования IgM+IgA определялись у 72,2% пациентов, на 11-21 день статистически достоверно возростали до 97,7% ($p \leq 0,05$), что согласуется с данными других исследователей [4, 69, 54]. Показатель ДЭ ИФА на выявление IgM+IgA составил $92,3 \pm 1,88$ % на 1-10 день болезни и $98,4 \pm 0,88$ % на 11-21 день болезни. На основании оценки индекса антител можно констатировать более ранний и более выраженный

иммунный ответ у пациентов с тяжёлым течением заболевания ($p \leq 0,05$). У групп больных со среднетяжелым и лёгким течением COVID-19 формирование иммунного ответа было более выражено на 11-21 день болезни и в большей степени при лёгком течении заболевания ($p \leq 0,05$). Полученные результаты могут быть использованы для обоснования включения ИФА по определению комплекса IgM+IgA антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 как дополнительного теста для подтверждения диагноза у больных с тяжёлым течением COVID-19 с 1 по 10 день, при среднетяжелом и легком течении — с 11 по 21 день болезни.

Рисунок 22. Медианное распределение индексов антител IgM+IgA у



пациентов в динамике инфекционного процесса в соответствии с тяжестью течения заболевания.

4.2. Определение антител IgG к рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD) и нуклеокапсиду (Nc) SARS-CoV-2 у пациентов различных групп тяжести с COVID-19 в динамике заболевания

Анализ формирования антител IgG является существенным критерием оценки иммунного ответа у пациентов в динамике заболевания. В связи с этим проведено определение уровня иммуноглобулинов класса G к нуклеокапсидному белку (Nc) и рецептор-связывающему домену шиповидного белка (S1 RBD) коронавируса SARS-CoV-2 у пациентов, находящихся на стационарном лечении с верифицированным методом ОТ-ПЦР диагнозом COVID-19. Всего исследованы 604 сыворотки крови от 179 больных на 1-10 день болезни и 112 пациентов на 11-21 дни заболевания в зависимости от тяжести течения заболевания и дан анализ динамических изменений уровней специфических IgG антител к структурным белкам RBD и Nc.

Показано, что на 1-10 день болезни достоверно чаще выявлялись IgG антитела к Nc коронавируса, чем к RBD, составляя соответственно 38,5% и 22,9% (критерий Макнемара меньше 0,001, $p \leq 0,05$).

В период с 11 по 21 день доля обнаружения специфических антител IgG к основным структурным белкам SARS-CoV-2 достоверно возросла по сравнению с начальным периодом (1-10 день), составляя 93,8% к Nc и 90,2% к RBD коронавируса SARS-CoV-2, однако на 11-21 день болезни статистически значимых различий в частоте выявления IgG антител к Nc и RBD антигенам не обнаружено (критерий Макнемара меньше 0,344, $p \geq 0,05$) (рисунок 23).

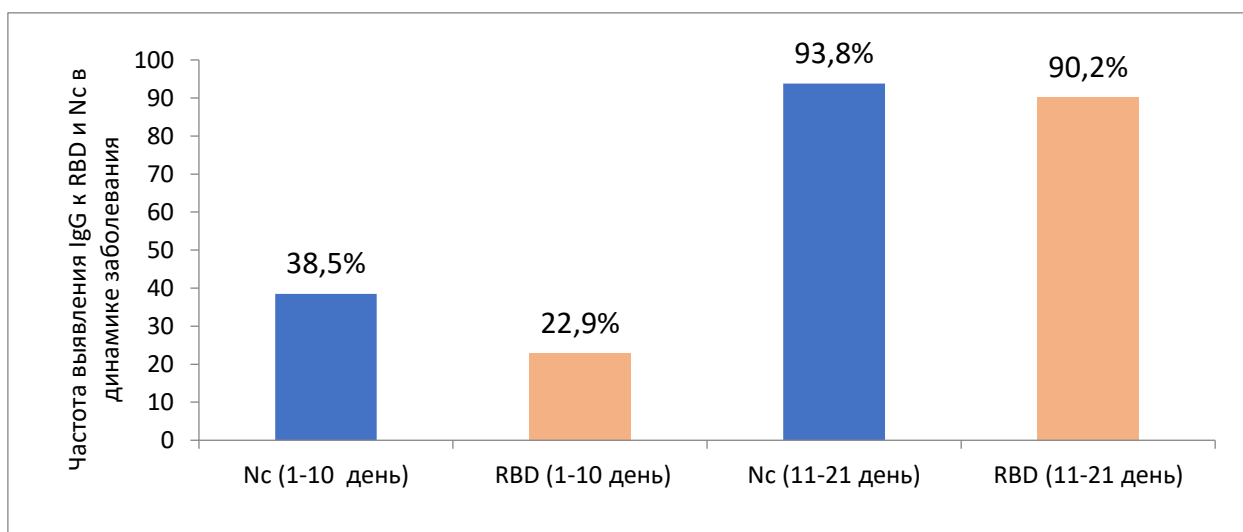


Рисунок 23. Частота выявления иммуноглобулинов класса IgG к нуклеокапсиду (Nc) и рецептор-связывающему домену RBD SARS-CoV-2 в 1-10 день болезни (n=179) и на 11-21 день болезни (n=112)

Диагностическая оценка ИФА на выявление антител IgG к Nc показала следующее. Положительные результаты в ИФА у больных с лабораторно подтвержденным ОТ-ПЦР диагнозом отмечались на 1-10 дни заболевания у 69 пациентов, на 11-21 — у 105 заболевших, отрицательные результаты в ИФА на IgG к Nc на 1-10 день болезни выявлены у 110 пациентов, на 11-21 день болезни — у 7 заболевших. Диагностическая оценка ИФА на выявление антител IgG к RBD показала, что положительные результаты в на 1-10 дни заболевания установлены у 41 пациента, на 11-21 дни — у 101 заболевшего, отрицательные результаты в ИФА на IgG к RBD на 1-10 день болезни выявлены у 138 пациентов, на 11-21 день болезни — у 11 заболевших. Не было обнаружено положительных результатов на IgG к RBD и IgG к Nc у здоровых лиц (48 человек) и 64 больных с лабораторно подтвержденными диагнозами ОРВИ. Полученные результаты представлены в таблице 23.

Таблица 23. Диагностическая оценка ИФА на антитела IgG к Nc и IgG к RBD коронавируса SARS-CoV-2

Диагностические показатели, %	IgG к Nc		IgG к RBD	
	1-10 день n=179	11-21 день n=112	1-10 день n=179	11-21 день n=112
Диагностическая чувствительность (ДЧ)	38,6%	93,8%	22,9%	90,2%
Диагностическая специфичность (ДС)	100%	100%	100%	100%
Диагностическая эффективность (ДЭ)	62,2%	96,9%	52,6%	95,1%

Частота выявления IgG антител к основным структурным белкам вируса в зависимости от степени тяжести клинического течения представлена в таблице 24. Установлено, что на 1-10 день болезни и 11-21 день болезни COVID-19 для пациентов с тяжелым, среднетяжелым и легким течением заболевания статистически достоверных отличий между группами не выявлено как в отношении IgG к Nc, так и IgG к RBD ($p \geq 0,05$).

Таблица 24. Частота выявления IgG-антител к Nc и RBD SARS-Cov-2 у пациентов с COVID-19 с различной тяжестью течения в динамике развития болезни

Период болезни	Тяжесть течения	Nc			RBD		
		абс.	%	Тест Фишера	абс.	%	Тест Фишера
1-10 день болезни n=179	Легкая n=6	2	33,3	0,930 _{лег-ср} p≥0,05	2	33,3	0,653 _{лег-ср} p≥0,05
	Средне-тяжелая n=134	47	35,1	0,619 _{ср-тяж} p≥0,05	27	20,1	0,899 _{ср-тяж} p≥0,05
	Тяжелая n=39	20	51,2	0,202 _{лег-тяж} p≥0,05	12	30,8	0,487 _{лег-тяж} p≥0,05
11-21 день болезни n=112	Легкая n=6	5	83,3	0,287 _{лег-ср} p≥0,05	5	83,3	0,923 _{лег-ср}
	Средне-тяжелая n=86	80	93,0	1,0 _{ср-тяж} p≥0,05	78	90,7	0,923 _{ср-тяж} p≥0,05
	Тяжелая n=20	20	100	1,0 _{лег-тяж} p≥0,05	18	90,0	0,923 _{лег-тяж} p≥0,05

Далее был исследован уровень антител IgG к Nc и IgG к RBD SARS-Cov-2 по коэффициенту позитивности в зависимости от степени тяжести течения заболевания (таблица 25). Уровень IgG к RBD в на 1-10 день болезни был максимальный при тяжелом (КП 4,66±2,92), промежуточный при среднетяжелом (КП 4,32±3,12) и минимальный при легком (КП 2,10±0,99) течении новой коронавирусной инфекции. На 11-21 день болезни формирование антител к RBD становилось очевидным, однако медианные значения уровней КП к RBD отличались в 2,0, 2,1 и 1,6 раз соответственно для легкого, среднетяжелого и тяжелого течения болезни и были значимо

ра различны при среднетяжелом и тяжелом течении (критерий Вилькоксона меньше 0,001, при $p \leq 0,05$) (рисунок 5 А, С).

Показатели позитивности IgG к Nc были выше во всех группах пациентов и имели сходную тенденцию по тяжести течения в сравнении с RBD (таблица 25). Рост медианных значений КП IgG к Nc при среднетяжелой и тяжелой степени течения заболевания был значимым (критерий Вилькоксона меньше 0,001, при $p \leq 0,05$).

Таблица 25. Динамика уровней коэффициента позитивности IgG к Nc и RBD SARS-Cov-2 у пациентов с различной тяжестью течения заболевания

Период	Показатели	Тяжесть течения заболевания		
		Легкая n=2	Среднетяжелая n=27	Тяжелая n=12
Ig RBD				
1-10 день болезни n=41	Коэффициент позитивности КП [95% ДИ]	2,10 [-6,79- 10,99]	4,32 [3,09-5,55]	4,66 [2,81-6,51]
	Медиана КП (Me КП)	2,10	3,60	3,45
	Межквартильный размах медианы КП	1,40 – 2,80	1,95 – 5,35	2,70 – 6,90
11-21 день болезни n=101		Легкая n=5	Среднетяжелая n=78	Тяжелая n=18
	Коэффициент позитивности КП [95% ДИ]	6,04 [0,77-11,31]	7,23 [6,42-8,04]	5,94 [4,09-7,78]

	Медиана КП (Ме КП)	4,30	7,50	5,25
	Межквартильный размах медианы КП	3,30 – 10,30	4,0 – 10,60	2,80 – 10,20
Ig Nc				
1-10 день болезни n=69		Легкая n=2	Среднетяжелая n=47	Тяжелая n=20
	Коэффициент позитивности КП [95% ДИ]	5,55 [-30,66- 41,76]	5,65 [4,80-6,50]	6,69 [5,15-8,23]
	Медиана КП	5,55	5,50	7,50
	Межквартильный размах медианы КП	2,70 – 8,40	3,15 – 8,10	4,45 – 9,20
11-21 день болезни n=105		Легкая n=5	Среднетяжелая n=80	Тяжелая n=20
	Коэффициент позитивности КП [95% ДИ]	7,12 [2,0-12,24]	8,21 [7,71-8,70]	8,16 [7,15-9,16]
	Медиана КП	8,90	8,65	8,75
	Межквартильный размах медианы КП	4,0 – 9,30	7,20 – 9,70	7,15-9,65

Объективно оценить показатель в отношении легких форм не представлялось возможным ввиду единичных случаев наблюдения, несмотря на установленную тенденцию к увеличению Ме КП (рисунок 24 В, D).

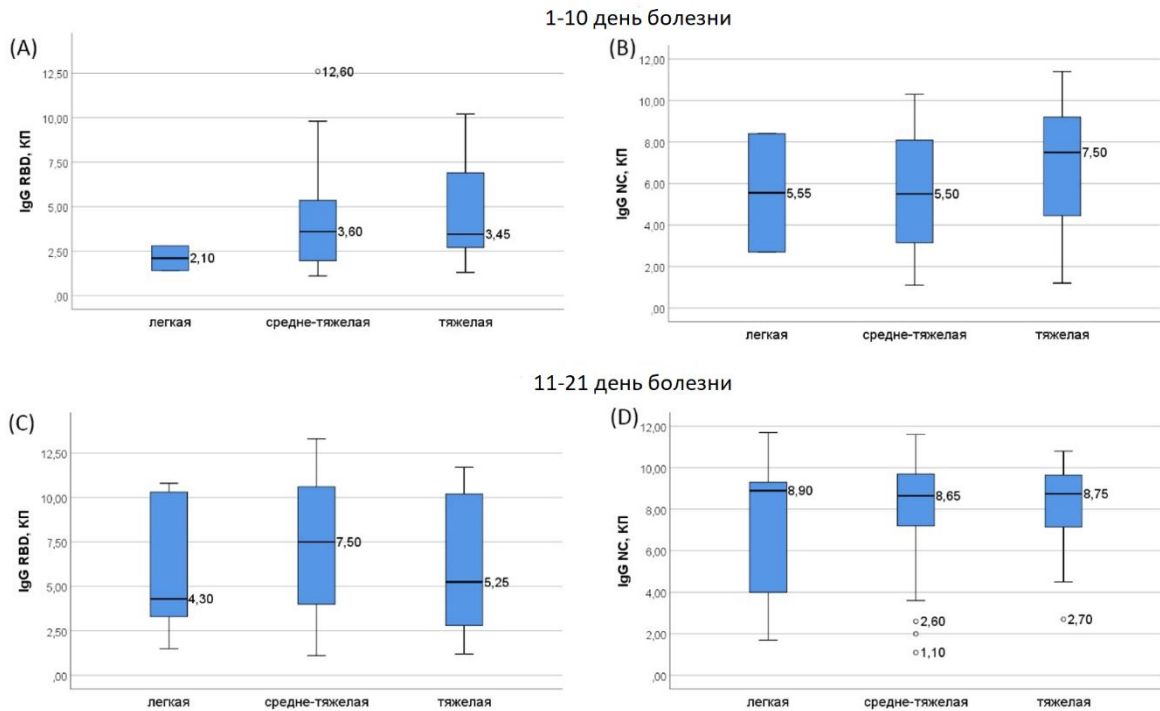


Рисунок 24. Коэффициенты позитивности IgG к RBD и IgG к Nc на 1-10 и 11-21 дни заболевания в зависимости от тяжести течения COVID-19: А – 1-10 день болезни IgG к RBD, В – 1-10 день болезни IgG к Nc, С – 11-21 день болезни IgG к RBD, D – день болезни IgG Nc

Таким образом, IgG антитела к нуклеокапсиду Nc и рецептор-связывающему домену шиповидного белка RBD коронавируса SARS-CoV-2 начинают формироваться у пациентов уже с 1 по 10 день появления симптомов болезни, при этом уровень антител к Nc обнаруживается чаще, чем к RBD. С 11 по 21 день болезни уровни антител увеличивались в 2,5-4,0 раза, выравнивались по отношению к рассматриваемым антигенам и не коррелировались между исследуемыми группами пациентов по тяжести заболевания. Показатель ДЭ ИФА на IgG к Nc в 1-10 день болезни (62,2%) превышал ДЭ ИФА на IgG к RBD (52,6%) ($p \leq 0,05$), что указывает на более раннее формирование иммунного ответа у заболевших на нуклеокапсидный белок вируса SARS-CoV-2.

На 11-21 день болезни установлены значимые различия между медианными показателями коэффициентов позитивности IgG к RBD и IgG к Nc у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, что свидетельствует о формировании более выраженного иммунного ответа при данных формах тяжести. Кроме этого, более высокие показатели коэффициента позитивности IgG к Nc могут указывать на большую стабильность антительного ответа, формируемого к нуклеокапсиду [155–157], что может быть использовано для ранней серологической диагностики COVID-19.

Приводим клинический пример пациента с диагнозом «Коронавирусная инфекция, COVID-19 вирус идентифицирован», имеющего характерную картину гуморального ответа (высокий КП IgG к Nc SARS-CoV-2) в ранние сроки заболевания.

Заключительный диагноз.

Основной диагноз: U07.1 Коронавирусная инфекция, COVID-19 вирус идентифицирован, среднетяжелое течение.

Осложнения: J12.8 Внебольничная двусторонняя интерстициальная пневмония (КТ 1-2). ДН 1 степени.

Сопутствующие заболевания: E11.9 Инсулиннезависимый сахарный диабет без осложнений. I50.9 Сердечная недостаточность неуточненная. I11.9 Гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца без застойной сердечной недостаточности.

Под нашим наблюдением находился пациент N, 80 лет, который поступил в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» на 8 день болезни по СМП с жалобами на резко выраженную слабость, повышение температуры до 37,7°С, сухость во рту, сухой кашель,

Эпидемиологический анамнез: контакты с пациентами с COVID-19 отрицает.

Вакцинопрофилактика не проводилась.

Анамнез заболевания: заболел остро 10.02.2021, когда поднялась температура тела до 37,5°C, появились выраженная слабость и озноб. Лечился самостоятельно (жаропонижающие препараты). 13.02.2021 — вызов врача на дом в связи с сохраняющейся лихорадкой, катарально-респираторным синдромом. Мазок на РНК SARS-CoV-2 в отделяемом носоглотки методом ОТ-ПЦР – отрицательно. Проводилась симптоматическая и противовирусная терапия. 17.02.2021 был доставлен СМП в стационар.

При поступлении состояние было расценено как среднетяжёлое, за счёт наличия интоксикации и дыхательной недостаточности I степени. Объективные данные: сознание ясное, ориентирован во времени и пространстве. Дыхание самостоятельное. Сатурация кислорода на атмосферном воздухе 94%, ЧДД — 23 в мин. Аускультативно: ослабленное дыхание по всех легочной поверхности, с обеих сторон выслушиваются влажные мелкопузырчатые хрипы в нижних отделах. ССС: АД 130/80 мм.рт.ст., пульс 92 удара в минуту, дефицита пульса не выявлено. Физиологические отправления в норме. Менингеальные знаки отсутствуют. Приводим результаты обследования.

На момент поступления результат КТ ОГК: двусторонняя интерстициальная пневмония с высокой вероятностью вирусной этиологии. Признаки артериальной легочной гипертензии. Следы выпота в плевральных полостях. КТ 1-2.

КТ ОГК в динамике (28.02.2021): течение двусторонней интерстициальной пневмонии, в начальной стадии разрешения. Высокая вероятность вирусной этиологии, КТ 1.

На ЭКГ (9 день болезни): синусовый ритм, ЧСС 67 ударов в мин. Отклонение ЭОС влево. Неполная блокада правой ветви левой ножки пучка Гисса. Синдром ранней реполяризации желудочков. Признаки электрической активности ЛЖ.

В динамике общий анализ крови характеризовался нарастанием тромбоцитоза ($459-571 \times 10^9/\text{л}$), развитием нейтрофиллеза до 84,0%. В биохимическом анализе крови определялось повышение уровня глюкозы (9,9 ммоль/л), СРБ (139 мг/л). Показатель уровня Д-димера с тенденцией к снижению (359-200 нг/мл).

Лечение.

Противовирусная терапия: на 9-й день болезни (2-й день пребывания в стационаре) — фавипиравир 600 мг 2 раза в сутки с 4-го по 10-ый день болезни (2 – 10-й дни пребывания в стационаре). Антибактериальная терапия: с 8-го по 12-й день болезни цефтриаксон 1000 мг в/м 2 раза в сутки. С 8-го по 12-й дни болезни линезолид 2 мг/мл в/в 2 раза в сутки, меропенем 1 г в/в 3 раза в сутки. С 13-го по 15-й дни болезни ципрофлоксацин 2 мг в/в 2 раза в сутки. На 9-й день болезни (2-й день госпитализации) был применен ингибитор ИЛ-6 Тоцилизумаб однократно в\в капельно в дозе 400 мг. Пациенту проводилась антикоагулянтная, кортикостероидная терапия, инсулинотерапия весь период пребывания в стационаре.

Проводимая терапия дала положительный эффект, пациент был выписан из стационара на 20-й день болезни с улучшением.

Исследование мазка из ротоглотки на вирус SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР показало положительный результат от 19.02.2021 (10-й день болезни).

Уровень IgG к SARS-CoV-2 в динамике определяли методом ИФА, представлен в таблице 26.

Таблица 26. Сравнительные результаты определения IgG к RBD и Nc в динамике заболевания

	<i>IgG к RBD (КП)</i>	<i>IgG к Nc (КП)</i>
18.02.2021 (8-й день болезни)	0,6	5,3
26.02.2021 (17-й день болезни)	4,5	8,6

Приведенный клинический пример свидетельствует об эффективности определения IgG к Nc в ранние сроки болезни (8-й день заболевания), тогда как результат исследования мазка из носоглотки методом ОТ-ПЦР был получен на 10-й день заболевания.

4.3. Определение нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у переболевших и вакцинированных

По результатам вышеприведенных исследований показано формирование иммунного ответа у переболевших в результате инфицирования вирусом SARS-Cov-2. Как было сказано выше, выявление IgG к Nc может являться ранним показателем текущей инфекции или в ретроспективе свидетельствует о перенесенном заболевании, обнаружение же IgG к рецептор-связывающему домену (RBD) S-белка SARS-Cov-2 свидетельствует об образовании защитных антител после заболевания или вакцинации ГамКовидВак. Принцип защитного иммунитета заключается в блокировании антителами взаимодействия вируса с рецептором ангиотензин-превращающего фермента ACE2, расположенного, в частности, на эпителии легочных альвеол. Антитела, которые формируются к RBD (анти RBD),

обладают нейтрализующими свойствами для вируса, препятствуя его соединению с рецептором клеток человека ACE2, не позволяя вирусу размножаться в них и вызывать заболевание [98,99]. Установлено, что рецептор-связывающий домен (RBD) служит мишенью для 90% нейтрализующих антител после перенесённой инфекции. Показан более высокий уровень IgG к RBD у тяжелых больных, чем у больных лёгкой или бессимптомной формой COVID-19 [100].

Мерой выработки нейтрализующих антител в процессе реинфекции (или иммунизации) является индекс авидности (сила связывания антитела к антигену SARS-CoV-2, выраженная в % высокоаффинных антител), который коррелирует с ростом титра вирус-нейтрализации. Считается, что если титры IgG к RBD постепенно снижаются после выздоровления в течение не менее 49 дней, то авидность антител, измеряемая силой связывания IgG и антигена, со временем возрастает за счёт проходящего процесса «созревания аффинитета» [96]. Этот процесс занимает не менее 3–4 месяцев после перенесенной инфекции/вакцинации и обусловлен созреванием В-лимфоцитов [103, 158], вследствие чего при повторной встрече с возбудителем (антигеном) уже продуцируются высокоавидные антитела, позволяя не только дифференцировать первичную и повторную инфекцию, но и прогнозировать исход повторного инфицирования [159, 160].

В данном разделе работы мы провели оценку свойств антител к RBD у лиц, перенесших первичное инфицирование вирусом SARS-Cov-2 и реинфицированных, для прогнозирования тяжести течения заболевания, а у вакцинированных — для обоснования сроков повторной иммунизации.

В исследовании приняли участие 87 человек (в возрасте от 18 до 80 лет), которые были разделены на три группы. Первая группа включала 23 пациента, поступивших на стационарное лечение до 10 дня заболевания. Во вторую группу входили 36 пациентов с реинфекцией в легкой форме и 10

пациентов — с тяжелой формой течения COVID-19. Третья группа включала 9 вакцинированных, получивших вторую дозу вакцины Гам-Ковид-Вак (Спутник V) не менее чем за две недели до появления симптомов заболевания. Четвертая группа состояла из 9 здоровых добровольцев, прошедших полный курс вакцинации и не имевших симптомов COVID-19 в течение двух недель перед исследованием, отсутствие COVID-19 у волонтеров было подтверждено отсутствием специфических антител к белку нуклеокапсида (Nc) SARS-CoV-2.

4.3.1. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса avidности у больных COVID-19

У всех заболевших с подтвержденным диагнозом COVID-19 установлена сходная динамика изменения уровня антител. Спустя две недели после появления симптомов у всех заболевших формировались IgG антитела как к RBD (Me КП 10,5 [8,40-11,83]), так и к Nc (Me КП 9,4 [8,10-10,55]) (таблица 27).

Таблица 27. Показатели нейтрализующей активности и avidности у больных COVID-19

Показатели	Сроки исследования		Критерий Вилкоксона (p≤0,05)*
	1 точка	2 точка	
Количество больных (n)	23	23	-
Дни наблюдения Me дни [95% ДИ]	13 [13-14]	136 [134-138]	-
Индекс avidности, % Me ИА [95% ДИ]	20,40 [15,80 – 25,90]	61,40 [50,25 – 65,85]	<0,001*

Коэффициент позитивности IgG к RBD Ме КП [95% ДИ]	10,50 [8,40 – 11,80]	6,80 [6,20 – 8,90]	0,07*
Коэффициент позитивности IgG к Nc Ме КП [95% ДИ]	9,40 [8,10 – 10,55]	7,40 [5,20 – 9,10]	0,007*
Нейтрализующая способность антител, коэффициент ингибирования в % Ме КИ [95% ДИ]	87,7 [83,75 – 88,70]	61,40 [50,25 – 65,85]	0.988

При этом 95,6% сывороток крови (22 из 23 образцов) имели высокую нейтрализующую активность в тесте на ингибирование связывания ACE2 с RBD (Ме КП 87,7% [83,75-88,70] и низкую avidность антител IgG против RBD (Ме ИА 20,40% [15,80-25,90]. Только сыворотка крови от одного пациента имела высокий уровень avidности (64,7%), что предположительно может быть связано с предыдущим незарегистрированным контактом с SARS-Cov-2. Очевидно, полученные результаты свидетельствуют о не прошедших процесс созревания аффинитета вирусоспецифических IgG [161]. Для анализа длительности персистенции антител к SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших COVID-19, образцы крови были повторно собраны через 4-6 месяцев после выздоровления. Все образцы оставались положительными на IgG к RBD и к Nc. Ме КП для IgG к RBD снизилась с 10,50 [8,40 – 11,80] до 6,80 [6,20 – 8,90], а для IgG к Nc — с 9,40 [8,10 – 10,55] до 7,40 [5,20 – 9,10]. При этом снижение количества антител со временем для IgG к RBD имеет пограничное значение (критерий Вилкоксона 0,07, при $p \leq 0,05$), а для IgG к Nc — статистически

значимое (критерий Вилкоксона 0,007, при $p \leq 0,05$). Образцы с низкими уровнями IgG к RBD ($S/CO < 5$) в первой точке были собраны на 10-12 дни болезни, таким образом, пик концентрации антител не был достигнут, что может быть связано с вариабельностью инкубационного периода SARS-CoV-2 и индивидуальной динамикой выработки антител. Тем не менее четыре месяца спустя все пациенты, кроме одного, имели схожие уровни IgG к RBD (Ме КП 6,8, [6,20-8,90]).

Несмотря на выявленное в данной группе 1,5-кратное снижение уровня IgG к RBD, нейтрализующая активность антител при этом оставалась высокой, без значимых различий между первой и второй точками исследования (критерий Вилкоксона 0,988, $p \geq 0,05$). Это позволяет предположить, что количество антител является не единственным фактором, определяющим нейтрализующую активность. Сохранение высокого уровня нейтрализации, при снижении концентрации антител, может быть обусловлено качественными изменениями антител, в том числе возрастанием их специфичности и аффинности за этот период. С другой стороны, наблюдаемый эффект может быть обусловлен особенностями тест-системы, используемой в исследовании, поскольку полученные значения близки к верхнему пределу количественного измерения данной тест-системы, что не позволяет надежно оценить изменения нейтрализующей активности (рисунок 25).

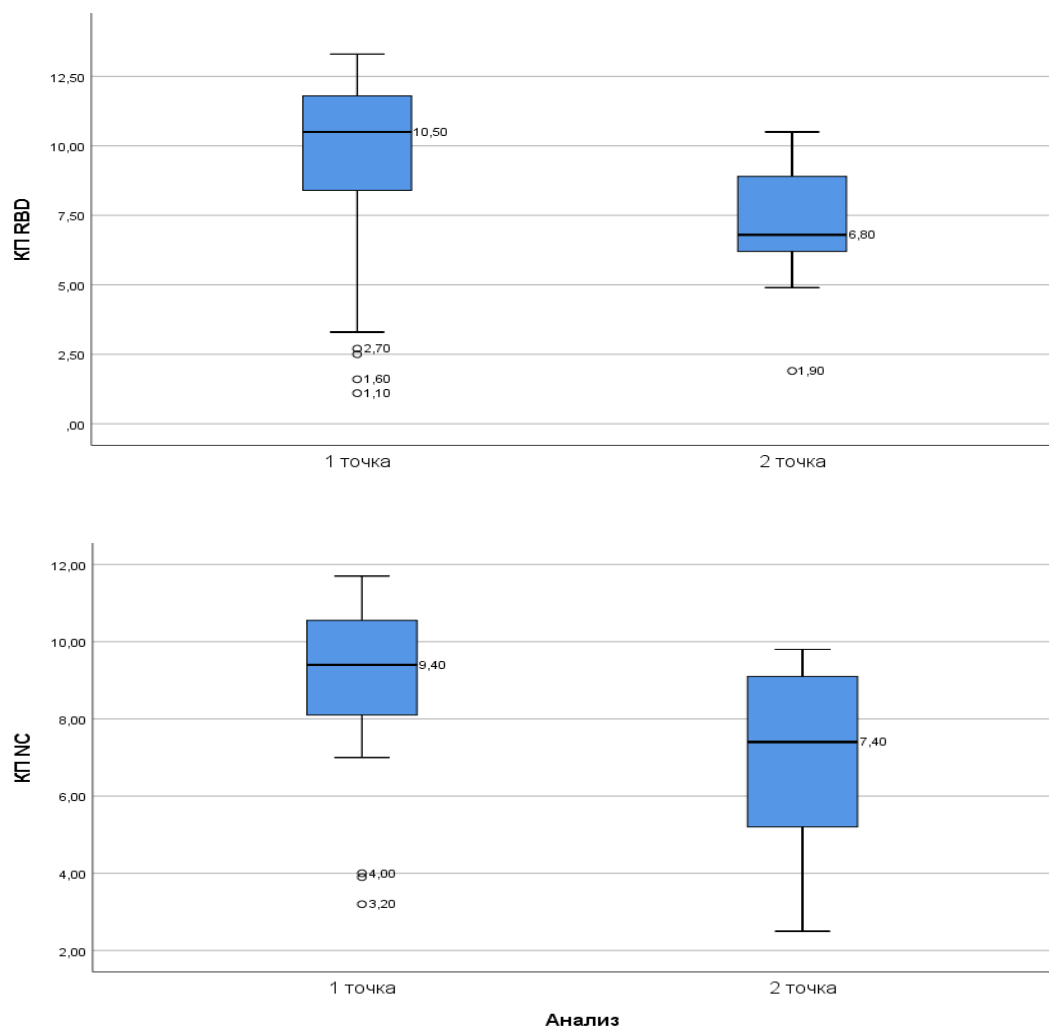


Рисунок 25. Уровни антител IgG к RBD (А) и Nc (В) у первично заболевших пациентов: 1-10 день после госпитализации (1 точка) и спустя 4-5 месяцев (2 точка) после инфицирования, n=23

В течение этого же периода avidность IgG к RBD значительно возросла, достигнув высокого уровня (ИА>50%) у 78% пациентов. Медианное значение avidности во второй точке составило 61,40% [50,25–65,85%]. Остальные шесть пациентов (22%) имели среднюю (40–50%, «зона созревания») или низкую (<40%) avidность IgG к RBD. Важно отметить, что у пяти пациентов с низкой и средней степенью avidности заболевание

проходило со средней степенью тяжести или носило тяжёлый характер (рисунок 26).

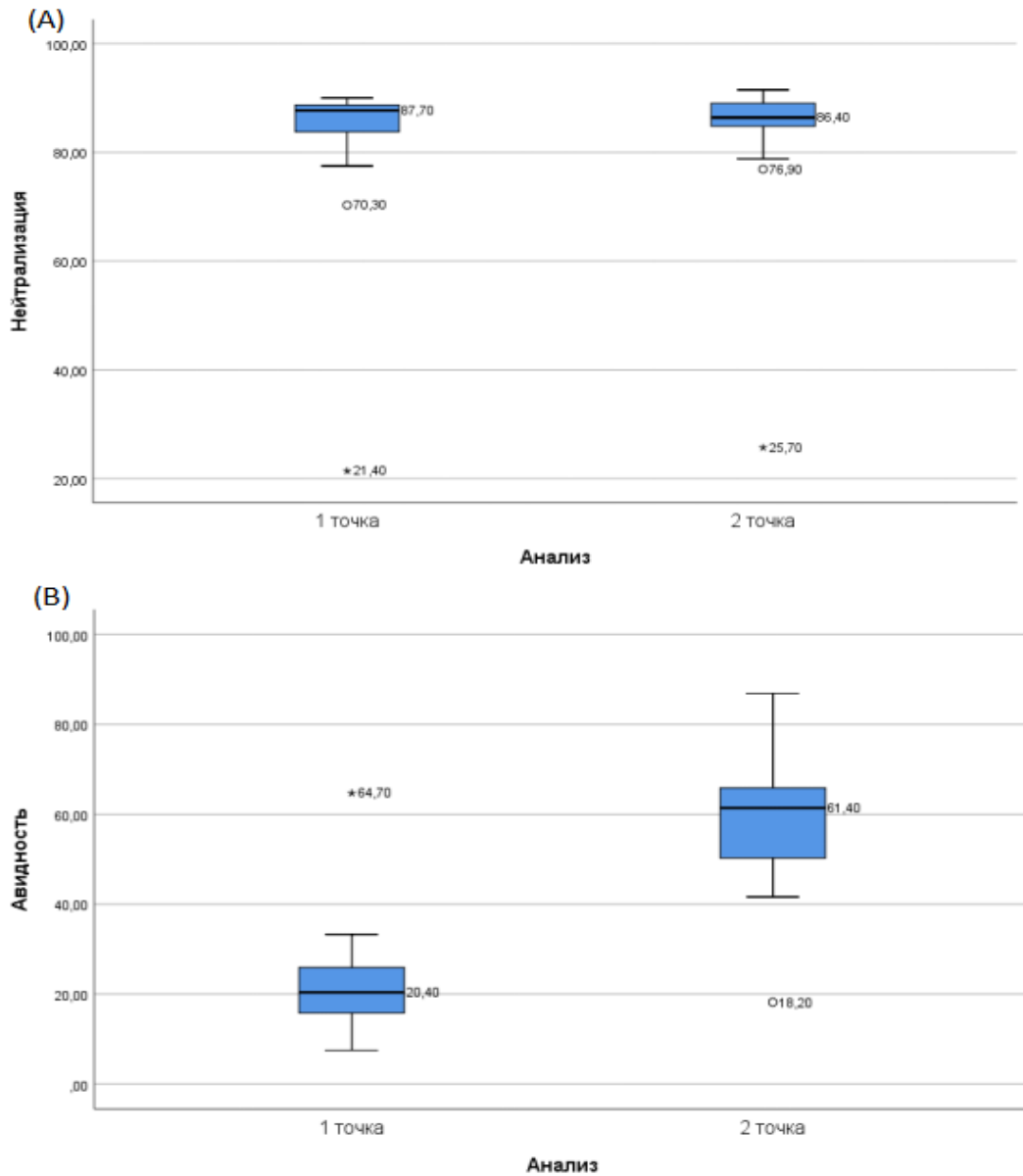


Рисунок 26. Нейтрализующая активность (А) и avidность (В) у первично заболевших пациентов: 1-10 день после госпитализации (1 точка) и спустя 4-5 месяцев (2 точка) после инфицирования, n=23.

У одного пациента низкие уровни IgG к RBD и нейтрализующей активности сохранялись во всех точках исследования, однако avidность его

IgG к RBD значительно увеличилась — с 20,4% до 42,7% соответственно. К концу периода госпитализации большинство пациентов обладали высоким уровнем IgG к основным антигенам SARS-CoV-2, и эти антитела были эффективными в предотвращении связывания RBD с человеческим ACE-2. В течение следующих месяцев происходило созревание аффинности IgG к RBD, и, хотя общая концентрация IgG к RBD и IgG к Nc снижалась, нейтрализующая активность антител оставалась на высоком уровне.

Клинический пример истории болезни пациента с диагнозом «Коронавирусная инфекция, COVID-19 вирус идентифицирован», с сохраняющимся низким уровнем avidности IgG к RBD SARS-CoV-2.

Заключительный диагноз.

Основной диагноз: U07.1 Коронавирусная инфекция, COVID-19 вирус идентифицирован, среднетяжёлое течение.

Осложнения: J12.8 Внебольничная двусторонняя интерстициальная пневмония (КТ 2-33). ДН I степени.

Под нашим наблюдением находился пациент N, 55 лет, который поступил в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» на 5 день болезни по экстренным показаниям с жалобами на выраженную слабость, повышение температуры до 38,9°C, сухой кашель, одышку при разговоре и физической нагрузке.

Эпидемиологический анамнез: контакты с пациентами с COVID-19 отрицает.

Анамнез заболевания: заболел остро 12.12.2020, когда поднялась температура тела до 37,0°C, появились озноб, ломота, слабость, сухой кашель. 13.12.2020 — вызов врача на дом, забор мазка из носоглотки с целью выявления РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР (результат положительный). Назначено лечение, без эффекта. 16.12.2020 выполнено исследование КТ ОГК (КТ 2). В связи с ухудшением состояния, отсутствием положительной

динамики, сохраняющимися слабостью, кашлем, 17.12.2021 был доставлен на карете СМП в стационар.

При поступлении состояние было расценено как среднетяжёлое, за счёт наличия дыхательной недостаточности I степени. Объективные данные: сознание ясное, ориентирован во времени и пространстве. Дыхание самостоятельное. Сатурация кислорода на атмосферном воздухе 90%, при ингаляции увлажненным кислородом 95%, ЧДД — 24 в мин. Аускультативно: ослабленное дыхание по всей легочной поверхности, слева по средне-подмышечной линии, под лопаткой выслушиваются влажные мелкопузырчатые хрипы в нижних отделах. ССС: АД 120/80 мм.рт.ст., пульс 93 удара в минуту, дефицита пульса не выявлено. Физиологические отправления в норме. Менингеальные знаки отсутствуют. Другие данные объективного обследования без патологических особенностей.

Приводим результаты обследования.

На момент поступления результат КТ ОГК: двусторонняя интерстициальная пневмония с высокой степенью вероятности COVID-19. КТ 2.

КТ ОГК в динамике (22.12.2020): течение двусторонней интерстициальной пневмонии, в начальной стадии разрешения. Высокая вероятность COVID-19, КТ 2-3.

На ЭКГ (9 день болезни): синусовый ритм, ЧСС 67 ударов в мин. Отклонение ЭОС влево. Неполная блокада правой ветви левой ножки пучка Гисса. Синдром ранней реполяризации желудочков. Признаки электрической активности ЛЖ.

В динамике общий анализ крови характеризовался развитием нейтрофиллеза до 87,7%. В биохимическом анализе крови определялось повышение уровня мочевины (7,7 ммоль/л), СРБ (10 мг/л).

Лечение.

Противовирусная терапия: на 6-й день болезни (2-й день пребывания в стационаре) — фавипиравир 800 мг 2 раза в сутки с 6-го по 11-й день болезни (2–5-й дни пребывания в стационаре). Антибактериальная терапия: с 6-го по 13-й день болезни цефтриаксон 1000 мг в/м 2 раза в сутки, с 6-го по 8-й день болезни азитромицин по 500 мг, 1 раз в сутки. Цефоперазон+ Сульбакам с 11-го по 17-й дни болезни. На 6-й день болезни (2-й день госпитализации) был применен ингибитор ИЛ-6 Олокизумаб однократно, подкожно в дозе 64 мг. Пациенту проводилась антикоагулянтная, противовоспалительная терапия весь период пребывания в стационаре.

Проводимая терапия дала положительный эффект, пациент был выписан из стационара на 19 день болезни с улучшением.

Исследование мазка из ротоглотки на вирус SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР показало положительный результат от 13.12.2021 (2-й день болезни).

Учитывая отсутствие в практическом здравоохранении стандартов и методик определения avidности IgG к RBD SARS-CoV-2, нами было проведено экспериментальное наблюдение с сывороткой крови пациента (ИБ описана выше). Результаты представлены в таблице 28.

Таблица 28. Уровень высокоавидных антител IgG к RBD SARS-CoV-2 в динамике

	<i>Авидность, % IgG к RBD</i>	<i>Уровень КП IgG к RBD</i>
<i>16-й день болезни</i>	<i>7,5</i>	<i>13,3</i>
<i>118-й день болезни</i>	<i>18,2</i>	<i>10,5</i>

Результаты серологического скрининга показали, что в сыворотке крови нашего пациента высокий КП IgG к RBD, что зачастую расценивается врачами практического здравоохранения как положительный протективный титр антител. Однако исследование уровня ИА в динамике (16 и 118 дни) показало, что уровень высокоавидных антител оставался низким. Таким образом, наряду с определением протективных IgG к RBD, необходимо учитывать уровень высокоавидных антител, что поможет решить вопрос о проведении вакцинации/ревакцинации.

4.3.2. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у вакцинированных против COVID-19

Результаты исследования вакцинированных против COVID-19 представлены в таблице 29.

Таблица 29. Показатели нейтрализующей активности и авидности у вакцинированных против COVID-19 добровольцев

Показатели	Сроки исследования (количество пациентов)		Критерий Вилкоксона ($p \leq 0,05$)*
	1 точка (9)	2 точка (9)	
Сутки от 1-й вакцинации Me дни [95% ДИ]	147 [100–169]	261 [242–315]	-
Сутки от 2-й вакцинации Me дни [95% ДИ]	108 [78–147]	239 [223–293]	-
Индекс авидности IgG к RBD, % Me ИА [95% ДИ]	108 [78–147]	84,64 [79,49–87,20]	0,249

Коэффициент позитивности IgG к RBD Ме КП [95% ДИ]	4,9 [4,0–5,7]	1,7 [1,4–2,7]	0,008*
Нейтрализующая способность антител IgG к RBD, коэффициент ингибирования в % Ме КИ [95% ДИ]	57,40 [44,90–79,60]	30,60 [25,40–39,60]	0,008*

У всех вакцинированных добровольцев ГамКовидВак (Спутник V) IgG к Nc к SARS-CoV-2 отсутствовали, что исключает заражение SARS-CoV-2 в данной группе в период наблюдения. IgG к RBD выявлены в 88,9% (8 положительных из 9 исследованных сывороток) в первой точке исследования, медиана составила 147 дней после первой вакцинации, а медиана коэффициента позитивности — 4,9 [4,0 – 5,7]. Четыре месяца спустя (медиана 261 день после первоначальной вакцинации) коэффициент позитивности IgG к RBD достоверно снизился до медианного уровня 1,7 [1,4 – 2,7] (критерий Вилкоксона 0,008, при $p \leq 0,05$), хотя IgG к RBD выявлены у 7 из 9 обследованных (77,8%).

Нейтрализующая активность коррелировала с динамикой изменения общего количества IgG к RBD и достоверно снизилась у всех обследованных с медианного значения коэффициента ингибирования (КИ) 57,4% [44,90 – 79,60] в первой точке исследования до медианы 30,6% [25,40 – 39,60] во второй точке (критерий Вилкоксона 0,008, при $p \leq 0,05$) (рисунок 27 А).

Авидность антител при этом оставалась высокой (больше 85-108%) и различия между первой и второй точками не были значимыми (критерий Вилкоксона 0,249, при $p \geq 0,05$), что подтверждает завершенность созревания аффинитета у всех вакцинированных на сроках в 147 дней после вакцинации (первая точка наблюдения). Стоит отметить, что для трех обследованных добровольцев (33%) во второй точке исследования (261 день) было невозможно оценить авидность из-за низкого уровня IgG к RBD (рисунок 27 В).

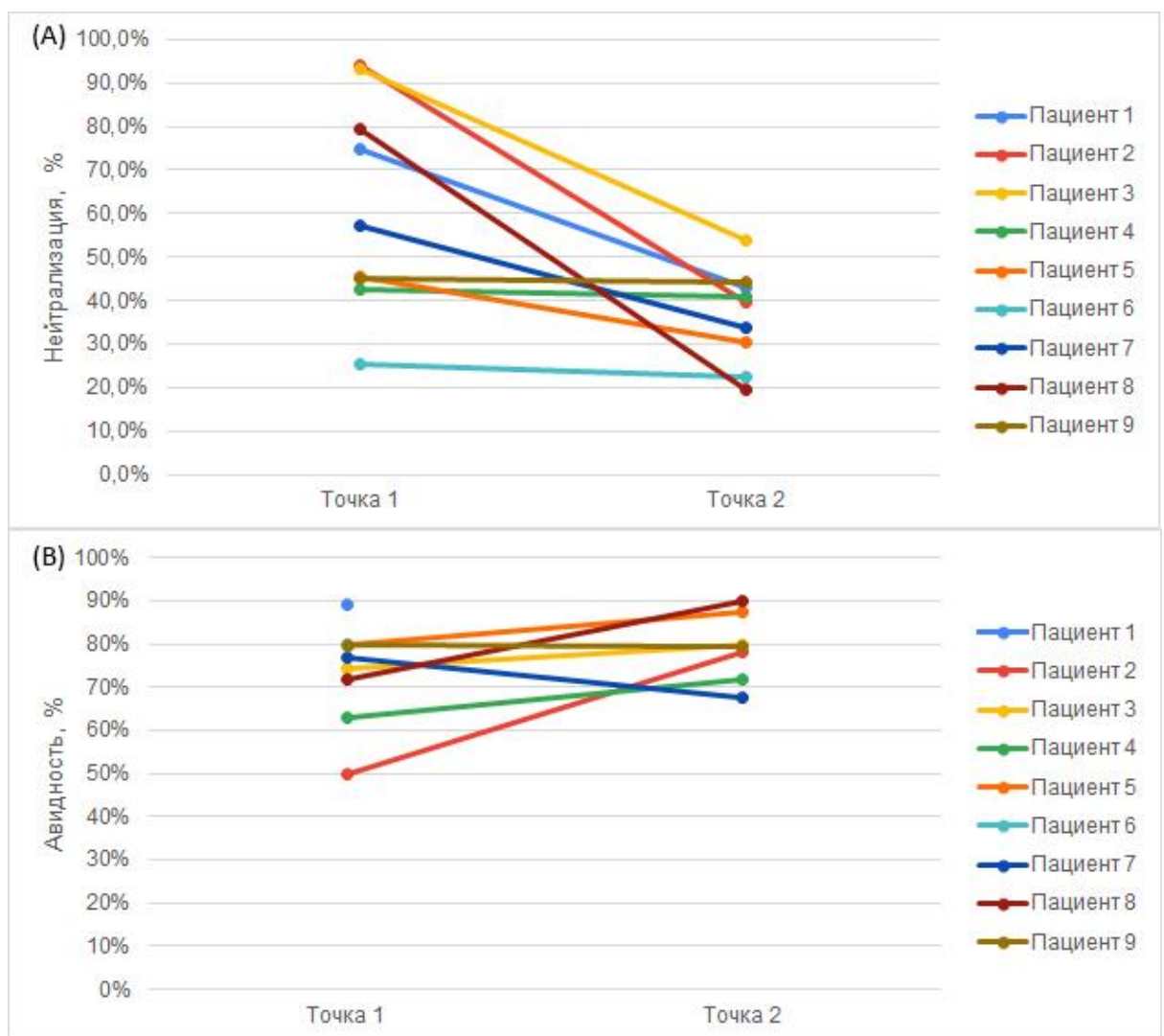


Рисунок 27. Нейтрализующая активность (А) и авидность (В) у вакцинированных добровольцев в динамике

4.3.3. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса авидности у заболевших вакцинированных против COVID-19

В группе вакцинированных ГамКовидВак пациентов с подтверждённым диагнозом COVID-19 медианное время с момента получения первой дозы вакцины составило 62 дня [40-82], а среднее время забора проб с момента появления симптомов составило 10 дней [5-19 дней] (таблица 30).

Таблица 30. Показатели нейтрализующей активности и авидности у заболевших, вакцинированных против COVID-19

Показатели	Сроки исследования (количество пациентов)		Критерий Вилкоксона (p≤0,05)*
	1 точка (9)	2 точка (9)	
Сутки от 1-й вакцинации Ме дни [IQR]	62 [40–82]	68 [46–87]	-
Сутки от появления симптомов Ме дни [IQR]	10±4	16±4	-
Индекс авидности IgG к RBD, % Ме ИА [IQR]	49,9 % [26,7–56,8]	43,5 [26,9–62,2]	0,075
Коэффициент позитивности IgG к RBD Ме КП [IQR]	4,3 [0,9–8,0]	7 [1,3–9,8]	0,109

Коэффициент позитивности IgG к Nc Me КП [IQR]	0,3 [0,2–0,6]	1,5 [0,5–8,4]	0,012*
Нейтрализующая способность антител IgG к RBD, коэффициент ингибирования в % Me КИ [IQR]	71,6 [41,8–94,3]	92,9 [85,6–97,5]	0,314

* изменения статистически значимы ($p > 0,05$)

Установлено, что шесть из девяти сывороток крови вакцинированных пациентов (66,7%) были положительными на IgG к RBD с Me КП 4,3 [0,9–8,0] и только два образца (22,2%) были положительными на IgG к Nc. Уровень нейтрализующих IgG к RBD составлял Me 71,6% [41,8–94,3]). Большая часть образцов (66,7%) продемонстрировали наличие антител с низкой авидностью: Me 27,6% [0–71,1].

Повторный забор сывороток от вакцинированных пациентов осуществлялся на 16-й день после появления симптомов. Через неделю после первого анализа медиана КП IgG к RBD в целом существенно не изменилась и составила Me 7 [1,3–9,8] (критерий Вилкоксона $p = 0,109$ при $p \geq 0,05$), однако семь из девяти пациентов (77,8%) были серопозитивными после инфицирования и/или вакцинации. Нейтрализующая активность также существенно не изменилась (Me 71,6 [41,8 – 94,3] % и 92,9 [85,6 – 97,5] % соответственно, критерий Вилкоксона $p = 0,314$ при $p \geq 0,05$). Подобная тенденция наблюдалась и для авидности антител: в двух образцах с низкими уровнями IgG к RBD нейтрализующая активность возросла до 85-89% (рисунок 28).

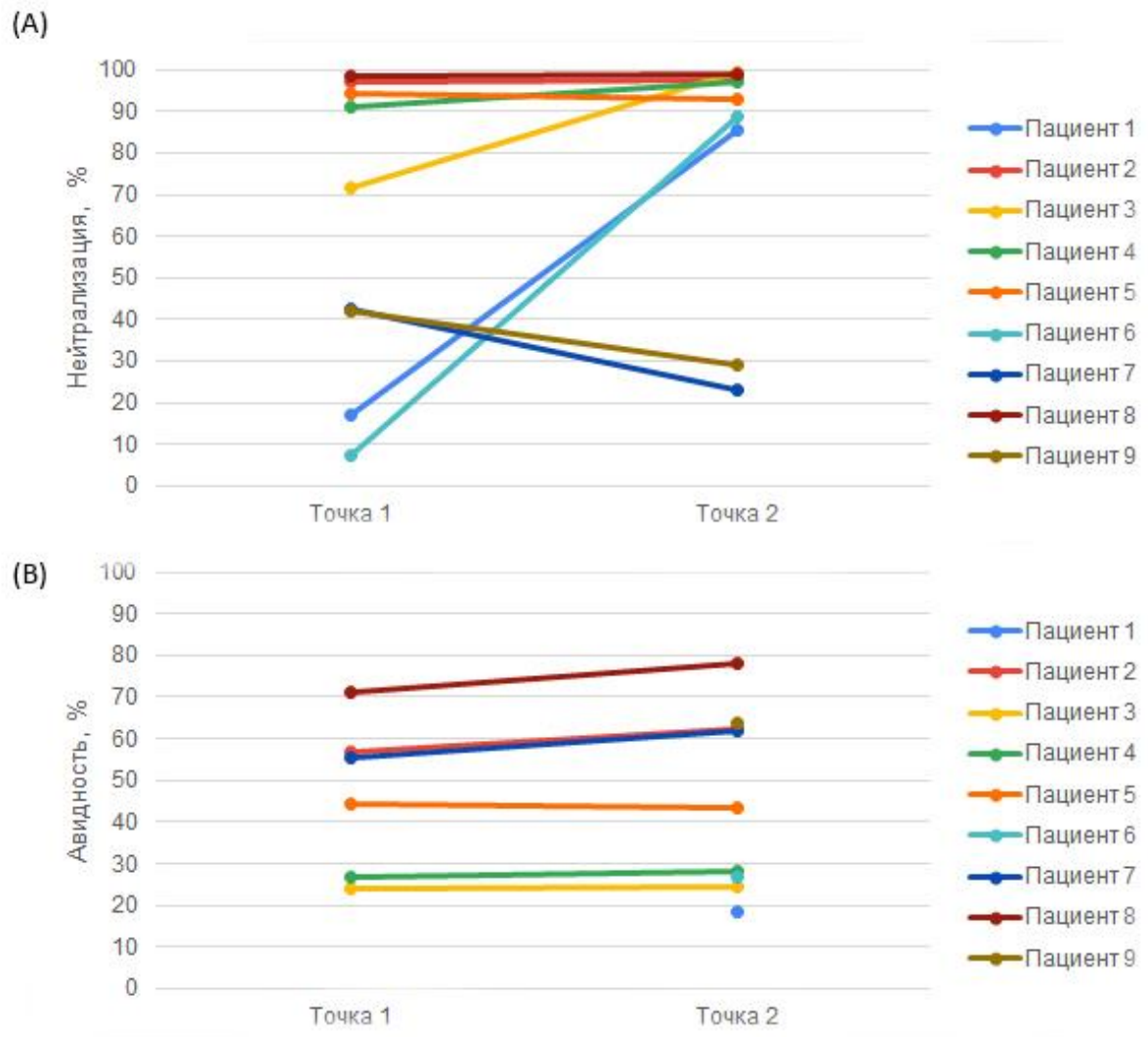


Рисунок 28. Нейтрализующая активность (А) и авидность (В) у вакцинированных заболевших в динамике.

4.3.4. Оценка нейтрализующей активности иммуноглобулинов IgG к RBD и индекса avidности у повторно заболевших COVID-19 для прогнозирования тяжести заболевания

Результаты исследования первично заболевших и реинфицированных больных представлены в таблице 31. Среди больных легкой степени течения COVID-19, перенесших реинфекцию, медиана индекса avidности составила 82,29% [72,29–91,1] по сравнению с первично зараженными больными 37,14% [21,72–62,13] (критерий Манна–Уитни 0,0007, при $p \leq 0,05$) (рисунок 29). Это подтверждает, что через 213 дней в ответ на повторное инфицирование SARS-CoV-2 происходит продукция высокоавидных IgG антител к RBD, что описано ранее и при других вирусных инфекциях [103, 162, 163, 164]. Напротив, у больных с тяжелым течением COVID-19 выявлена низкая avidность IgG как у первично инфицированных (Me ИА 24,99% [22,89–27,05]), так и у реинфицированных пациентов (Me ИА 28,35% [16,63–43,52]) (критерий Манна–Уитни 0,72, при $p \geq 0,05$) (рисунок 30). Можно предположить, что у этих больных не сформировался эффективный постинфекционный гуморальный иммунитет, а созревание В-лимфоцитов не произошло полностью, как это описано для других коронавирусов [103, 165].

Таблица 31. Показатели avidности и уровня IgG к RBD активности у первично заболевших и реинфицированных в зависимости от тяжести течения COVID-19

Показатели	Степень тяжести COVID-19			
	Легкая		Тяжелая	
	Первично заболевшие	Реинфекция	Первично заболевшие	Реинфекция
Количество больных (n)	39	36	82	10

Дни наблюдения Ме дни [95% ДИ]	13 [5–10]	213 [192–229]	10 [7–11]	217 [191–386]
Индекс авидности IgG к RBD, % Ме ИА [95% ДИ]	37,14 [21,72–62,13]	82,29 [72,1–91,1]	24,99 [22,89–27,05]	28.35 [16,63–43,52]
Коэффициент позитивности IgG к RBD Ме КП [95% ДИ]	8,51 [5,3–11,7]	7,93 [5,82–10,77]	> 11,7 [10,45–11,7]	> 11,7 [9,88–11,7]

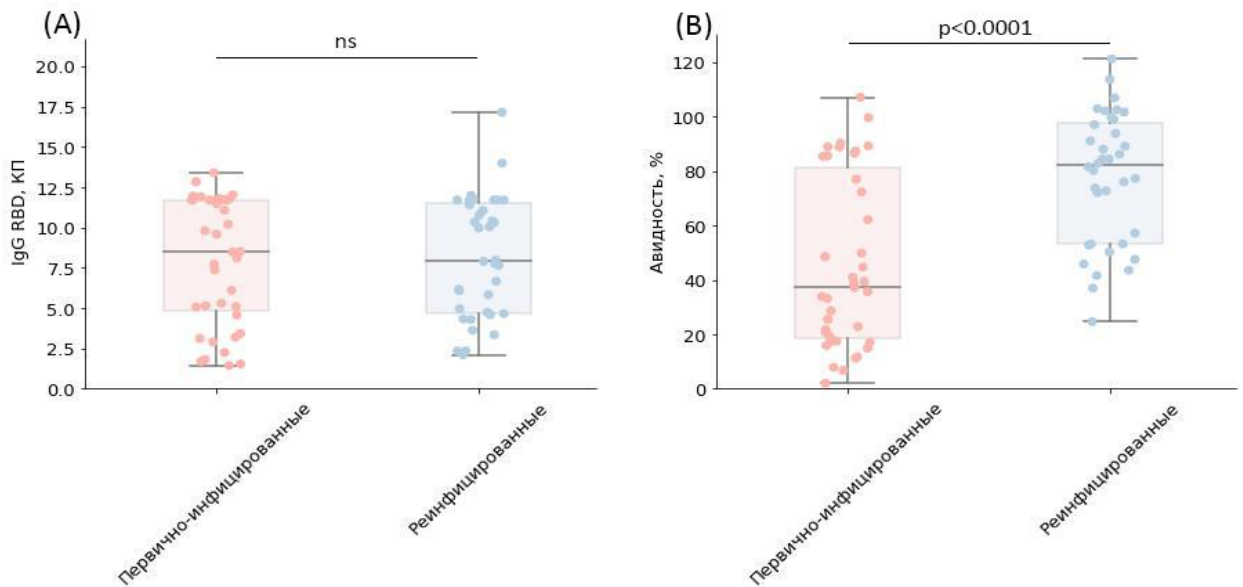


Рисунок 29. Коэффициенты позитивности IgG к RBD и индексы авидности у первично (А) и повторно заболевших (В) легкой формой COVID-19

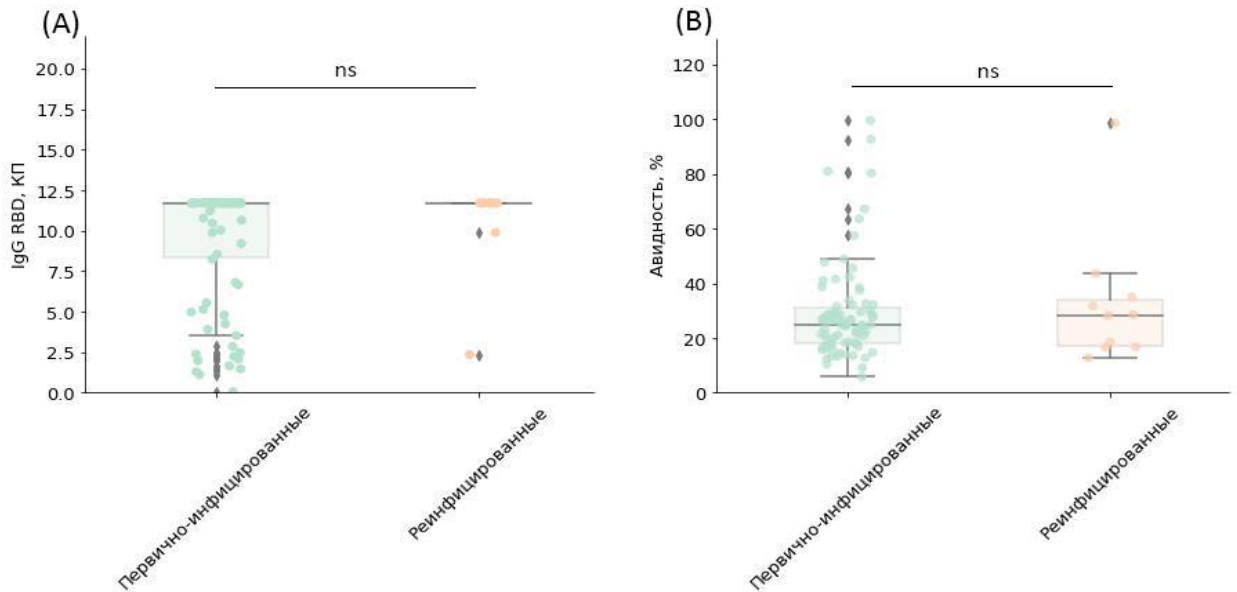


Рисунок 30. Коэффициенты позитивности IgG к RBD и индексы авидности у первично (А) и повторно заболевших (В) тяжелой формой COVID-19

Это привело к сохранению низкой авидности антител (28,4%) несмотря на то, что между первым и вторым заражением у «тяжелых» больных прошел достаточный временной отрезок (217 дней), необходимый для формирования антител. Уровень IgG к RBD не имел статистически значимых различий у первично (Ме КП 8,51 [5,3–11,7]) и повторно заболевших (Ме КП 7,93 [5,82–10,77]) легкой формой COVID-19 (критерий Манна–Уитни 0,79, при $p \geq 0,05$) и, соответственно, при тяжелой степени течения болезни у первично (Ме КП >11,7 [10,45–11,7]) и повторно (Ме КП >11,7 [9,88–11,7]) заболевших (критерий Манна–Уитни 0,2, при $p \geq 0,05$) (рисунки 29, 30).

На основании выполненных исследований можно констатировать, что уровень IgG к RBD, в частности выраженный в коэффициентах позитивности, прогностической значимости в отношении тяжести повторного заболевания не имеет. Индекс авидности можно использовать как критерий для прогнозирования тяжести заболевания: обнаружение высокоавидных антител достоверно свидетельствует о легком течении заболевания при повторном

инфицировании, выявление же низкоавидных антител может прогнозировать утяжеление течения у повторно заболевших COVID-19. Также установлено, что среди первично инфицированных пациентов с легким течением заболевания авидность IgG была несколько выше, чем у пациентов с тяжелым течением болезни, и различия были статистически значимыми (критерий Манна–Уитни 0,025, при $p \leq 0,05$) (таблица 29)

Далее мы провели расчет соответствия результатов определения ИА клиническому течению заболевания. Показано, что индексы авидности у пациентов с легким и тяжелым течением реинфекции имели значимые различия (81,45% против 28,4%, критерий Манна–Уитни $< 0,0001$, при $p \leq 0,05$) (таблица 29). Тест-система, используемая для определения индекса авидности IgG к RBD, позволяет интерпретировать результаты следующим образом: сыворотки «низкой авидности» имеют $ИА \leq 40\%$; сыворотки «высокой авидности» имеют $ИА \geq 50\%$; а интервал от 40 до 50% считается «серой зоной». Среди 36 пациентов с легкой степенью реинфекции 30 имели IgG с высокой авидностью ($ИА \geq 50\%$), у двух были обнаружены антитела с низкой авидностью ($ИА \leq 40\%$) и четыре попали в «серую зону». Из 10 пациентов с тяжелым течением реинфекции один имел IgG антитела к RBD с высокой авидностью ($ИА \geq 50\%$), восемь — с низкой авидностью ($ИА \leq 40\%$), и один относился к «серой зоне». Применив к этим результатам теорему Байеса (неопределенные результаты были исключены), мы получили следующие значения прогностической ценности вероятности ИА. Если IgG к RBD с низкой авидностью ($ИА \leq 40\%$) обнаруживается у повторно заболевшего COVID-19, то в $89 \pm 20,5\%$ вероятен шанс ($p \leq 0,05$), что заболевание будет тяжелым и больному потребуется госпитализация. Если у повторно заболевшего COVID-19 обнаруживаются высокоавидные IgG к RBD ($ИА \geq 50\%$), в $94 \pm 7,9\%$ имеется шанс ($p \leq 0,05$), что течение заболевания будет легким и больному не потребуется госпитализация.

Таким образом, на когортах пациентов, переболевших COVID-19, и вакцинированных добровольцах была изучена динамика созревания аффинности и изменения нейтрализующей активности вирус-специфических IgG. Показано, что спустя 4-6 месяцев после заболевания по сравнению с вакцинированными, не болевшими COVID-19, наблюдается достоверно более высокий уровень IgG к RBD (Me КП 6,8 и 1,7 соответственно) и показатель нейтрализующей активности (Me 61,4% и 30,6%) у переболевших пациентов, не вакцинированных против COVID-19; но при этом отмечается достоверно более высокий индекс avidности у вакцинированных, чем у переболевших (84,6% и 61,4% соответственно). Исходя из этого, можно констатировать, что, несмотря на низкие уровни антител, вакцинация ГамКовидВак приводила к развитию стойкого первичного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти, которые уже могут продуцировать IgG с высокой avidностью и обеспечивать защиту организма при повторном контакте с вирусом. Выработка антител в ходе инфицирования демонстрировала свойства вторичного иммунного ответа, при котором раньше продуцируется высокий уровень IgG антител. Однако в долгосрочном периоде степень созревания аффинитета антител после вакцинации оказывается выше, чем после перенесённой инфекции. Хотя предполагается, что созревание антител повышает их нейтрализующую активность [75], обеспечивая более быструю и эффективную защиту организма, чем при первичном иммунитете, однако в нашей работе корреляции между этими параметрами не выявлено.

Дополнительное исследование формирования иммунного ответа в 11-16 дни болезни у ранее вакцинированных пациентов показывает, что у них выявляется более высокий индекс avidности, чем у первично заболевших (медиана 108% и 20,4%), что в свою очередь свидетельствует о более полном созревании аффинитета вирус-специфических IgG после вакцинации по сравнению с перенесенной инфекцией.

Также доказано, что персистенция антител с низкой авидностью после первичного инфицирования служит «фактором риска» развития повторной инфекции и прогностическим критерием тяжести течения COVID-19. Это требует внимания клиницистов при обосновании показаний к обследованию пациентов с реинфекцией на авидность: в случае индекса авидности менее 40% необходимо тщательное наблюдение за развитием заболевания, поскольку с вероятностью $89 \pm 20,5\%$ у данных больных может развиваться тяжелое течение повторного заболевания и потребуются госпитализация.

Установлено, что вакцинация ГамКовидВак приводит к формированию высокоавидных IgG, которые сохраняются в среднем в течение 6 месяцев наблюдения. Это свидетельствует о наличии маркеров защитной эффективности, по крайней мере, в течение 4-6 месяцев после вакцинации или ранее перенесенного заболевания и об адекватности срока, выбранного для повторной иммунизации на территории России. Однако мы не смогли оценить, для каких групп защитная эффективность может составлять срок меньший, чем 6 месяцев, но исследованные группы вакцинированных заболевших показывают наличие у них низкой авидности, что резко контрастирует с группой здоровых вакцинированных, которые не заболели в течение периода наблюдения. Можно предположить, что низкая авидность IgG к RBD спустя два месяца после вакцинации является одним из потенциальных маркеров для показаний к ранней ревакцинации. Дальнейшие исследования на больших группах позволят подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

На основании проведенных исследований показана целесообразность применения ИФА на выявление IgM+A к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 как метода ранней диагностики COVID-19, диагностическая эффективность

составила 92,3%. Наибольшая выработка антител класса M+A отмечается на 1-10 день болезни у пациентов тяжелого течения заболевания (медиана индекса антител 52,2), что подтверждает более выраженный ранний иммунный ответ у данной группы пациентов. Иммуноглобулины класса G к антигенам нуклеокапсида (Nc) и рецептор-связывающему домену RBD SARS-CoV-2 также начинают формироваться уже на 1-10 день болезни, при этом антитела к Nc обнаруживаются чаще, чем к RBD (ДЭ 62,2% и 52,6% соответственно), что свидетельствует о большей диагностической ценности Nc на ранних этапах развития COVID-19. Низкая avidность антител IgG к RBD ($IA \leq 40\%$) у лиц с реинфекцией COVID-19 с вероятностью $89 \pm 20,5\%$ прогнозирует бóльшую тяжесть течения заболевания и служит абсолютным показанием к госпитализации. При обнаружении высокоавидных антител IgG к RBD ($IA \geq 50\%$) в $94 \pm 7,9\%$ случаев имеется шанс развития легкого течения заболевания, требующего амбулаторного лечения. Отмечено, что в долгосрочном периоде (4-6 месяцев после заболевания) коэффициент позитивности IgG антител к RBD и показатель нейтрализующей активности у переболевших COVID-19 превышает данные параметры у вакцинированных ГамКовидВак (Спутник V), в отличие от индекса avidности, высокий уровень которого у вакцинированных свидетельствует о более полном созревании аффинитета вирус-специфических IgG после вакцинации по сравнению с перенесенной инфекцией, обеспечивая защиту организма при повторном контакте с вирусом. Дальнейшие исследования вируснейтрализующей активности антител класса G к RBD в динамике инфекционного процесса COVID-19 поможет в решении вопроса о сроках вакцинации/ревакцинации здоровых лиц и защите переболевших от повторного заражения. Полученные данные обосновывают включение выявленных показателей оценки гуморального иммунитета в тактику клиничко-лабораторного обследования стационарных больных.

Глава 5. Совершенствование подходов к тактике лабораторного обследования пациентов с COVID-19

Современные подходы к лабораторной диагностике принципиально изменились за последние 10 лет. Подтверждение диагноза с помощью комплексного обследования (клинические, лабораторные данные, результаты дополнительных экспрессных методов исследования) становится неотъемлемой частью постановки этиологического диагноза, что дает возможность контроля над эффективностью проводимой терапии. Будущее диагностики во многом зависит от наличия доступа врачей практического звена здравоохранения к единой электронной базе амбулаторных и стационарных пациентов. Данные, которые врач может оперативно получать из лаборатории, необходимы для своевременной корректировки лечения. Ряд лабораторий в Российской Федерации оснащены высокотехнологичным современным оборудованием, что позволяет оперативно обрабатывать полученные образцы биологических субстратов, хранить их в специально выделенных местах для повторного обследования, уменьшая объем и кратность исследования, необходимого для анализа.

Полученные нами результаты анализа ряда параметров гуморального иммунного ответа у стационарных пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 позволили предложить комплексный подход к диагностике в различные сроки от начала болезни (в динамике заболевания).

Все пациенты, поступающие в стационар, обязательно проходили тестирование на выявление специфической РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР. На 1-10 дни болезни положительные результаты были установлены у 64% находящихся под наблюдением пациентов, при этом вероятность положительного теста ПЦР на 1-10 день болезни значимо выше (хи-квадрат $p=0,05$)), чем после 10 дня болезни (табл. 32).

Таблица 32. Количество положительных результатов ОТ-ПЦР на SARS-CoV-2 на 1-10 и 11-21 дни заболевания у стационарных пациентов

Дни болезни	ПЦР		Хи-квадрат
	Положительная абс. (%)	Отрицательная абс. (%)	
1-10 день (n=194)	125 (64%)	69 (36%)	$p=0,05^*$
после 10 дня (n=12)	3 (25%)	9 (75%)	значимых различий не выявлено

* Вероятность положительного теста ПЦР на 1-10 день болезни значимо выше ($p \leq 0,05$)

Невысокий процент позитивных находок ставил диагноз COVID-19 под сомнение. Причин получения не столь высоких результатов тестирования было несколько:

- на ранних сроках ведения пациентов медицинский персонал в ряде случаев, не имея практических навыков, допускал нарушение методики взятия мазков из носо- или ротоглотки;
- не соблюдались сроки взятия материала, так, исследование мазков из верхних отделов дыхательных путей проводили в разные периоды заболевания;
- полученные и разработанные тест-системы, на ранних этапах вспышки заболевания, не обладали достаточной специфичностью и чувствительностью.

Методика исследования уровня вирусной нагрузки также требует дальнейшей доработки. В представленной таблице 33 показано, что уровни вирусной нагрузки статистически значимо отличались в разные периоды заболевания ($p=0,05$)

В период мониторинга и проведения анализа клинических и лабораторных данных оценку тяжести заболевания стационарных больных проводили согласно критериям ВОЗ (2020 г).

Таблица 33. Вирусная нагрузка и Ct (количество циклов) в разные периоды заболевания.

День болезни	Ct M ± m	Критерий Стьюдента t	Вирусная нагрузка M ± m	Критерий Стьюдента t
1-10 день (n=125)	31,01 ± 2,82	<i>p=0,05</i>	4,90E+06 ± 2,99E+06	значимых различий не выявлено
после 10 дня (n=3)	35,01 ± 0,05		6,66E+02 ± 2,17E+02	

*Значения Ct статистически значимо для 1-10 дня болезни и после 10 дней болезни ($p \leq 0,05$.)

Несмотря на то, что целью нашего исследования не являлось сравнение уровня вирусной нагрузки при разной степени тяжести течения болезни, такие данные были получены, но различия не имели статистической достоверности (табл. 34), что объясняется недостаточностью выборки и требует дополнительного исследования (табл. 34).

Таблица 34. Количество положительных образцов ОТ-ПЦР на SARS-CoV-2 в разные периоды в зависимости от тяжести заболевания.

День болезни	Легкая степень по ВОЗ		Средняя степень по ВОЗ		Тяжелая степень по ВОЗ абс. (%)
	абс.	(%)	абс.	(%)	
1-10 день (N=194)	10	(5)	141	(73)	43 (22)
после 10 дня (N=12)	1	(8)	6	50	5 (42)

* Различия статистически не значимы (хи-квадрат, $p \geq 0,05$)

На основании данных, полученных в результате глубокого анализа ряда параметров гуморального ответа у пациентов с новой коронавирусной

инфекцией (COVID-19), представленных в главе 4, можно предложить алгоритм диагностики, представленный ниже.

Под алгоритмом лабораторной диагностики COVID-19 понимается ряд последовательных действий, направленных на этиологическое подтверждение диагноза с использованием клинико-лабораторных ОТ-ПЦР и ИФА. В основе предлагаемого нами алгоритма лабораторной диагностики лежат следующие принципы:

- ✓ применение единого комплексного подхода для этиологической расшифровки диагноза
- ✓ использование лабораторных экспресс-методов исследования
- ✓ применение различных методов диагностики в разные периоды заболевания
- ✓ оценка ряда параметров гуморального ответа с целью прогнозирования течения болезни и решения вопроса о проведении вакцинации/ревакцинации

5.1. Алгоритм диагностики стационарных пациентов с COVID-19

- На первом этапе комплексная оценка клинико-эпидемиологических и лабораторных данных, результатов дополнительных методов исследования (при необходимости) у стационарных пациентов даст возможность предположить COVID-19. В общем анализе крови с определением параметров: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты, тромбоциты, лейкоцитарная формула. Прогностическими маркерами тяжести течения заболевания считаются: наличие лимфопении и тромбоцитопении. Ряд показателей биохимического анализа крови не дает решающего ответа на вопрос о тяжести инфекционной патологии COVID-19 (за исключением СРБ), но может

использоваться для дифференциальной диагностики при декомпенсации сопутствующих заболеваний, добавочной полиорганной дисфункции или риске развития осложнений. Оценка коагулограммы включала контроль четырех основных параметров: ПВ — протромбиновое время, АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, фибриноген и Д-димер. Значимыми прогностическими маркерами тяжести течения заболевания являются: увеличение Д-димера в 3-4 раза по сравнению с возрастной нормой, удлинение ПВ, особенно при тяжелом течении (снижение % протромбина), и увеличение фибриногена. При оценке клинических проявлений следует учитывать симптомы поражения ЖКТ (диспепсические явления) как вероятный маркер более легкого течения.

- На втором этапе обязательным для этиологического подтверждения диагноза является проведение лабораторного тестирования и исследования мазка из носоглотки с целью индикации РНК SARS-CoV-2 с помощью метода ОТ-ПЦР на 1-10 день болезни.
- Третий этап диагностики: определение индекса антител IgM+IgA на 1-10 день болезни у пациентов с COVID-19 методом ИФА.
- Четвертый этап серологического скрининга (при отрицательных результатах предыдущего): выявление антител класса IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 на 11-21 день заболевания методом ИФА.
- Наблюдение за реконвалесцентами в динамике заболевания (спустя 6 месяцев) и определение уровня нейтрализующих антител класса G к RBD SARS-CoV-2 методом ИФА целесообразно для принятия решения о необходимости вакцинации/ревакцинации.
- Определение и учет индекса авидности (менее 40%) антител класса G к RBD у первично и повторно заболевших COVID-19 с целью прогнозирования течения болезни.

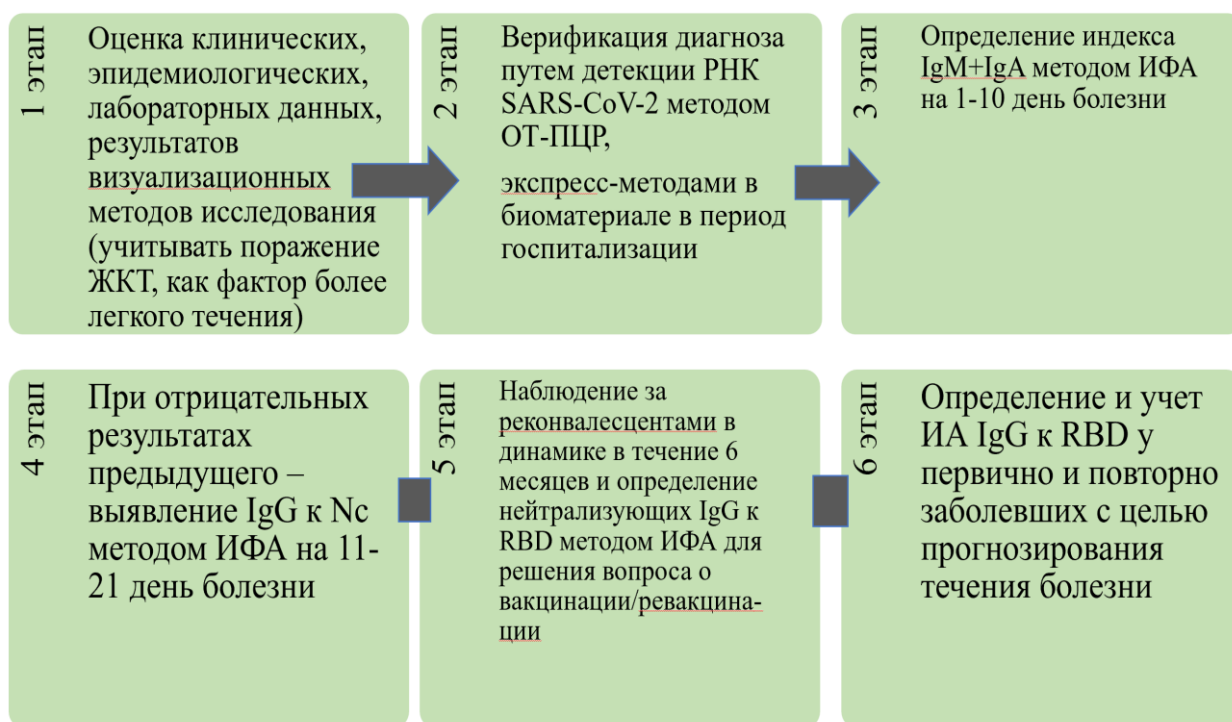


Рис. 31. Алгоритм диагностики COVID-19 у стационарных пациентов

Таким образом, определены основные принципы порядка организации лабораторной диагностики COVID-19. Разработанный порядок организации и проведения лабораторных исследований позволяет оптимизировать тактики обследования больных COVID-19 на основании анализа клинико-лабораторных данных и ряда показателей гуморального ответа в динамике заболевания, что позволит своевременно получать этиологическое подтверждение диагноза COVID-19 и возможность контроля над проводимой терапией.

Заключение

Значимость изучения инфекционных заболеваний сохраняется столетиями. Актуальность инфектологии всегда определяется не только распространенными нозологиями, но и появлением новых (эмерджентных) болезней, которые при изменении экосистемы человечества могут приобретать разрушительный потенциал. Среди инфекционных заболеваний выделяют особо опасные инфекции, их характеризуют высокая контагиозность, быстрота распространения и высокая смертность, ярким примером которой служит новая коронавирусная инфекция на первых этапах пандемии, когда летальность достигала 4,3% и выше.

Встреча человеческой популяции с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) показала мощное влияние вирусов на популяцию, их непредсказуемость и необходимость фундаментального изучения всех аспектов эмерджентных патологий, в том числе и COVID-19.

Накопленный опыт свидетельствует, что клинические проявления болезни варьируют от бессимптомных до ярко клинически выраженных форм. До настоящего времени медицинское сообщество владеет только частью информации о клинических вариантах заболевания, факторах риска тяжелого течения болезни у пациентов с COVID-19, глубокое изучение которых потребует дополнительного анализа и времени.

Результаты двухлетнего наблюдения за пациентами и анализ данных, полученных в ходе собственных исследований, позволил нам подойти к главной цели исследования: обоснованию тактики обследования больных с COVID-19 на базе анализа клинико-лабораторных данных и ряда показателей гуморального ответа.

На первом этапе строгих ограничительных противоэпидемических мероприятий нами был проведен ретроспективный анализ историй болезни

190 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ №4 ДЗМ г. Москвы в период с мая по июнь 2020 года с диагнозом U07.1 «Коронавирусная инфекция, вызванная COVID-19 (подтвержденная)». Целью этого анализа было получить предварительные результаты оценки клинических и лабораторных данных пациентов с COVID-19. В этой группе у 132 (69,5%) пациентов этиологический диагноз был подтвержден обнаружением РНК SARS-CoV-2 в секрете носоглотки методом ОТ-ПЦР. Ретроспективный анализ позволил выделить основные демографические показатели: из 190 пациентов, госпитализированных в среднем на $10,0 \pm 7,4$ день заболевания, 90 (47,4%) составили мужчины, 100 (52,6%) — женщины. Средняя продолжительность пребывания пациентов в стационаре составила $12,5 \pm 4,9$ дня. В структуре госпитализированных среднетяжелое течение болезни наблюдалось у 62,6%, тогда как тяжелое течение — у 71 (37,4%) пациентов. Как и многие инфекционные заболевания, в том числе грипп, новая коронавирусная инфекция протекала тяжело преимущественно у пациентов с коморбидностью, о чем свидетельствуют оценка коморбидности в разных группах тяжести. Частота сочетанной патологии в группе среднетяжелого течения COVID-19 составила 62,2%, а в группе тяжелого течения — 87,3%. Статистический анализ, проведенный в этой группе наблюдения, выявил, что рост числа летальных случаев у пациентов с COVID-19 достоверно коррелировал с возрастом и коморбидностью (доверительный интервал по критерию χ^2 $p=0,002$).

Самостоятельный мониторинг пациентов при работе в «красных зонах» был проведен в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г. Под нашим ежедневным наблюдением находилось 206 стационарных пациентов, проходивших лечение в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» с диагнозом «Коронавирусная инфекция, COVID-19, вирус идентифицирован» (U07.1 по МКБ). Наблюдения проводились преимущественно во вторую и третью волны пандемии, в то

время, когда наиболее распространенным вариантом штамма SARS-CoV-2 являлся Дельта (B.1.617.2, G/452R.V3, 21A). В этой группе этиологический диагноз был подтвержден у 63,2% пациентов путем лабораторного исследования назофарингеальных образцов на наличие РНК SARS-CoV-2. У остальных 36,8% пациентов диагноз COVID-19 был подтвержден комплексно (при повторном исследовании мазка, объективном обследовании, по результатам компьютерной томографии (КТ) легких). Из 206 пациентов при поступлении изменения на КТ наблюдались у 190 пациентов, что составляет 92,2%. Сравнительный анализ поражения легких в группах среднетяжелого (9,1%) и тяжелого течения (34,0%) показал, что достоверно ($p < 0,001$) чаще КТ 3 встречалось в группе тяжелого течения.

Как и в прошлой выборке, по гендерным признакам пациенты распределились приблизительно в равных соотношениях: мужчины — 96 человек (46,6%); женщины — 110 человек (54,4%). Средний возраст пациентов составил 66 ± 14 лет. Средняя длительность госпитализации — 10 ± 5 дней.

Основную группу стационарных пациентов составили больные, имеющие среднетяжелое течение. Клиническая картина COVID-19 принципиально не изменилась при наблюдении за течением болезни во вторую и третью волны пандемии. Болезнь у стационарных пациентов характеризовалась полиморфизмом клинических проявлений.

Сравнительная оценка клинической картины у пациентов с легким течением заболевания показала, что в этой группе чаще регистрируются боль в животе (9%) и диарея (36%) в сравнении с пациентами со средним (1% и 18% соответственно) и тяжелым (6% и 8% соответственно) течением заболевания ($p \leq 0,05$). У больных с легким течением достоверно чаще встречалась диарея ($p \leq 0,05$).

При оценке гематологических показателей в динамике заболевания было показано, что имеется значительная корреляция между повышенным количеством лейкоцитов и сниженным количеством лимфоцитов у пациентов с тяжелыми случаями COVID-19 по сравнению с пациентами с легкими случаями. Отдельно был проведен Анализ динамики изменения уровня лимфоцитов в зависимости от тяжести с помощью критерия Стьюдента удостоверяет нас, что чем сильнее тяжесть заболевания, тем ниже процентное содержание лимфоцитов. У пациентов, имеющих летальный исход, отмечалась достоверно выраженная лимфопения ($p < 0,01$) на 11-21 день болезни.

Анализ сопутствующей патологии в группах с различной тяжестью течения COVID-19 показал, что некоторые коморбидные заболевания можно рассматривать в качестве факторов риска тяжелого течения. По нашим данным, такие сопутствующие патологии как: ГБ (коэффициент Пирсона составляет 0,684, сильная связь, $p \leq 0,05$), ССЗ (коэффициент Пирсона составляет 0,355, средняя сила связи, $p \leq 0,05$), СД2 (коэффициент Пирсона составляет 0,258, средняя сила связи, $p \leq 0,05$) коррелировали с отягощением состояния пациентов, что соотносится с данными ряда международных исследователей. Анализ представленных данных показал, что нарушение обоняния чаще встречается у пациентов с COVID-19 без сопутствующей патологии. Из 206 пациентов с COVID-19, поступивших в стационар в период с ноября 2020 г. по апрель 2021 г., в отделении ОРИТ находилось 19 (9,2%) пациентов, из которых 13 (6,3%) имели летальный исход. Все пациенты были госпитализированы на 6 ± 2 день болезни. Средний возраст пациентов составил 74 ± 14 лет ($p \leq 0,05$). Все пациенты имели коморбидные состояния. Наиболее значимыми по частоте встречаемости были: гипертоническая болезнь (94,7%), сердечно-сосудистые заболевания (84,2%), хронические заболевания почек (52,6%). Наиболее частой причиной летального исхода являлся острый

синдром респираторного расстройства (ОРДС — 61,5%), значимый фактор — коагулопатия в исходе ТЭЛА (30,7%).

Нами была дана оценка клинических постковидных проявлений у реконвалесцентов. Наблюдение осуществлялось в динамике, начиная со 118 до 155 дня от момента начала болезни. Средний возраст наблюдаемых пациентов составил $55,8 \pm 2,1$ года, с небольшим преобладанием мужчин ($n=11$, 52,4%). Пациенты были разделены на две группы по возрасту: группа в возрасте 38–49 лет и группа 53+ лет. Наиболее частыми постковидными проявлениями в обеих группах были: астено-вегетативные, депрессивные состояния, а также системные проявления (миалгии, артралгии, конъюнктивиты). Нами не было выявлено статистически значимых различий по частоте возникновения осложнений в различных возрастных когортах. Однако отмечена тенденция к увеличению частоты системных проявлений (в виде миалгий, артралгий, кожных проявлений) среди пациентов группы 53+ ($p=0,053$). В группе пациентов 38–49 лет системные проявления наблюдались у 3 человек (50%), а в группе «53+» — у 14 (93%).

Проведённые серологические исследования (ИФА) по оценке раннего формирования гуморального иммунитета подтверждают выработку специфических IgM и IgA антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2. На 1-10 день после инфицирования IgM+IgA определялись у 72,2% пациентов, на 11-21 день статистически достоверно возрастали до 97,7% ($p \leq 0,05$). Показатель диагностической эффективности ИФА на выявление IgM+IgA составил $92,3 \pm 2,0\%$ на 1-10 день болезни и $98,4 \pm 0,89\%$ на 11-21 день болезни.

На 1-10 день болезни у пациентов с тяжелым течением болезни формировался максимальный индекс антител IgM+IgA (53,34 [ДИ 45,88–60,80]) по сравнению с легким (12,45 [ДИ 6,80–18,17]) и среднетяжелым течением заболевания (26,69 [ДИ 20,03–33,34]) ($p_{\text{лег-тяж}}=0,002$, $p \leq 0,05$; $p_{\text{ср-тяж}}=0,029$, $p \leq 0,05$). На 11-21 день болезни не выявлено значимых изменений в

показателях индекса антител при легком (39,67 [ДИ 9,15–70,19]), среднетяжелом (37,22 [ДИ 31,26–43,19]) и тяжелом (43,44 [ДИ 12,87–74,02]) течении болезни ($p_{\text{лег-ср}}=1,0$, $p_{\text{лег-тяж}}=1,0$, $p_{\text{ср-тяж}}=1,0$, $p \geq 0,05$), при этом медианное значение индекса антител увеличивалось в 4,8 и 1,9 раз соответственно для лёгкого и среднетяжелого течения и характеризовалось тенденцией к снижению при тяжелом течение болезни. На основании полученных результатов можно определенно говорить о раннем и более выраженном иммунном ответе у пациентов с тяжёлым течением заболевания. У групп же больных со среднетяжелым и лёгким течением COVID-19 формирование комплекса IgM+IgA антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 было более выражено на 11-21 день болезни и в большей степени при лёгком течении заболевания. Иммуноглобулины класса G к нуклеокапсидному белку (Nc) и рецептор-связывающему домену шиповидного белка (S1 RBD) коронавируса SARS-CoV-2 начинали формироваться у пациентов уже с 1 по 10 день появления симптомов болезни, при этом уровень антител к Nc обнаруживался чаще, чем к RBD, частота составляла соответственно 38,5% и 22,9% ($p \leq 0,05$). С 11 по 21 день болезни уровни антител увеличивались в 2,5-4,0 раза, выравнивались по отношению к рассматриваемым антигенам и не коррелировались между исследуемыми группами пациентов по тяжести заболевания ($p \geq 0,05$). Показатели диагностической эффективности ИФА на IgG к Nc SARS-CoV-2 на 1-10 день болезни составили $62,2 \pm 3,6\%$, на 11-21 день — $96,9 \pm 1,6\%$, достоверно превышая ($p \leq 0,05$) аналогичные показатели в отношении IgG к RBD SARS-CoV-2 ($52,6 \pm 3,7\%$ и $95,1 \pm 2,0\%$ соответственно). Это может указывать на более раннее формирование иммунного ответа у заболевших на нуклеокапсидный белок вируса SARS-CoV-2. На 11-21 день болезни установлены значимые различия медианных показателей коэффициента позитивности IgG к RBD и IgG к Nc у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания ($p \leq 0,05$), что

свидетельствует о формировании более выраженного иммунного ответа при данных формах тяжести.

На когортах пациентов, первично заболевших COVID-19, повторно инфицированных SARS-Cov-2, заболевших COVID-19 спустя две недели после вакцинации и «здоровых» лиц, получивших полный курс вакцинации, изучена динамика созревания аффинности антител по показателю индекса avidности и изменения нейтрализующей активности специфических IgG к RBD в тесте на ингибирование взаимодействия антител с рецептором ангиотензин-превращающего фермента ACE2 вируса.

Спустя две недели после появления симптомов у 95,6% переболевших формировалась высокая нейтрализующая активность (Me КП 87,7 [83,8–88,7]%) и низкая avidность антител IgG против RBD (Me ИА 20,4 [15,8–25,9]%). Через 4-6 месяцев после выздоровления у 78% пациентов происходило созревание аффинности RBD к IgG (ИА>50%) и, хотя общая концентрация IgG к RBD и Nc снизилась в 1,5-2 раза, нейтрализующая активность антител оставалась на стабильно высоком уровне ($p \geq 0,05$).

В отношении тяжести течения заболевания отмечено, что у первично и повторно заболевших уровень нейтрализующей активности IgG к RBD не имел статистически значимых различий ($p \geq 0,05$). Так, среди первично инфицированных пациентов с легким течением avidность IgG была выше, чем у пациентов с тяжелым течением болезни ($p \leq 0,05$). Подобная тенденция нами выявлена и при реинфекции. Медиана индекса avidности у пациентов с легким течением заболевания была в 2,9 раза выше по сравнению с тяжелым течением, что составило соответственно 82,29 [72,29 -91,1]% и 28,35 [16,63-43,52]% ($p \leq 0,05$). Применив к этим результатам теорему Байеса (неопределенные результаты были исключены), мы получили следующие значения прогностической способности индекса avidности. Если IgG к RBD с низкой avidностью (ИА \leq 40%) обнаруживаются у повторно заболевшего

COVID-19, то с вероятностью $89 \pm 20,5\%$ ($p \leq 0,05$) заболевание будет тяжелым и больному потребуется госпитализация. Если у повторно заболевшего COVID-19 обнаруживаются высокоавидные IgG к RBD (ИА $\geq 50\%$), в $94 \pm 7,9\%$ имеется шанс ($p \leq 0,05$), что течение заболевания будет легким и больному будет достаточно амбулаторного лечения.

В группе иммунизированных вакциной ГамКовидВак пациентов нейтрализующая активность достоверно снизилась с медианного значения коэффициента ингибирования ($57,4$ [ДИ $44,9-79,6$])% в первой точке до $30,6$ [ДИ $25,4-39,6$]% во второй точке ($p \leq 0,05$). При этом авидность антител сохранялась на достаточно высоком уровне $108-84,6\%$, что свидетельствует о завершенности созревания аффинитета у всех вакцинированных на горизонте 147 дней после вакцинации (первая точка наблюдения). В то же время в группе вакцинированных ГамКовидВак пациентов с подтверждённым диагнозом COVID-19 у $66,7\%$ мы отмечали низкий уровень авидности. Однако необходимы дальнейшие исследования вируснейтрализующей активности антител класса G к RBD в динамике инфекционного процесса COVID-19 для решения вопроса о сроках вакцинации/ревакцинации здоровых лиц и защите переболевших от повторного заражения. Полученные данные обосновывают целесообразность включения выявленных показателей оценки гуморального иммунитета в тактику клиничко-лабораторного обследования стационарных больных.

Выводы

1. COVID-19 характеризуется полиморфизмом клинических проявлений. Наиболее частыми клиническими проявлениями у наблюдаемых стационарных больных были: симптомы интоксикации (100%), одышка (77%), сухой кашель (73%). Поражение ЖКТ (36%) с развитием диспепсического синдрома коррелирует преимущественно с легким течением болезни.

2. Тяжелое течение COVID-19 достоверно чаще имело место у пациентов старше 60 лет с наличием гипертонической болезни (92,1%), сердечно-сосудистой патологии (60,2%), сахарного диабета 2 типа (30,1%). Установлено, что у пациентов с тяжелым течением достоверно чаще отмечалась выраженная лимфопения и тромбоцитопения. ($p < 0,05$).
3. Диагностическая эффективность метода ИФА для обнаружения IgM+IgA к S-белку SARS-CoV-2 составляет $92,3 \pm 2,0\%$ на 1-10 день болезни и $98,4 \pm 0,9\%$ на 11-21 день болезни. Индекс антител IgM+IgA был максимальным на 1-10 день болезни у пациентов с тяжелым течением COVID-19 по сравнению с таковым у пациентов с легким и среднетяжелым течением болезни ($p \leq 0,05$); и не имел достоверных различий на 11-21 день болезни ($p \geq 0,05$).
4. Диагностическая эффективность метода ИФА с определением антител IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 составляет $62,2 \pm 3,6\%$ на 1-10 день болезни и $96,9 \pm 1,6\%$ на 11-21 день болезни, превышая аналогичные показатели в отношении RBD домена ($52,6 \pm 3,7\%$ и $95,1 \pm 2,0\%$ соответственно).
5. В группе первично и повторно заболевших лиц с тяжелым течением болезни индекс авидности был в 1,5-2,9 раза ниже, чем у пациентов с легким течением COVID-19. Низкий индекс авидности антител IgG к RBD (менее 40%) достоверно коррелирует с высокой вероятностью тяжелого течения у пациентов с COVID-19 и может служить дополнительным прогностическим фактором.
6. У реконвалесцентов через 4-6 месяцев сохраняется высокая нейтрализующая активность антител IgG к RBD (Me 61,4%). Исследование уровня нейтрализующих антител в динамике заболевания имеет определенное значение в решении вопроса о вакцинации/ревакцинации против COVID-19.

Практические рекомендации

С целью повышения эффективности клинической и лабораторной диагностики у стационарных пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) рекомендовано:

1. При оценке тяжести течения COVID-19 учитывать совокупные критерии: возраст пациентов (старше 60 лет), а также наличие гипертонической болезни, патологии сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета 2 типа. Доминирование в клинической симптоматике диспептических явлений может свидетельствовать о более легком течении COVID-19.
2. Внедрить дополнительные методы экспресс-диагностики для индикации РНК SARS-CoV-2 вместе с широко применяемым на практике ОТ-ПЦР (средняя эффективность которого составила - 64%). Для повышения эффективности ОТ-ПЦР внедрить методологию взятия биоматериала у пациентов с COVID-19 в практическое здравоохранение.
3. С целью повышения этиологической расшифровки новой коронавирусной инфекции рекомендовать более расширенное использование метода ИФА, позволяющего обнаружить специфические IgM+IgA в динамике заболевания; а также антитела класса G к нуклеокапсиду с 11 дня заболевания и позже у пациентов с COVID-19.
4. Диагностическим критерием определения тяжести инфекционного процесса может служить оценка индекса avidности G антител к RBD у стационарных пациентов. Вероятность тяжелого течения COVID-19 увеличивается при показателях avidности менее 40%.
5. Для решения вопроса о проведении вакцинации или ревакцинации у переболевших в индивидуальном порядке необходима оценка нейтрализующей активности антител IgG к RBD-домену SARS-CoV-2.

6. Предложен усовершенствованный алгоритм диагностики COVID-19 у стационарных пациентов Предложенный алгоритм диагностики COVID-19:

- На первом этапе комплексная оценка клиническо-эпидемиологических и лабораторных данных, результатов дополнительных методов исследования (при необходимости) у стационарных пациентов даст возможность предположить COVID-19. В общем анализе крови с определением параметров: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты, тромбоциты, лейкоцитарная формула. Прогностическими маркерами тяжести течения заболевания считаются: наличие лимфопении и тромбоцитопении. Ряд показателей биохимического анализа крови не дает решающего ответа на вопрос о тяжести инфекционной патологии COVID-19 (за исключением СРБ), но может использоваться для дифференциальной диагностики при декомпенсации сопутствующих заболеваний, добавочной полиорганной дисфункции или риске развития осложнений. Оценка коагулограммы включала контроль четырех основных параметров: ПВ — протромбиновое время, АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, фибриноген и Д-димер. Значимыми прогностическими маркерами тяжести течения заболевания являются: увеличение Д-димера в 3-4 раза по сравнению с возрастной нормой, удлинение ПВ, особенно при тяжелом течении (снижение % протромбина) и увеличение фибриногена. При оценке клинических проявлений учитывать симптомы поражения ЖКТ (диспепсические явления) как вероятного фактора более легкого течения.
- На втором этапе обязательным для этиологического подтверждения диагноза является проведение лабораторного тестирования и исследования мазка из носоглотки с целью индикации РНК SARS-CoV-2 с помощью метода ОТ-ПЦР или экспресс-методами в период госпитализации..

- Третий этап диагностики: определение индекса антител IgM+IgA на 1-10 день болезни у пациентов с COVID-19 методом ИФА.
- Четвертый этап серологического скрининга (при отрицательных результатах предыдущего): выявление антител класса IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 на 11-21 день заболевания методом ИФА.
- Наблюдение за реконвалесцентами в динамике заболевания (спустя 6 месяцев) и определение уровня нейтрализующих антител класса G к RBD SARS-CoV-2 методом ИФА целесообразно для решения вопросов о необходимости вакцинации/ревакцинации.
- Определение и учет индекса avidности (менее 40%) антител класса G к RBD у первично и повторно заболевших COVID-19 с целью прогнозирования течения болезни.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты полученных исследований позволяют определить перспективные направления дальнейшей разработки темы:

- необходимо продолжить дальнейшие исследования по изучению avidности циркулирующих антител при COVID-19 для широкого внедрения в практическое здравоохранение;

- дальнейшее изучение клинического течения, анализ и мониторинг факторов, определяющих тяжесть течения, позволит совершенствовать подходы к оказанию медицинской помощи пациентам с COVID-19;

- дальнейшее изучение особенностей гуморального ответа при COVID-19 открывает перспективы внедрения в практику высокоэффективных методов этиологической диагностики.

Список использованных сокращений

ИФА	Иммуноферментный анализ
ОТ-ПЦР	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
COVID-19	Коронавирусная инфекция 2019
ГБ	Гипертоническая болезнь
БА	Бронхиальная астма
СД 2 типа	Сахарный диабет 2 типа
ССЗ	Сердечно-сосудистые заболевания
SARS-CoV-2	Тяжелый острый респираторный синдром, связанный с коронавирусом 2
IgM	Иммуноглобулин класса М
IgA	Иммуноглобулин класса А
S-белок	Спайковый белок
IgG RBD	Иммуноглобулин класса G к RBD
IgG Nc	Иммуноглобулин класса G к нуклеокапсиду
ИА	Индекс авидности
ХСН	Хроническая сердечная недостаточность

ХГИМ	Хроническая ишемия головного мозга
ОДН	Острая дыхательная недостаточность
ОРДС	Острый респираторный дистресс-синдром
ДВС	Диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ОРВИ	Острая респираторная вирусная инфекция
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
КТ ОГК	Компьютерная томография органов грудной клетки
КП	Коэффициент позитивности
Ct	Cycle threshold – количество циклов

Список литературы

1. Кутырев В.В. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: Модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий/ В.В. Кутырев, А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, В.А. Сафронов, И.Г. Карнаухов, А.В. Иванова, С.А. Щербакова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – №1. – С. 6–13.
2. Шахмарданов М.З. Эпидемиология COVID-19/ М.З. Шахмарданов, В.В. Никифоров, А.А. Скрыбина, Ю.Н. Томилин, А.С. Абусуева, С.В. Бурова// Эпидемиология и инфекционные болезни – 2021. – Т. 26. – №1. – С. 5–14.
3. Никифоров В.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты / В.В. Никифоров, Т.Г. Суранова, Т.Я. Чернобровкина, Я.Д. Янковская, С.В. Бурова // Архивъ внутренней медицины. – 2020. – Т.10, № 1. – 87–93.
4. Платонова Т.А. Особенности формирования гуморального иммунитета у лиц с различными клиническими проявлениями COVID-19/ Т.А. Платонова, А.А. Голубкова, Е.А. Карбовничая, С.С. Смирнова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2021.– Т.20, № 1. – 20–25.
5. Ciotti M. SARS-CoV-2 Infection and the COVID-19 Pandemic Emergency: The Importance of Diagnostic Methods // Chemotherapy. 2021. Vol. 66, № 1-2. P. 17–23.
6. Tan A.S. The Virological, Immunological, and Imaging Approaches for COVID-19 Diagnosis and Research // SLAS Technol. 2020. Vol. 25, № 6. P. 522-544.

7. Deeks J.J. Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2 // Cochrane Database Syst. Rev. 2020. Vol. 6, № 6. P. CD013652.
8. Denning D. Non-infectious status indicated by detectable IgG antibody to SARS-CoV-2. // Br. Dent J. 2020. Vol. 229. P. 521–524.
9. Wang D. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China // JAMA. 2020. Vol. 323, № 11. P. 1061–1069.
10. Mehra M.R. Cardiovascular Disease, Drug Therapy and Mortality in Covid-19 // N. Engl. J. Med. 2020. Vol. 382, № 25. P. e102.
11. Wang C. A novel coronavirus outbreak of global health concern // Lancet. 2020. Vol. 395, № 10223. P. 470–473.
12. Liu K. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei province // Chin. Med. J. 2020. Vol. 133, № 9. P. 1025–1031.
13. Старшинова А.А. Новая коронавирусная инфекция: особенности клинического течения, возможности диагностики, лечения и профилактики инфекции у взрослых и детей / А.А. Старшинова, Е.А. Кушнарёва, А.М. Малкова, И.Ф. Довгальук, Д.А. Кудлай // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – №19 (2). – С.123–131.
14. Huang C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // Lancet. 2020. Vol. 395, № 10223. P. 497-506.
15. Chen N. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study // Lancet. 2020. Vol. 395, № 10223. P. 507–513.

16. Guan W.J. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 18. P. 1708–1720.

17. Колобухина Л.В Клинико-лабораторный профиль пациентов с COVID-19, госпитализированных в инфекционный стационар г. Москвы в период с мая по июль 2020 года / Л.В. Колобухина, О.А. Бургасова., Л.А. Краева, В.А. Гущин, Е.И. Бурцева, И.С. Кружкова, И.Н. Хлопова, Л.Н. Меркулова, Н.А. Кузнецова, Е.В. Шидловская, Д.А. Дворкина, В.Б. Тетова, В.В. Бакалин, М.А. Одноралов, Л.В. Генералова, А.Р. Хайруллина, Н.А. Антипят, А.В. Шагаев, О.Е. Амброси, Е.И. Келли, Е.Е. Ушакова, С.В. Сметанина // *Инфекционные болезни.* – 2021. – Т.19. – №2. – С.5–15.

18. Spinato G. Alterations in Smell or Taste in Mildly Symptomatic Outpatients with SARS-CoV-2 Infection // *JAMA.* 2020. Vol. 323, №20. P. 2089–2090.

19. Giacomelli A. Self-reported olfactory and taste disorders in SARS-CoV-2 patients: a cross-sectional study // *Clin. Infect. Dis.* 2020. Vol. 71, № 15. P. 889–890.

20. Tong J.Y. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2020. Vol. 163, № 1. P. 3-11.

21. Tolksdorf K. Influenza-associated pneumonia as reference to assess seriousness of coronavirus disease (COVID-19) // *Euro Surveill.* 2020. Vol. 25, № 11. P. 2000258.

22. Weston S. COVID-19: Knowns, Unknowns, and Questions // *mSphere.* 2020. Vol. 5, № 2. P. e00203-e00220.

23. Wang Y. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *Lancet.* 2020. Vol. 24, № 20. P. 30183–30185.

24. Воробьев П.А. Постковидный синдром [Электронный ресурс] / П.А. Воробьев //Лекция профессора Воробьева П.А. – 2021. – Режим доступа: <https://youtu.be/FB4EGWgb4VQ>
25. Thorsten R. Post-COVID-19 Fatigue: Potential Contributing Factors // *Brain Sci.* 2020. Vol. 10, № 12. P. 1012.
26. Guan W. J. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol. 55, № 5. P. 2000547.
27. Grasselli G. Risk factors associated with mortality among patients with COVID-19 in intensive care units in Lombardy, Italy // *JAMA Intern. Med.* 2020. Vol. 180, № 10. P. 1345–1355.
28. Docherty A.B. Features of 20133 UK patients in hospital with COVID-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study // *BMJ.* 2020. Vol. 369. P. m1985.
29. Schiffrin E.L. Hypertension and covid-19 // *American Journal of Hypertension.* 2020. Vol. 33, № 5. P. 373-374.
30. Bansal I.M. Cardiovascular disease and covid-19 // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2020. Vol. 14, № 3. P. 247–250.
31. Zhou F. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with covid-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study // *The Lancet.* 2020. Vol. 395, № 10229, P. 1054–1062.
32. Xiong T.Y. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications // *European Heart Journal.* 2020. Vol. 41, № 19. P. 1798–1800.
33. Li B. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on covid-19 in China // *Clinical Research in Cardiology.* 2020. Vol. 109, № 5. P. 531–538.

34. Gansevoort R.T. CKD is a key risk factor for COVID-19 mortality // *Nat. Rev. Nephrol.* 2020. Vol. 16, № 12. P. 705–706.
35. Стронгин Л.Г. Особенности течения COVID-19 у коморбидных пациентов с ожирением и дисгликемиями / Л.Г. Стронгин, К.Г. Корнева, А.В. Петров, Т.А. Некрасова, Э.А. Мавиа, Д.В. Беликина, Е.С. Малышева, О.В. Мельниченко // *Российский кардиологический журнал.* – 2022 – 27(3):4835. – С. 32–38.
36. Митьковская Н.П. Коронавирусная инфекция COVID-19 (обзор международных научных данных) / Н.П. Митьковская, И.А. Карпов, Г.П. Арутюнов, Е.А. Григоренко, Д.Ю. Рузанов, Т.В. Статкевич, Е.И. Тарловская // *Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски.* – 2020 – Т. 4 – № 1. – С. 784–815.
37. Ganatra S. The Novel Coronavirus Disease (COVID-19) Threat for Patients with Cardiovascular Disease and Cancer // *JACC CardioOncol.* 2020. Vol. 2, № 2. P. 350–355.
38. Siddiqui H.K. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical- therapeutic staging proposal // *J. Heart Lung Transplantation.* 2020. Vol. 39, № 5. P. 405–407.
39. Henry B.M. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection // *Int. Urol. Nephrol.* 2020. Vol. 52, № 6. P. 1193–1194.
40. Cheng Y. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19 // *Kidney Int.* 2020. Vol. 97, № 5. P. 829–838.
41. Guan W.J. Comorbidity and its impact on 1590 patients with Covid-19 in China: A nationwide analysis // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol. 55, № 5. P. 2000547.

42. Yang J. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. № 94. P. 91–95.
43. Генералова Л.В. COVID-19: клиническая характеристика и исходы в зависимости от коморбидной патологии / О.А. Бургасова, Л.В. Колобухина, В.Б. Тетова, В.А. Гуцин, Г.Г. Мелконян, Е.А. Генералов // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2022. – Т.17 – №3. – С.15–18.
44. Chen Y. Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity // *MedRxiv.* 2020.
45. Ruan Q. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China // *Intensive Care Med.* 2020. Vol. 46, № 5. P. 846–848.
46. Liang T. Handbook of COVID-19 prevention and treatment. // Hangzhou: Zhejiang University Press. 2020. P. 68.
47. Morlton C.L. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections // *Clin. Microbiol. Rev.* 2019. Vol. 32, № pp. 28–42.
48. Tang N. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia // *J. Thromb. Haemost.* 2020. Vol. 18, № 4. P. 844–847.
49. Thachil J. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 // *J. Thromb Haemostasis.* 2020. Vol. 18, № 5. P. 1023–1026.
50. Gaunt E.R. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel

multiplex real-time PCR method // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 8. P. 2940–2947.

51. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 3 March 2020. [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---3-march-2020> (дата обращения 29.07.2022)

52. Phylogeny of SARS-like betacoronaviruses including novel coronavirus SARS-CoV-2. [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://nextstrain.org/groups/blab/sars-like-cov> (дата обращения 29.07.2022)

53. Cevik M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2 // BMJ. 2020. Vol. 371. P. m3862.

54. Rossi G.A. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases // Infection. 2020. Vol. 48, № 5. P. 665–669.

55. Zeng W. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. Vol. 527, № 3. P. 618–623.

56. Swadling L. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2 // Nature. 2022. Vol. 601, № 7891. P. 110–117.

57. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. М.: Мед. информ. агентство, 2003. – 236 с.

58. Соловьева А.С. Противовирусный иммунитет / А.С. Соловьева // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – Выпуск 56. – Хабаровск, 2015. – С.113–117.

59. Костинов М.П. Иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2 как основа для выбора патогенетической терапии / М.П.Костинов // Иммунология. – 2020. – Т. 41, № 1. – С. 83–91.
60. Cameron M.J. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS) // *Virus Res.* 2008. Vol. 133, № 1. P. 13–19.
61. Braciale T.J. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. Vol. 12, № 4. P. 295–305.
62. Haslbauer J.D. Histomorphological patterns of regional lymph nodes in COVID-19 lungs // *Pathologe.* 2021. Vol. 42, № November. P. 89–97.
63. Moon C. Fighting COVID-19 exhausts T cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. Vol. 20, № 5. P. 277.
64. Thevarajan I. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19 // *Nat. Med.* 2020. Vol. 26, № 4. P. 453–455.
65. Shi Y. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses // *Cell Death Differ.* 2020. Vol. 27, № 5. P. 1451-1454.
66. Russell B. Associations between immune-suppressive and stimulating drugs and novel COVID-19-a systematic review of current evidence // *Ecancermedalscience.* 2020. Vol. 14. P. 1022.
67. Waffarn E.E. Protective B cell responses to flu – no fluke // *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, № 7. P. 3823–3829.
68. Li G. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349, № 5. P. 508–509.
69. Guo L. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19) // *Clin. Infect. Dis.* 2020. Vol. 71, № 15. P. 778–785.

70. Wu L.P. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome // *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 13, № 10. P. 1562–1564.

71. Qu J. Profile of IgG and IgM antibodies against Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // *Clin. Infect. Dis.* 2020. Vol. 71, № 16. P. 2255–2258.

72. Закурская В.Я. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19 / В.Я. Закурская, Л.П. Сизякова, М.В. Харитонова, С.В. Шлык // *Иммунология.* – 2022.– Т. 43, № 1. – С.71–77.

73. Zhou C. Evaluation of serum IgM and IgG antibodies in COVID-19 patients by enzyme linked immunosorbent assay // *J. Med. Virol.* 2021. Vol. 93, № 5. P. 2857–2866.

74. Hsueh P.R. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus // *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. Vol. 10, № 12. P. 1062–1066.

75. Dan J.M. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection // *Science.* 2021. Vol. 371, № 6529. P. eabf4063.

76. Mahajan A. Value and Validity of Coronavirus Antibody Testing // *Pain Physician.* 2020. Vol. 23, 4S. P. S381–S390.

77. Lu L. Antibody response and therapy in COVID-19 patients: what can be learned for vaccine development? // *Sci. China Life Sci.* 2020. Vol. 63, № 12. P. 1833–1849.

78. Whitcombe A.L. Comprehensive analysis of SARS-CoV-2 antibody dynamics in New Zealand // *Clin. Transl. Immunology.* 2021. Vol. 10, № 3. P. e1261.

79. Jeffery-Smith A. Antibodies to SARS-CoV-2 protect against re-infection during outbreaks in care homes, September and October 2020 // *Euro Surveill.* 2021. Vol. 26, № 5. P. 2100092.

80. Addetia A. et al. Neutralizing Antibodies Correlate with Protection from SARS-CoV-2 in Humans during a Fishery Vessel Outbreak with a High Attack Rate // *J. Clin. Microbiol.* 2020. Vol. 58, № 11. P. e02107–e02120.

81. Pray I.W. COVID-19 Outbreak at an Overnight Summer School Retreat - Wisconsin, July-August 2020 // *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2020. Vol. 69, № 43. P. 1600–1604.

82. Wölfel R. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 // *Nature.* 2020. Vol. 581, № 7809. P. 465–469.

83. Analysis of Nucleic Acid and Antibody Detection Results for SARS-CoV-2 Infection // *Arch. Iran. Med.* 2021. Vol. 24, № 5. P. 427–433.

84. Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., и др. Особенности формирования серопревалентности населения Российской Федерации к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 в первую волну эпидемии COVID-19 / А.Ю. Попова, Е.Е. Андреева, Е.А. Бабура и др. // *Инфекция и иммунитет.* – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 297–323.

85. Ha B. Evaluation of a SARS-CoV-2 Capture IgM Antibody Assay in Convalescent Sera // *Microbiol. Spectr.* 2021. Vol. 9, № 2. P. e0045821.

86. McAndrews K.M. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity // *JCI Insight.* 2020. Vol. 5, № 18. P. e142386.

87. Khoshchehreh M. A needle in the haystack? Assessing the significance of envelope (E) gene-negative, nucleocapsid (N2) gene-positive SARS-CoV-2

detection by the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay // *J. Clin. Virol.* 2020. Vol. 133. P. 104683.

88. Топтыгина А.П. / Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Р.Ш. Закиров, З.Э. Афридонова // *Инфекция и иммунитет.* – 2022. – Т. 12, № 3. – С. 495–504.

89. Li K. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19 // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 6044.

90. Haddad N.S. Elevated SARS-CoV-2 Antibodies Distinguish Severe Disease in Early COVID-19 Infection // *bioRxiv [Preprint]*. 2020.

91. Kohmer N. Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests // *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92, № 10. P. 2243–2247.

92. Long Q.X. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections // *Nat. Med.* 2020. Vol. 26, № 8. P. 1200–1204.

93. Lei Q. Antibody dynamics to SARS-CoV-2 in asymptomatic COVID-19 infections // *Allergy.* 2021. Vol. 76, № 2. P. 551–561.

94. Wang C. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 2251.

95. Jiang S. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses // *Trends Immunol.* 2020. Vol. 41, № 5. P. 355–359.

96. Benner S.E. et al. SARS-CoV-2 Antibody Avidity Responses in COVID-19 Patients and Convalescent Plasma Donors. // *J. Infect. Dis.* 2020. Vol. 222, № 12. P. 1974–1984.

97. Valdez-Cruz N.A. Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment // *Microb. Cell Fact.* 2021. Vol. 20, № 1. P. 88.
98. Hoffmann M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // *Cell.* 2020. Vol. 181, № 2. P. 271–280.e8.
99. Walls A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // *Cell.* 2020. Vol. 181, № 2. P. 281–292.e6.
100. Piccoli L. Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology // *Cell.* 2020. Vol. 183, № 4. P. 1024–1042.
101. Gaspar E.B. Avidity assay to test functionality of anti-SARS-Cov-2 antibodies // *Vaccine.* 2021. Vol. 39, № 10. P. 1473–1475.
102. Slezak J. Rate and severity of suspected SARS-Cov-2 reinfection in a cohort of PCR-positive COVID-19 patients // *Clin. Microbiol. Infect.* 2021. Vol. 27, № 12. P. 1860.e7–1860.e10.
103. Bauer G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2. // *Int. J. Infect. Dis.* 2021. № 106. P. 61–64.
104. Tahamtan A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020. Vol 20, № 5. P. 453–454.
105. Wu F. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // *Nature.* 2020. Vol. 579, № 7798. P. 265–269.

106. Амвросьева Т. COVID-19: лабораторная диагностика / Т. Амвросьева, Н. Поклонская // Наука и инновации. – 2020. – № 7(209). – С. 22–27.

107. Хайтович А.Б. Специфические лабораторные методы в диагностике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2/ А.Б. Хайтович, В.В. Ткач, А.В. Ткач // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т.11 – №2 – С. 88–105.

108. Barreto H.G. Diagnosing the novel SARS-CoV-2 by quantitative RT-PCR: variations and opportunities // J. Mol. Med. 2020. Vol. 98, № 12. P. 1727–1736.

109. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) № 15 (22.02.2022). Утверждены Заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации А.Н. Плутницким: Миздрав РФ. – 244 с.

110. Bergant M. Diagnostics and monitoring of COVID-19 infection — current understanding. Preprints. 2020. doi: 10.20944/preprints202005.0316.v1

111. Wang W. Detection of SARSCoV-2 in Different Types of Clinical Specimens // JAMA. 2020. Vol. 323, № 18. P. 1843–1844.

112. Куличенко А.Н. К вопросу о точности лабораторной диагностики COVID-2019/ А.Н. Куличенко, Н.С. Саркисян // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11 – № 1. – С. 9–16.

113. Zhang T. Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia // J. Med. Virol. 2020. Vol. 92, № 7. P. 909–914.

114. Zhang W. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. Vol. 9, № 1. P. 386–389.
115. Chan J.F. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster // *Lancet.* 2020. Vol. 395, № 10223. P. 514-523.
116. Li Y. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19 // *J. Med. Virol.* 2020. Vol 92, № 7. P. 903-908.
117. Кузнецова Н.А., Стратегия дизайна РТ-ПЦР-системы и организация мониторинга SARS-CoV-2 / Н.А. Кузнецова, А.А. Почтовый, М.А. Никифорова, В.А. Гушин // *Вестник РГМУ.* – 2020. – № 2. – С. 21–25.
118. Shirato K. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // *Virol. J.* 2014. Vol. 11. P. 139.
119. Pyrc K. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of human coronavirus-NL63 // *J. Virol. Methods.* 2011. Vol. 175, № 1. P.133–6.
120. Lamb L.E. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification // *PLoS One.* 2020. Vol. 15, № 6. P. e0234682.
121. Njiru Z.K. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012. Vol. 6, № 6. P. e1572.

122. Hu X. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection // *mSphere*. 2020. Vol. 5, № 4. P. e00808-20.

123. Yu L. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic plat-form // *iLACO medRxiv*. 2020. Vol. 66, № 7. P. 975–977.

124. Rahman M.R. CRISPR is a useful biological tool for detecting nucleic acid of SARS-CoV-2 in human clinical samples // *Biomed. Pharmacother*. 2021. Vol. 140. P. 111772.

125. Kellner M.J. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases // *Nat. Protoc*. 2019. Vol. 14, № 10. P. 2986–3012.

126. Ding X. All-in-one dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) assay: a case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus // *bioRxiv*. 2020.

127. Broughton J.P. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 // *Nat Biotechnol*. 2020. Vol. 38, № 7. P. 870–874.

128. Ishii T. Immunochromatography and chemiluminescent enzyme immunoassay for COVID-19 diagnosis // *J. Infect. Chemother*. 2021. Vol. 27, № 6. P. 915–918.

129. Kashiwagi K. Immunochromatographic test for the detection of SARS-CoV-2 in saliva // *J. Infect. Chemother*. 2021. Vol. 27, № 2. P. 384–386.

130. Черничук О. В. Лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции COVID-19 / О. В. Черничук, О. О. Чернова // *Здравоохранение Югры: опыт и инновации*. – 2021. – № 2(27). – С. 27–34.

131. To K.K. 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. Vol. 20, № 5. P. 565–574.

132. Jääskeläinen A.J. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples // *Euro Surveill.* 2020. Vol. 25, № 18. P. 2000603.

133. Pieri M. SARS-CoV-2 infection serology validation of different methods: Usefulness of IgA in the early phase of infection // *Clin. Chim. Acta.* 2020. Vol. 511. P. 28–32.

134. Горбунов А. А. Диагностика COVID-19: современное состояние проблемы и перспективы в отрасли / А.А. Горбунов, Л.Е. Сорокина, Д.В. Чегодарь, А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* – 2020. – Т. 10. – № 2. – С.69–77.

135. Mohamadian M. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis // *J. Gene. Med.* 2021. Vol. 23, № 2. P. e3303.

136. Soleimani R. Clinical usefulness of fully automated chemiluminescent immunoassay for quantitative antibody measurements in COVID-19 patients // *J. Med. Virol.* 2021. Vol. 93, № 3. P. 1465–1477.

137. Islam K.U. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19 // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020. Vol. 10. P. 560616.

138. Грачева А. В. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 / А. В. Грачева, Е.Р. Корчевая, А.М. Кудряшова, О.В. Борисова, О.А. Петруша, Д.И. Смирнова, И.Н. Чернышова, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2021. – № 98(3). – С. 253–265.

139. Suthar M.S. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients // *Cell Rep. Med.* 2020. Vol. 1, № 3. P. 100040.

140. Favresse J. Neutralizing Antibodies in COVID-19 Patients and Vaccine Recipients after Two Doses of BNT162b2 // *Viruses.* 2021. Vol. 13, № 7. P. 1364.

141. Lau EHY. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 63.

142. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) № 6 (28.04.2020). Утверждены Заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Е. Г. Камкиным: Минздрав РФ. – 165 с.

143. Omori R. The age distribution of mortality from novel coronavirus disease (COVID-19) suggests no large difference of susceptibility by age // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 16642.

144. Phelps M. Cardiovascular comorbidities as predictors for severe COVID-19 infection or death // *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2021. Vol. 7, № 2. P. 172–180.

145. Barron E. Associations of Type 1 and Type 2 Diabetes With COVID-19-Related Mortality in England: A Whole-Population Study // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020. Vol. 8, № 10. P. 813–22.

146. Kamyshnyi A. Arterial Hypertension as a Risk Comorbidity Associated with COVID-19 Pathology // *International journal of hypertension.* 2020. 8019360.

147. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) № 8 (3.09.2020). Утверждены Заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Е. Г. Камкиным: Минздрав РФ. – 226 с.

148. Соловьева Н.В. Коронавирусный синдром: профилактика психотравмы, вызванной COVID-19 / Н.В. Соловьева, Е.В. Макарова, И.В. Кичук // РМЖ. – 2020. –№ 9. –С. 18–22.
149. Callard F. How and why patients made Long Covid. Soc //Sci. Med. 2021. Vol. 268. P. 113426.
150. Greenhalgh T. Management of postacute covid-19 in primary care // BMJ. 2020. Vol. 370. P. m3026.
151. Perrin R. Into the looking glass: Post-viral syndrome post COVID-19 // Med Hypotheses. 2020. Vol. 144. P. 110055.
152. Rudroff T.. Post-COVID-19 Fatigue: Potential Contributing Factors // Brain Sci. 2020. Vol. 10, № 12. P. 1012.
153. Robert L. Klitzman. Needs to Prepare for «Post-COVID-19 Syndrome» // The American Journal of Bioethics. 2020. Vol. 20, № 11. P. 4–6.
154. Zhao J. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. Clinical Infectious Diseases. 2020; Vol. 71. № 16. P. 2021–2034.
155. Leung D.T.M. et al. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid // J. Infect. Dis. 2004. Vol. 190, № 2. P. 379–386;
156. Zhu H. et al. Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103. № 11. P. 4011–4016;
157. Burbelo P.D. et al. Sensitivity in .Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome

Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019 // *J. Infect. Dis.* 2020. Vol. 222, № 2. P. 206–213.

158. Chan P.K. Antibody avidity maturation during severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection // *J. Infect. Dis.* 2005. Vol. 192. P. 166–169.

159. Barnes C.O. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies // *Nature*. 2020. Vol. 588. P. 682–687.

160. Moriyama, S. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants // *Immunity*. 2021. Vol. 54. P. 1841–1852.

161. Paul KS Chan. Antibody Avidity Maturation during Severe Acute Respiratory Syndrome–Associated Coronavirus Infection // *J Infect Dis.* 2005. Vol. 192. № 1. P. 166–169.

162. Vauloup-Fellous C. Humoral immune response after primary rubella virus infection and after vaccination // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. Vol. 14. P. 644–647.

163. de Souza V.A. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections // *J. Clin. Microbiol.* 2004. Vol. 42. P. 1782–1784.

164. Amaro F. The Application and Interpretation of IgG Avidity and IgA ELISA Tests to Characterize Zika Virus Infections // *Viruses*. 2019. Vol. 11. P. 179.

165. Struck F. Incomplete IgG avidity maturation after seasonal coronavirus infections // *J. Med. Virol.* 2021. Vol. 94. P. 186–196.

166. Moreno-Pérez O. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study // *J Infect.* 2021. Vol. 82, № 3. P. 378–383.