

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

ПЫЛАЕВА
София Константиновна

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2, В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ
ПАНДЕМИИ

1.5.10. Вирусология

3.1.22. Инфекционные болезни

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор биологических наук
Козловская Любовь Игоревна,
доктор медицинских наук, профессор
Еровиченков Александр Анатольевич

Москва - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Таксономическое положение вируса SARS-CoV-2.....	16
1.2 Организация вириона, генома и жизненный цикл вируса SARS-CoV-2.....	17
1.3 Эволюция вируса SARS-CoV-2	19
1.4 Клиническое течение COVID-19.....	21
1.5 Методы диагностики COVID-19	22
1.5.1 Серологический анализ крови при COVID-19.....	23
1.5.2 Ложноположительные результаты определения антител к вирусу SARS-CoV-2	25
1.5.3 Вируснейтрализующие антитела при SARS-CoV-2	27
1.6 Клинико-лабораторные прогностические маркеры тяжести течения новой коронавирусной инфекции	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Материалы	33
2.2 Дизайн исследования	33
2.3 Формирование групп исследования.....	34
2.3.1 Формирование групп 1-й части исследования	34
2.3.2 Формирование групп 2-й части исследования	37
2.3.3 Формирование групп 3-й части исследования	37
2.3.4 Формирование групп 4-й части исследования	40
2.4 Вирусологические методы.....	42
2.4.1 Культивирование клеток Vero	42

2.4.2 Выделение вируса SARS-CoV-2 из назофарингеальных мазков.....	43
2.4.3 Пассирование вируса в культуре клеток Vero	44
2.4.4 Титрование вируса в культуре клеток Vero	44
2.4.5 Реакция нейтрализации в культуре клеток Vero	45
2.5 Молекулярно-генетические методы.....	45
2.5.1 Одноступенчатая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	45
2.5.2 Электрофорез продуктов амплификации одноступенчатой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	46
2.5.3 Препаративный электрофорез продуктов амплификации одноступенчатой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.....	47
2.5.4 Выделение ДНК из агарозного геля	47
2.5.5 Секвенирование гена белка S SARS-CoV-2 и обработка хроматограмм .	48
2.6. Серологические методы.....	48
2.6.1 Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа	48
2.6.2 Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 методом иммунохемилюминесцентного анализа.....	49
2.6.3 Выявление маркеров аутоиммунных заболеваний у людей с ложноположительными IgM к SARS-CoV-2	50
2.7 Биохимические исследования сыворотки крови	51
2.8 Инструментальное обследование пациентов.....	52
2.9 Статистическая обработка данных.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1 Характеристика пациентов с ложноположительными результатами определения IgM к вирусу SARS-CoV-2	54

3.1.1 Сравнение лиц с ложноположительными IgM к SARS-CoV-2 (Группа 1) и негативной контрольной группой (Группа 2)	54
3.1.2 Сравнение воспроизводимости результатов различных тест-систем в определении IgM и IgG антител к вирусу SARS-CoV-2.....	57
3.2 Выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 для оценки вируснейтрализующей активности сывороток.....	63
3.2.1 Распределение изолятов вируса SARS-CoV-2 по времени выделения и покладам (генетическим линиям)	65
3.3 Анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови к различным вариантам вируса SARS-CoV-2.....	67
3.3.1 Сравнительный анализ групп пациентов, разделенных по временным интервалам.....	67
3.3.2 Оценка вируснейтрализующей способности сывороток крови пациентов, госпитализированных в различные периоды пандемии к вариантам вируса SARS-CoV-2	68
3.3.3 Соотношение между титрами вируснейтрализующих антител и IgG к вирусу SARS-CoV-2.....	72
3.3.4 Сравнительный анализ тяжести заболевания и титров вируснейтрализующих антител в различные периоды пандемии.....	74
3.4 Исследование прогностической значимости лейкоцитарных индексов и биохимических показателей сыворотки крови для оценки риска тяжелого течения COVID-19 в различные периоды пандемии	78
3.5 Определение значимости общей лактатдегидрогеназы и ее изотипов в прогнозировании неблагоприятного течения COVID-19	80
3.5.1 Течение болезни и активность общей лактатдегидрогеназы.....	81
3.5.2. Соотношение фракций лактатдегидрогеназы и тяжести течения заболевания	82

3.5.3 Сравнение соотношений фракций лактатдегидрогеназы при органических поражениях и сопутствующих заболеваниях	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ А	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

С начала пандемии COVID-19 (Coronavirus Disease, 2019) в мире было зарегистрировано свыше 767 млн подтверждённых случаев новой коронавирусной инфекции и более 7 млн летальных исходов от данного заболевания [1]. Несмотря на официальный переход к постпандемийному периоду (с 5 мая 2023 года), продолжает регистрироваться высокий уровень заболеваемости, который создает нагрузку на системы здравоохранения, тогда как вирус SARS-CoV-2 продолжает эволюционировать, находя новые способы ухода от постинфекционного и поствакцинального ответа [2,3].

Понимание механизмов иммунного ответа при COVID-19, включая спектр нейтрализующей активности сывороток, который формируется в результате контакта с одним вариантом вируса, и его способности противостоять мутантным вариантам имеет важное практическое значение для оценки эффективности существующих вакцин, прогнозирования тяжести течения заболевания при первичном и повторном инфицировании, а также для разработки новых лечебных мероприятий [4-10].

В условиях массовой заболеваемости COVID-19 крайне важно свести к минимуму количество ложноположительных результатов серологических исследований, особенно в процессе скрининговых обследований групп риска. Отсутствие четкого алгоритма действий для пациентов, получивших ложноположительный результат определения IgM антител к вирусу SARS-CoV-2, создает значительные трудности в доступе к плановой медицинской помощи, а также приводит к дополнительным финансовым издержкам, оказывая негативное влияние на систему здравоохранения в целом [11,12]. С другой стороны, чёткое определение IgG антител, сформировавшихся во время циркуляции различных вариантов вируса, важно для понимания эффективности вакцин, прогнозирования тяжести течения заболевания и для мониторинга состояния популяционного иммунитета.

Ключевым направлением исследований также остаётся поиск и валидация доступных лабораторных маркеров, позволяющих прогнозировать тяжесть течения COVID-19. Это имеет первостепенное значение для маршрутизации пациентов и повышения эффективности лечебных стратегий [13,14], а также может быть использовано в будущем для улучшения работы в случае возникновения новой пандемии.

Значимым ограничением клинического применения существующих прогностических шкал является отсутствие унифицированных пороговых значений оцениваемых показателей и высокая вариабельность референсных интервалов, определяемая используемыми диагностическими реагентами и аналитическим оборудованием. Указанные обстоятельства свидетельствуют о недостаточной степени валидации данных инструментов и существенно затрудняют проведение сравнительного анализа результатов различных исследований, а также разработку стандартизированных алгоритмов диагностики и лечебной тактики. В связи с этим сохраняется необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на уточнение и унификацию прогностических критериев течения COVID-19.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является универсальным биохимическим индикатором цитолиза, отражающим степень органного повреждения, уровень гипоксии и выраженность метаболического стресса в тканях [15]. Установление пороговых значений ЛДГ создаёт предпосылки её использования в качестве доступного стандартизированного теста при прогнозировании неблагоприятного течения COVID-19. Изучение изоферментного спектра данного фермента позволит уточнить преимущественный локус поражения при новой коронавирусной инфекции, что дополнительно может повысить его диагностическую значимость [15,16].

Комплексная оценка динамики специфического иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 и поиск надежных прогностических маркеров образуют целостную научную задачу, решение которой стало основным направлением данного исследования.

Степень разработанности темы

Изучение особенностей иммунного ответа при новой коронавирусной инфекции остается актуальной проблемой современной вирусологии и медицины. Значительный вклад в понимание механизмов формирования гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 внесли исследования, посвященные особенностям накопления и специфичности иммуноглобулинов классов M, A и G, а также роли вируснейтрализующих и ненейтрализующих антител в формировании защитного иммунного ответа. В ранних исследованиях была продемонстрирована динамика формирования перекрестного иммунитета, а также показана его недостаточная эффективность в отношении новых вариантов вируса. Однако способность антител, индуцированных исходными вариантами SARS-CoV-2, нейтрализовать современные штаммы по-прежнему остаётся под вопросом и представляет важное значение для разработки эффективных мер профилактики COVID-19.

Отдельное направление исследований касается проблемы диагностики и прогноза течения COVID-19. В ходе пандемии было выявлено множество биомаркеров, функционирующих в качестве предикторов тяжелого течения новой коронавирусной инфекции. С изменением циркулирующих вариантов вируса прогностическая значимость многих биомаркеров претерпела изменения.

Ключевой проблемой валидации прогностических шкал является отсутствие унифицированных пороговых уровней и высокая вариабельность референсных интервалов, что существенно ограничивает их клиническую применимость. Это обстоятельство подчеркивает необходимость установления прогностических маркеров и определения стандартизированных референсных значений для их применения в актуальной эпидемиологической ситуации.

Ещё одним малоизученным направлением является проблема получения ложноположительных результатов тестирования на антитела IgM к вирусу SARS-CoV-2. Исследования данного вопроса ограничены отдельными клиническими наблюдениями, в основном касающимися пациентов с аутоиммунными заболеваниями. В представленных работах отсутствует унифицированный

алгоритм для верификации сомнительных результатов, что приводит к диагностической неопределенности, особенно в условиях массового скрининга уязвимых групп населения (пожилые люди, пациенты с хроническими заболеваниями). Данная ситуация подчеркивает необходимость глубокого изучения клинико-лабораторных характеристик пациентов с ложноположительными результатами, а также разработки эффективных подходов к их интерпретации. Это направление является одним из ключевых аспектов настоящего исследования.

Значительное число исследований ограничено периодом от 2020 года до 2022 года и не включает данные о новых подвариантах варианта Омикрон (BA.4; BA.5; XBB 1.9), которые оказывали существенное влияние на эпидемиологическую ситуацию в 2023 году. В связи с этим, сохраняется потребность в обновленных данных, отражающих реальную картину иммунной защиты населения в условиях эволюции коронавируса.

Учитывая вышеизложенное, можно сделать заключение, что несмотря на наличие многочисленных исследований, часть проблем, связанных с оценкой гуморального иммунного ответа, получением ложноположительных результатов и прогнозированием тяжести течения COVID-19, остается нерешенной. Это определяет научную и практическую значимость настоящей работы, направленной на восполнение выявленных пробелов.

Цель исследования: изучение особенностей гуморального иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 и его диагностики во время пандемии (2019–2023 гг.) и после нее (2023–2025 гг.), а также оценка клинико-лабораторных маркеров для прогнозирования течения новой коронавирусной инфекции.

Для достижения цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. выявить пациентов с ложноположительными результатами определения IgM антител к вирусу SARS-CoV-2 и разработать алгоритм верификации сомнительных результатов;
2. выделить изоляты вариантов вируса SARS-CoV-2, циркулировавших в московском регионе (Москва и Московская область) в 2022–2025 гг., для

получения тест-штаммов для постановки реакции нейтрализации и получить частичные нуклеотидные последовательности их геномов (ген S) для анализа смены доминирующих вариантов;

3. провести анализ нейтрализующей активности сывороток крови пациентов с COVID-19 в зависимости от времени инфицирования по отношению к выделенным тест-штаммам разных вариантов вируса SARS-CoV-2;
4. проанализировать корреляцию между уровнями специфических антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2, определяемых стандартными тест-системами (Mindray CL-2000, Китай), и титрами вируснейтрализующих антител в различные периоды пандемии;
5. оценить прогностическую значимость лейкоцитарных индексов и биохимических показателей для оценки риска тяжелого течения COVID-19 в различные периоды пандемии;
6. установить прогностическую значимость общей активности лактатдегидрогеназы и ее изоферментного спектра для оценки риска неблагоприятного течения COVID-19, включая развитие органных поражений.

Научная новизна

Впервые предложен алгоритм действий при подозрении на выявление ложноположительных IgM к вирусу SARS-CoV-2. Впервые на репрезентативной выборке продемонстрировано отсутствие статистически значимой связи между некоторыми аутоиммунными заболеваниями и ложноположительными результатами определения IgM к вирусу SARS-CoV-2.

На обширной когорте российских пациентов (Москва и Московская область) впервые представлена динамика перекрестной нейтрализующей активности сывороток крови в культуре клеток Vero с изолятами вируса SARS-CoV-2, соответствующими последовательно сменявшимся вариантам вируса в 2020–2025 гг.

Впервые количественно охарактеризована корреляционная взаимосвязь между уровнем IgG антител к вирусу SARS-CoV-2, определяемым с использованием стандартной тест-системы (Mindray CL-2000, Китай), и титрами

вируснейтрализующих антител.

Впервые установлено, что прогностически значимыми критериями тяжелого течения COVID-19, сохраняющими свою информативность независимо от циркулирующего варианта вируса, являются уровни ЛДГ, D-димера, С-реактивного белка и индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам.

Впервые на репрезентативной выборке пациентов с COVID-19 количественно определено и унифицировано пороговое значение общей активности ЛДГ, превышение которого служит независимым предиктором высокого риска неблагоприятного исхода заболевания.

Впервые изучен и охарактеризован изоферментный спектр ЛДГ у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Показано, что определение изоферментного спектра ЛДГ является методом, позволяющим идентифицировать пациентов с высоким риском полиорганной недостаточности и неблагоприятного исхода COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе обоснована необходимость корректного подхода к интерпретации титров IgG и IgM к вирусу SARS-CoV-2 у лиц, перенесших инфекцию, в контексте оценки риска заражения новыми вариантами вируса SARS-CoV-2. Выявлено несоответствие между уровнями вируснейтрализующих антител и результатами стандартных тестов на выявление антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2. Подчеркнута необходимость актуализации прогностических шкал течения заболевания в условиях смены доминирующих вариантов вируса SARS-CoV-2. Установлено прогностическое пороговое значение уровня ЛДГ, позволяющее использовать данный показатель для оценки риска неблагоприятного течения COVID-19. Показано, что определение изоферментного спектра ЛДГ может быть рекомендовано в качестве дополнительного метода ранней идентификации пациентов, относящихся к группе высокого риска. В ходе исследования также были выделены два изолята коронавируса, нуклеотидные последовательности которых внесены в международную базу данных GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, EPI_ISL_19062522; EPI_ISL_19062520), что имеет практическое

значение для мониторинга эволюции вируса, прогнозирования эпидемической ситуации и анализа региональных особенностей его циркуляции.

Методология и методы исследования

Особенностью работы является комплексный методический подход на основе сочетания анализа данных медицинских карт пациентов, госпитализированных с диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» с современными клинико-лабораторными, вирусологическими и серологическими методами исследования гуморального иммунного ответа. Результаты исследований были обработаны с использованием современных и адекватно подобранных методов статистического анализа для получения корректных корреляций и обоснованных выводов.

Положения, выносимые на защиту

1. Подтверждением ложноположительного характера результатов определения IgM к вирусу SARS-CoV-2 служит отсутствие сероконверсии (появления IgG) при повторном исследовании. Ложноположительные результаты IgM к вирусу SARS-CoV-2 не ассоциированы с аутоиммунной патологией.
2. Создана коллекция тест-штаммов вируса SARS-CoV-2, представляющая варианты, циркулировавшие с 2020 по 2025 гг. в московском регионе (г. Москва и Московская область), для оценки гуморального иммунного ответа в реакции нейтрализации в культуре клеток Vero.
3. Сыворотки крови пациентов, перенёсших COVID-19 в период циркуляции варианта Дельта (B.1.617.2), обладают более широким спектром вируснейтрализующей активности по сравнению с сыворотками переболевших ранними вариантами вируса SARS-CoV-2. При этом возрастные группы старше 60 лет демонстрируют сопоставимые титры вируснейтрализующих антител с группой лиц до 45 лет на исследованной выборке пациентов.
4. Выявлена слабая положительная корреляция между уровнем антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2, определяемым стандартной коммерческой тест-системой (Mindray CL-2000; иммунохемилюминесцентный анализ), применяемой в стационаре на момент госпитализации пациентов, и титрами

вируснейтрализующих антител к циркулирующему варианту вируса. Со сменой варианта вируса коэффициент корреляции изменяется, но корреляция остается слабо положительной.

5. Прогностически значимыми критериями тяжести течения COVID-19 независимо от циркулирующего варианта являются уровни лактатдегидрогеназы, D-димера и С-реактивного белка, а также индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, тогда как корреляция между титрами вируснейтрализующих антител и тяжестью заболевания статистически не была подтверждена.
6. Изменения в соотношении изоферментов лактатдегидрогеназы (снижение лактатдегидрогеназы 1 и лактатдегидрогеназы 2 при увеличении лактатдегидрогеназы 3, лактатдегидрогеназы 4) на 9 сутки заболевания являются значимыми прогностическими маркерами неблагоприятного течения COVID-19, включая риск госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии, длительного пребывания в стационаре и летального исхода, особенно у пациентов старше 60 лет.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается воспроизводимостью данных, длительным периодом наблюдения, адекватным формированием исследуемых когорт, использованием современных методов исследования и корректной статистической обработкой. Выводы и практические рекомендации обоснованы полученными результатами и соответствуют цели и задачам исследования.

Основные положения диссертации представлены и обсуждены на X и XI Всероссийских междисциплинарных научно-практических конференциях с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2023, 2024), XVI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2024), а также на Всероссийских научно-практических конференциях с

международным участием «Актуальные вопросы профилактики инфекционных и неинфекционных болезней: эпидемиологические, организационные и гигиенические аспекты» (Москва, 2024) и «Актуальные вопросы профилактики инфекционных болезней: эпидемиологические, организационные и гигиенические аспекты» (Москва, 2025).

Личный вклад автора

Автором принято участие в планировании и разработке дизайна исследования, определении цели и задач работы. Автор координировал взаимодействие с медицинскими учреждениями, контролировал соблюдение этических стандартов и требований биобезопасности. Сбор данных осуществлялся автором из медицинской документации и анкетирования персонала. Вирусологическое исследование проводилось совместно с сотрудниками ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), а серологические исследования выполнялись клинико-диагностическими подразделениями стационаров. Автор систематизировал данные, провел статистический анализ и сформулировал выводы, подготовил статьи к публикации и представил данные на конференциях и конгрессах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

По тематике, методам исследования, полученным научным результатам диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология (медицинские науки) и направлениям исследования: пункту 7 - изучение противовирусного иммунитета, иммунохимические исследования вирусных антигенов, изучение гуморального, клеточного иммунитета и иммунопатологических реакций; пункту 10 - разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии. Диссертационная работа также соответствует паспорту научной специальности 3.1.22. Инфекционные болезни (медицинские науки): пункту 2 - Клинические проявления инфекционного процесса, повреждения и нарушения функции различных органов и систем, особенности течения

заболевания во всех возрастных группах, в различных условиях окружающей среды и в сочетании с другими болезнями. Прогнозирование течения инфекционного заболевания и его исходов; пункту 3 - Диагностика инфекционных болезней с использованием клинических, микробиологических, генетических, иммунологических, биохимических, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика с другими болезнями инфекционной и неинфекционной природы.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 5 печатных работ, из них 3 – научные статьи и 1 – научный обзор опубликованы в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Представленные научные работы индексируются в международных базах Scopus и RSCI, а также опубликована 1 глава монографии.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из введения и трех глав основной части диссертации, включая обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 153 источника (24 отечественных и 129 зарубежных авторов) и приложение А. Работа иллюстрирована 31 таблицей, 13 рисунками и 4 клиническими наблюдениями (Приложение А).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Первые случаи заражения человека коронавирусами были зарегистрированы в 1960 году у госпитализированных пациентов с симптомами острой вирусной инфекции верхних дыхательных путей. Позже, в 2002–2003 гг., в странах Азии возникла вспышка атипичной пневмонии, вызванная коронавирусом SARS-CoV-1 [33]. Заболевание широко распространилось за пределы региона, однако, несмотря на значительное число случаев, эта эпидемия не достигла пандемических масштабов и была полностью купирована к 2005 году. В 2012 году на территории Ближнего Востока был выявлен новый коронавирус MERS-CoV, отличавшийся высокой патогенностью и способностью вызывать тяжёлые поражения дыхательной системы, сопровождавшиеся значительным уровнем летальности [35]. Позднее, в декабре 2019 года, в китайском городе Ухань зарегистрировали первые эпизоды пневмонии неясной этиологии, которые оказались связаны с ранее неизвестным коронавирусом SARS-CoV-2.

Изначально возбудитель новой коронавирусной инфекции был обозначен как «2019-nCoV». Впоследствии, в марте 2020 года, специализированная исследовательская группа по изучению коронавирусов присвоила ему официальное название «SARS-CoV-2», в соответствии с принятой системой таксономических критериев и международным правилом номенклатуры [35]. С течением времени именно этот вирус стал причиной глобальной пандемии COVID-19, охватившей весь мир в период 2020–2023 годов.

1.1 Таксономическое положение вируса SARS-CoV-2

По современной классификации вирусов, утверждённой Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses), вирус SARS-CoV-2 отнесен к виду *Betacoronavirus pandemicum* рода *Betacoronavirus* подсемейства *Orthocoronavirinae* семейства *Coronaviridae* [32].

1.2 Организация вириона, генома и жизненный цикл вируса SARS-CoV-2

Вирион SARS-CoV-2 представляет собой вирусную частицу преимущественно сферической формы диаметром около 100 нм, окруженную липидной оболочкой. На поверхности оболочки локализованы тримерные комплексы S-белка, формирующие характерные выступающие структуры, придающие вирусу корноподобный вид. Белок N (нуклеокапсидный белок) обеспечивает связывание геномной рибонуклеиновой кислоты (РНК), участвует в ее компактной упаковке и играет ключевую роль в образовании нуклеокапсида, в то время как белки S, M и E интегрированы в липидную оболочку, обеспечивая стабильность и морфогенез вириона [35].

S-белок относится к белкам слияния I класса и структурно организован в виде двух функциональных субъединиц. Субъединица S1 обеспечивает специфическое взаимодействие вирусной частицы с клеточным рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2, Angiotensin-Converting Enzyme 2), определяя начальный этап проникновения вируса в клетку. После связывания с рецептором субъединица S2 опосредует слияние вирусной и клеточной мембран, что обеспечивает поступление вирусного генетического материала в цитоплазму клетки-хозяина. В связи с ключевой ролью в реализации инфекционного процесса S-белок рассматривается как основная мишень для вируснейтрализующих антител (ВНА)[36]. Этот белок обладает уникальными характеристиками, отличающими его от оболочечных белков других бетакоронавирусов, включая наличие сайта расщепления фурином, который отсутствует у близкородственных коронавирусов, циркулирующих среди летучих мышей. Данная структурная особенность способствует увеличению передачи и патогенности SARS-CoV-2 по сравнению с другими сарбековирusernameами [35,37]. Белок M отвечает за формирование вириона и координирует упаковку структурных компонентов, в то время как белок E участвует в процессах формирования оболочки и выходе вирусных частиц из клетки. Белок N осуществляет связывание геномной РНК, и в комплексе с белком мембранным белком M принимает участие в сборке и организации рибонуклеопротеинового комплекса (Рисунок 1) [38].

Геном SARS-CoV-2 представлен в виде одноцепочечной молекулы РНК положительной полярности длиной около 30 тыс. нуклеотидов. На 5'-конце геномной РНК расположен кэп, тогда как 3'-конец содержит поли(А)-последовательность (полиадениловый хвост), обеспечивающие стабильность молекулы и эффективность процессов трансляции. Геном включает несколько открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих 16 неструктурных белков, участвующих в репликации вирусного генома и регуляции взаимодействия вируса с клеткой-хозяином. Кроме того, в его составе присутствуют гены четырех структурных белков, а также семи дополнительных белков, функциональная роль которых на сегодняшний день остается окончательно не установленной. (Рисунок 2) [40-42].

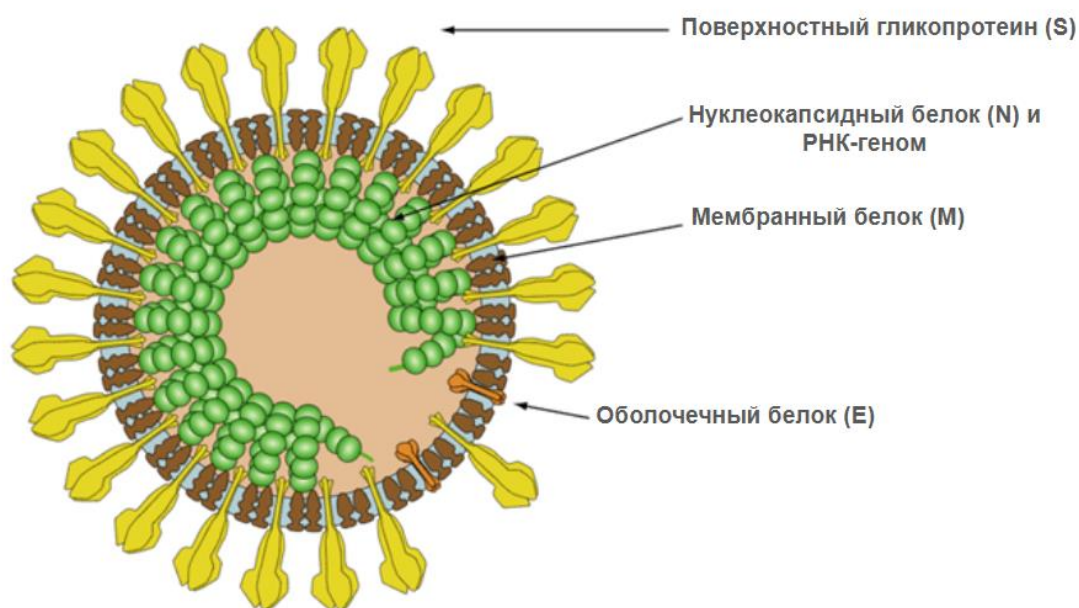


Рисунок 1 - Схема строения вириона SARS-CoV-2 (адаптировано по: viralzone [39])

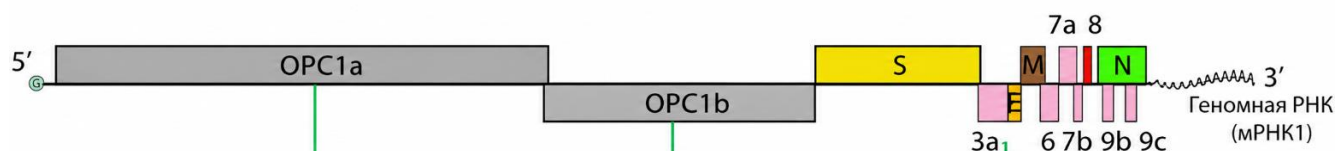


Рисунок 2 - Схема строения генома вируса SARS-CoV-2. S, E, M, N – гены структурных белков; 3a-9c – гены дополнительных неструктурных белков (адаптировано по: viralzone [42])

Начальным этапом инфицирования клетки является специфическое

связывание S-белка вируса с рецептором ACE2, локализованным на поверхности клетки-хозяина. Данное взаимодействие приводит к активации клеточных протеаз, осуществляющих протеолитическое расщепление S-белка и индуцирующих его конформационные изменения. В результате происходит слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, что обеспечивает высвобождение геномной вирусной РНК в цитоплазму инфицируемой клетки. На ранних стадиях происходит трансляция полипротеиновых предшественников с ORC1ab, которые затем расщепляются вирусными протеазами на компоненты репликационно-транскриптазного комплекса (NSP1-16). Репликация вирусной РНК и синтез субгеномных мРНК осуществляются этим репликационно-транскриптажным комплексом в мембранных везикулах, происходящих из мембран эндоплазматического ретикулума [42-45]. При этом комплекс РНК-зависимой РНК-полимеразы SARS-CoV-2 обладает нуклеазной активностью, обеспечивающей точность репликации и транскрипции генома вируса. Структурные белки вируса синтезируются с субгеномных мРНК и котрансляционно встраиваются или ассоциируют с мембранами эндоплазматического ретикулума, где способствуют упаковке новосинтезированных РНК геномов и сборке вирионов [46], с последующим выходом по экзоцитозному пути [47]. Также в процессе инфекции в клетке синтезируется ряд вспомогательных белков с недостаточно изученными функциями [48].

1.3 Эволюция вируса SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 постоянно эволюционирует, что характеризуется точечными мутациями, с расчетной скоростью примерно $9,63 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год [49], что значительно ниже, чем у других РНК вирусов. Мутации появляются во всех областях генома, однако большее количество изменений накапливается в поверхностном белке S вириона (Рисунок 3).

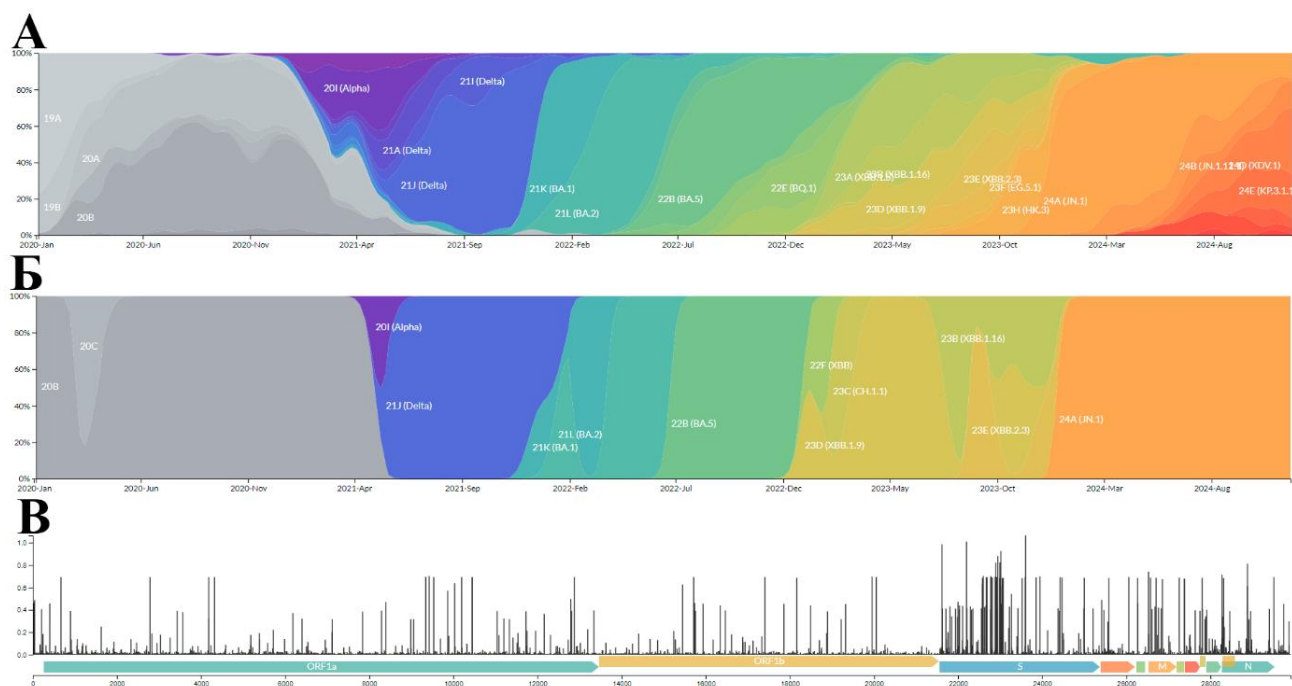


Рисунок 3 - Распределение циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 по времени с декабря 2019 г. по ноябрь 2024 г. А) в мире (А, 3381 геном) и в России (Б, 74 генома), а также частота возникновения мутаций в различных позициях генома вируса (В, 3381 геном) (адаптировано по: nextstrain [50])

Несмотря на то, что большинство изменений, происходящих в геноме вируса, не оказывает значительного влияния на его биологические характеристики (синонимические мутации или несинонимические на сходные по свойствам аминокислоты) ключевые мутации в белке S, такие как K417N, D614G, N439K, N501Y, E484K, и L452R, были ассоциированы с повышенной контагиозностью новых вновь возникающих вариантов вируса SARS-CoV-2 и уходом от иммунного ответа или изменениями в связывании с рецепторами [36, 51-54]. Данный факт вызывает беспокойство по поводу возникновения антигенно отличных вариантов, обладающих способностью избегать как постинфекционного, так и поствакцинального иммунитета [6-10, 54–56].

С начала пандемии наблюдается последовательная смена доминирующих вариантов вируса (Рисунок 3А-Б). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала систему классификации вариантов вируса SARS-CoV-2, основанную на их значимости для общественного здоровья [57]. Варианты, вызывающие интерес, обладают генетическими изменениями, способными влиять на характеристики вируса [57,58]. В свою очередь варианты, вызывающие

обеспокоенность, отличаются повышенной передаваемостью и/или вирулентностью и включают такие варианты, как Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (P.1), Дельта (B.1.617.2) и Омикрон (B.1.1.529).

У варианта Омикрон были выявлены подварианты (BA.1, BA.2, BA.3 и другие), которые последовательно вытесняли друг друга в популяции благодаря дополнительным мутациям, усиливающим способность вируса избегать популяционного иммунитета (Рисунок 3А-Б). В дальнейшем широкое распространение получили линии BA.4 и BA.5, их производные BQ.1 и BQ.1.1, а также рекомбинантные линии ХВВ, которые оказались наиболее контагиозными среди циркулирующих вариантов вируса [59,60]. В течение 2023 года фиксировали активную циркуляцию подлиний ХВВ, включая ХВВ.1.5 и ХВВ.1.16, а также возникновение подварианта EG.5.1, обладающего дополнительными мутациями, способствующими иммунному ускользанию [9, 61].

Ключевым мировым событием 2025 года стало возникновение и распространение варианта NB.1.8.1, который относится к Омикрон-подобным вариантам SARS-CoV-2. Данный вариант был впервые идентифицирован в Китае в январе, и к середине мая 2025 года его доля составила приблизительно 11% от общего числа секвенированных геномов. Всемирная организация здравоохранения классифицировала его как вариант, находящийся под наблюдением, что связано с его вкладом в рост заболеваемости, особенно в регионах Азиатско-Тихоокеанского бассейна [2].

1.4 Клиническое течение COVID-19

Инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, поражает органы респираторного тракта и её классифицируют как бессимптомную, легкую, среднюю, тяжелую и крайне тяжелую формы COVID-19 [62]. Клиническое течение и степень тяжести заболевания значительно варьируют в зависимости от преобладающего варианта вируса [63,64]. Характерное развитие COVID-19 проходит через три фазы после попадания вируса в организм (через нос или рот) и наступления инкубационного периода, который длится до 14 дней [65]. В начале

болезни первыми симптомами являются лихорадка, кашель, головная боль, повышенная утомляемость, реже одышка и лимфопения, а также утрата вкуса и обоняния, рвота и диарея [65-67]. На второй неделе легкие формы болезни, как правило, разрешаются благоприятно, в то время как тяжелые – могут сопровождаться нарастающим лейкоцитозом, легочной инфильтрацией и полиорганной дисфункцией [66]. На третьей неделе у пациентов с тяжелыми формами могут развиваться стойкая лимфопения, острый респираторный дистресс-синдром и повышенный риск летального исхода [66,67]. Критическая стадия прогрессирования COVID-19 наступает на 7–13 день после начала заболевания [68,69]. Медианное время от появления первых симптомов до развития одышки составляет в среднем 5,5 дней (межквартильный диапазон 2–9,3 дня), а до развития респираторного дистресс-синдрома - 7,5 дней (межквартильный диапазон 4,3–11 дней) [65,66].

Кроме того, COVID-19 может вызывать снижение функции легких, отказ от питания, ослабление мышечной силы, а также психологические и когнитивные расстройства, что приводит к ухудшению качества жизни [70,71].

Со временем, с накоплением иммунной прослойки и сменой циркулирующих вариантов вируса стало наблюдаться смягчение симптомов COVID-19 и увеличение доли случаев, не требующих госпитализации [59,60].

1.5 Методы диагностики COVID-19

Методы диагностики COVID-19 можно разделить на два основных типа (прямые и непрямые): прямые методы направлены на специфическое выявление генетического материала вируса (РНК генома), непрямые методы направлены на обнаружение специфических антигенов (вирусных белков) или антител к вирусу.

Для идентификации вируса широко применяют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и изотермическую амплификацию. Эти методические подходы обеспечивают возможность проведения анализа как в режиме реального времени, так и с фиксацией результата по конечной точке [72,73]. Точность идентификации РНК вируса SARS-CoV-2 с использованием тест-систем,

основанных на методах полимеразной цепной реакции (ПЦР), демонстрирует значительные колебания. На данный параметр воздействуют различные факторы, включая вид исследуемого биоматериала, методику его сбора, стадию заболевания и форму клинического течения, а также вирусную нагрузку в образце [74,75].

Иммунохимические тесты применяют для выявления антигенов коронавируса и антител к ним. Анализ на наличие антител используется в следующих ситуациях: подтверждение COVID-19 при наличии характерной симптоматики при отрицательном результате ПЦР-теста; ретроспективная диагностика ранее перенесенной инфекции при отсутствии данных, полученных с помощью ПЦР, а также оценка поствакцинального иммунного ответа [75,76].

В дополнение к чувствительности, важным критерием качества диагностических тестов является их специфичность. В условиях массового тестирования данный параметр оказывает прямое влияние на достоверность получаемых результатов [75]. Особенно важно минимизировать количество ложноположительных результатов при проведении скрининговых обследований в группах риска, определенных законодательными нормами, поскольку это имеет решающее значение для эффективности противоэпидемических мероприятий [74,77].

1.5.1 Серологический анализ крови при COVID-19

В течение инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в организме формируются антитела к структурным и к некоторым неструктурным белкам вириона. Наибольшими протективными свойствами в отношении повторного инфицирования обладают антитела специфичные к белку S, обеспечивающие более высокий уровень иммунологической защиты по сравнению с антителами к мембранному (M), оболочечному (E) и нуклеокапсидному (N) белкам вируса [20].

Ключевая защитная роль антител обусловлена их нейтрализующей способностью, которая блокирует проникновение вируса в клетки-мишени и, тем самым, предотвращает развитие инфекции. ВНА к SARS-CoV-2 взаимодействуют с поверхностным белком S вириона и ингибируют его проникновение в клетку [78,

79].

ВНА выявляются к 4–9 дню практически у всех пациентов [80–83]. У пациентов с диагнозом COVID-19 ВНА, как правило, выявляются одновременно с IgG к Receptor-Binding Domain (RBD), при этом в научной литературе описана прямая корреляционная зависимость между этими параметрами ($R=0,768$, коэффициент Спирмена), а уровень совпадения между наличием IgG к RBD и детектируемой нейтрализующей активностью достигает 93,19% [8,82–85]. Более того, в период циркуляции прототипных вариантов SARS-CoV-2 в течение восьмимесячного наблюдения не было зарегистрировано случаев повторного инфицирования среди лиц, у которых сформировались IgG к RBD, включая пациентов, утративших детектируемый уровень данных антител спустя 4–5 месяцев после перенесённого заболевания [86, 87]. Это наблюдение позволило использовать уровень IgG к RBD для косвенной оценки содержания ВНА при проведении исследований постинфекционного и поствакцинального гуморального иммунного ответа с применением методов иммуноферментного анализа (ИФА), иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) и иммунохроматографического анализа (ИХА).

Новые варианты вируса SARS-CoV-2 возникают в условиях наличия популяционного иммунитета, сформированного в результате перенесённой инфекции или вакцинации, что обуславливает отбор вирусных мутаций, способствующих уходу от иммунного ответа. В организме инфицированных лиц могут циркулировать антитела к вирусу SARS-CoV-2, не обладающие нейтрализующей активностью в отношении новых вариантов вируса. Антитела, эффективно нейтрализующие ранние штаммы вируса SARS-CoV-2, в подобных условиях могут терять свою функциональную активность. Это, в свою очередь, способно приводить к двум диаметрально противоположным иммунопатологическим эффектам: с одной стороны, ненейтрализующие антитела могут способствовать антитело-зависимому усилению инфекции и утяжелению клинических проявлений заболевания, с другой стороны, обеспечивать частичную иммунную защиту или снижать тяжесть клинического течения COVID-19 [88].

1.5.2 Ложноположительные результаты определения антител к вирусу SARS-CoV-2

Скрининг бессимптомных инфицированных лиц в основном сфокусирован на выявлении специфических антител. В 2020 году в Испании 5% населения являлись серопозитивными, при этом не сообщали о симптомах и не обращались за медицинской помощью [89]. В Китае в это же время 44% (95% ДИ (30–57)) случаев заражения коронавирусной инфекцией происходило до появления первых симптомов у источника инфекционного заболевания. Предполагается, что выделение вируса может начаться за 5–6 дней до появления первых симптомов болезни [90]. Так было предложено проведение крупномасштабных серологических исследований для выявления бессимптомных форм новой коронавирусной инфекции [91].

Несмотря на диагностическую значимость серологических исследований, их использование ограничено риском получения ложноположительных результатов. В процессе прогнозирования воздействия чувствительности и специфичности используемых коммерческих тестов на результаты иммунологических исследований, при условии распространенности заболевания в популяции на уровне 5% и специфичности теста, равной 99%, можно ожидать, что 950 человек из 100 000 обследованных лиц получат ложноположительный результат [11].

Согласно результатам систематического обзора, проведенного в рамках Кокрейновской библиотеки, исследования свидетельствуют о сопоставимости достигнутых показателей. При специфичности диагностических тест-систем, равной 98,7%, частота ложноположительных результатов варьирует в пределах 0,6–2,7% при уровне распространенности заболевания составляющем 5% (что соответствует 6–27 случаям на 1000 обследованных), и 0,5–2,2% при распространенности инфекции на уровне 20% (что эквивалентно 5–22 случаям на 1000 обследованных) [12].

В современном диагностическом процессе для выявления специфических антител применяются разнообразные технологии, включая ИФА и ИХЛА,

флуоресцентную иммунохроматографию, а также иммунохроматографию с коллоидным золотом. Большинство методик предполагают установление точных пороговых значений, что обеспечивает более объективную интерпретацию полученных данных, в то время как при использовании иммунохроматографии с коллоидным золотом результаты интерпретируются визуально на основе изменения окраски, что может приводить к расхождениям в интерпретации результатов из-за отсутствия четких критериев оценки. На результаты тестирования могут оказывать влияние как эндогенные (ревматоидный фактор, гетерофильные антитела и компоненты системы комплемента), так и экзогенные факторы (гемолиз образца сыворотки крови, бактериальное загрязнение, нарушения условий хранения и ошибки на подготовительном к анализу этапе).

Увеличение числа случаев заболевания существенно влияет на надежность диагностики. В этих условиях особую актуальность приобретает проблема ложноположительных результатов, что особенно критично при введении строгих противоэпидемических мер и обязательном тестировании уязвимых групп населения (пожилые люди и пациенты с хроническими заболеваниями) в соответствии с нормативными требованиями. Например, согласно нормативным актам во время пандемии, при необходимости оказания плановой медицинской помощи и госпитализации пациента в стационар, требовалось иммунологическое исследование на наличие антител к вирусу SARS-CoV-2 [92,93]. Отсутствие четкого алгоритма действий для пациентов с ложноположительным результатом определения IgM затрудняло получение плановой медицинской помощи [94]. Неблагоприятным исходом ложноположительных тестов также является то, что пациент с ложным результатом IgM к вирусу SARS-CoV-2 подвергается дальнейшей диагностике, эмоциональному давлению, что ведет к дополнительным финансовым издержкам медицинских организаций и создает дополнительную нагрузку на медицинский персонал.

На текущий момент в научной литературе наблюдается ограниченное количество исследований, посвященных проблематике ложноположительных результатов тестирования на антитела к вирусу SARS-CoV-2. Встречаются

отдельные описания клинических случаев, характеризующихся ложноположительными результатами определения антител к вирусу SARS-CoV-2, однако, данные случаи имеют единичный характер и, как правило, диагностируются на фоне течения иных соматических или инфекционных заболеваний [28-31].

1.5.3 Вируснейтрализующие антитела при SARS-CoV-2

Основной способностью антител является их нейтрализующая активность, которая препятствует проникновению вируса в чувствительные клетки, обеспечивая защитный эффект для макроорганизма. ВНА против вируса SARS-CoV-2 осуществляют свою деятельность путем связывания с поверхностным белком вируса, который взаимодействует с рецептором человеческого ACE2, позволяя вирусу инфицировать клетки хозяина [4]. Все ВНА можно условно разделить на три основные категории: первая — антитела, связывающиеся с RBD S-белка и препятствующие его взаимодействию с рецептором ACE2 [5]; вторая — антитела, распознающие N-концевой домен субъединицы S1; третья — антитела, нацеленные на субъединицу S2, которая ингибирует конформационные перестройки, необходимые для слияния вирусной и клеточной мембран и последующего проникновения вируса в клетку [5, 78-82, 85].

ВНА начинают выявляться в крови у 41,3 % пациентов с COVID-19 уже на 1–2 сутки после начала заболевания, а к 4–9 дню их наличие фиксируется у всех пациентов с лабораторно подтверждённым диагнозом [78,80-81,83]. Однако, использование корреляции между ВНА и IgG к RBD как параметра оценки протективности иммунного ответа создает неверное ощущение полного отсутствия вируснейтрализующей активности у антител, сформированных в результате инфекции или вакцинацией прототипными вариантами вируса SARS-CoV-2, против актуальных вариантов [79].

Исследования, проведенные в начале пандемии, подтверждают наличие значимой корреляции между динамикой накопления ВНА и клиническими исходами COVID-19. Наличие ВНА в ранние стадии заболевания (в течение первых

недель после появления симптомов) ассоциируется с более быстрой элиминацией вируса, что находит подтверждение в отрицательных результатах ПЦР на SARS-CoV-2. Напротив, отсутствие вируснейтрализующей активности антител связано с неблагоприятным прогнозом, включая повышенные показатели летальности [20,79].

Долгосрочные серологические исследования продемонстрировали характерную динамику антительного ответа: титры ВНА начинают прогрессивно снижаться через 5–8 недель после инфицирования и сохраняют детектируемый уровень в течение 8 месяцев у значительной части реконвалесцентов, независимо от возрастных характеристик пациентов или наличия сопутствующих заболеваний [21,84].

В начале пандемии были данные, что уровень вируснейтрализующей активности у вакцинированных и ранее перенесших инфекцию дает информацию о тяжести предшествующей инфекции и может предсказывать иммунную защиту от последующего заражения [85,95-97]. Со временем было выявлено, что новые варианты слабее нейтрализуются антителами, сформированными предшествующей инфекцией. Так, вариант Дельта, благодаря способности избегать иммунитет хозяина, стал доминирующим во всем мире, вытеснив предыдущие варианты в странах с частично иммунным населением, охваченным вакцинацией, а плазма реконвалесцентов была в 6 раз менее активна в отношении варианта Дельта по сравнению с циркулировавшими на момент вариантами вируса [8,98,99]. Единичные аминокислотные замены могут значительно изменять конформацию RBD, что, в свою очередь, приводит к резистентности вируса к выработанным ранее антителам [100,101].

Рекомбинация между подвариантами Омикрон, такими как ХВВ, приводит к образованию гибридных геномов, которые объединяют мутации из различных линий. Так, вариант ХВВ.1.5, обладающий мутациями F486P и G252V, демонстрирует увеличенное сродство к ACE2 и большую устойчивость к нейтрализации, чем ранние циркулирующие варианты [101].

Несмотря на молекулярно-генетическую вариабельность структурных

компонентов S-белка вируса SARS-CoV-2, N-концевой домен S1-субъединицы и S2-субъединица характеризуются относительно высокой консервативностью, что позволяет им сохранять ключевые вируснейтрализующие эпитопы [90,102,103]. Однако вопрос о кросс-реактивности ВНА, индуцированных вариантами вируса, циркулировавшими на ранних этапах пандемии, и современными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2, остается недостаточно исследованным.

1.6 Клинико-лабораторные прогностические маркеры тяжести течения новой коронавирусной инфекции

Разработка прогностических моделей для оценки вероятности госпитализации и неблагоприятных клинических исходов новой коронавирусной инфекции представляет собой важное направление в области оптимизации клинической сортировки пациентов и стратегий их лечения. Следует отметить, что большинство существующих прогностических шкал характеризуются недостаточной воспроизводимостью результатов, а их диагностические показатели (чувствительность и специфичность) нуждаются в дополнительной валидации [13, 14].

Вероятность развития тяжелых форм коронавирусной инфекции прогрессивно увеличивается с возрастом. Гендерные различия также показывают статистически значимую корреляцию с тяжестью течения заболевания, где мужской пол ассоциируется с повышенным риском осложнений. Анализ летальных исходов показал, что более 90% случаев смерти зарегистрированы среди пациентов старше 60 лет, из которых 60% были мужчины [104].

Многочисленные клинические исследования продемонстрировали значимую корреляцию между наличием коморбидных состояний и риском развития тяжелых форм COVID-19, сопровождающихся неблагоприятными исходами [105-107]. Сопутствующая патология была преимущественно связана с сердечно-сосудистой патологией (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца), эндокринными нарушениями (сахарный диабет, ожирение), хроническими заболеваниями дыхательной системы (хроническая обструктивная болезнь легких,

бронхиальная астма), хронической болезнью почек, онкологическими заболеваниями и заболеваниями гепатобилиарной системы [108-111].

Клинический анализ крови является одним из наиболее доступных и информативных лабораторных методов ранней оценки тяжести течения COVID-19. Повышенный уровень лейкоцитов увеличивает вероятность тяжелого течения заболевания, в то время как снижение количества лимфоцитов ($<1,955 \times 10^9/\text{л}$) ассоциируется с тяжелым течением пневмонии, а снижение количества тромбоцитов ($<239 \times 10^9/\text{л}$) ассоциировано с тяжелой формой COVID-19 [112-115].

Поскольку комплексный анализ лабораторных маркеров позволяет эффективно прогнозировать тяжесть течения и исход новой коронавирусной инфекции, то лимфоцитарные и лейкоцитарные индексы стали рассматриваться как прогностические критерии течения инфекции [25-27,86,116]. Однако, со временем, чувствительность и специфичность данных критериев были подвержены изменениям [117-119].

Для прогностических целей тяжелого течения новой коронавирусной инфекции использовались различные биохимические показатели. Повышенные уровни интерлейкина-6, С-реактивного белка (СРБ), ЛДГ, ферритина, фибриногена и Д-димера в 2020–2022 годах ассоциировались с риском развития тяжелых форм COVID-19 [86, 120–127]. Ценность прогностических моделей в стационаре ограничена их статичностью: они не учитывают динамику патологического процесса. Это связано с отсутствием стандартизированных временных критериев, определяющих диагностическую значимость маркеров после манифестации симптомов. Проблемы валидации также выражаются в отсутствии стандартизированных пороговых значений для прогностических маркеров и значительной вариабельности референсных показателей, зависящих от используемых диагностических реагентов и оборудования, которыми оснащены лаборатории клинических стационаров. Эти методологические недостатки значительно затрудняют сравнительный анализ результатов различных исследований, разработку унифицированных алгоритмов прогнозирования и клиническую апробацию предложенных маркеров.

Согласно результатам многочисленных исследований и метаанализов, измерение активности ЛДГ в сыворотке крови представляет собой один из методов лабораторной оценки тяжести течения COVID-19, ассоциированного с повышенным риском как тяжелого течения заболевания, так и летального исхода [25-27, 128–132]. Следует отметить, что тяжесть состояния пациента с новой коронавирусной инфекцией не всегда обусловлена развитием острого респираторного дистресс-синдрома, у части пациентов тяжесть состояния может быть обусловлена дисфункцией других систем органов, которые могут повышать уровень активности ЛДГ в крови, например повреждение миокарда, острое почечное повреждение, острая печеночная недостаточность [133-138]. Поскольку ЛДГ представляет собой органоспецифичный внутриклеточный фермент, который осуществляет катализ преобразования лактата в пируват, он существует в виде пяти различных фракций, каждая из которых имеет свое характерное распределение в различных типах тканей. В частности, ЛДГ-1 в наибольшей степени обнаруживается в кардиомиоцитах, ЛДГ-2 преобладает в тканях ретикулоэндотелиальной системы, фракция ЛДГ-3 наиболее активно представлена в легких, ЛДГ-4 — в почках и поджелудочной железе, а ЛДГ-5 — в печени и поперечнополосатой мускулатуре. Таким образом, измерение общей активности ЛДГ не обладает достаточной тканевой специфичностью, а отсутствие стандартизированных пороговых значений, используемых в прогностических целях, существенно ограничивает его диагностическую ценность при идентификации пораженного органа [130, 131]. В этом случае возможным дополнительным лабораторным исследованием, позволяющим дифференцировать различные органные поражения, может служить определение изотипов (изоферментов) ЛДГ.

Последствия COVID-19 выходят далеко за рамки пандемии, проявляясь в долгосрочных осложнениях, медико-социальных проблемах и значительном экономическом ущербе [139-141]. Диагностические ограничения, связанные с несовершенством существующих серологических методов, а также постоянная антигенная изменчивость вируса SARS-CoV-2, способствующая уклонению от

иммунного ответа, подчеркивают необходимость регулярного обновления имеющихся знаний, мониторинга и разработки превентивных стратегий для эффективной борьбы с данной угрозой.

Результаты выполненного обзора литературы нашли отражение в опубликованных главе монографии и обзорной статье [79, 80].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В работе использовали клетки линии Vero (WHO Biologicals, Швейцария), представляющие собой культуру клеток почки зеленой мартышки.

Изоляты вируса SARS-CoV-2 выделяли из назофарингеальных мазков от пациентов, с первичным диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов). Описания групп пациентов и этические аспекты исследования описаны в разделе 2.2.

Для реакции нейтрализации использовали штаммы вируса SARS-CoV-2: ПИК35 (линия B.1.1, GISAID EPI_ISL_428852); 4724d (линия B.1.617.2, Дельта, GISAID EPI_ISL_8799478); 8995o (линия BA.1, Омикрон, GISAID EPI_ISL_9613539) и штаммы, выделенные в рамках данного исследования 10969 (линия XBB.1.9, Омикрон, GISAID EPI_ISL_18908494); 12751 (JN.1, Омикрон, GISAID EPI_ISL_19062522); 12454 (LF.7.1.3, Омикрон, EPI_ISL_19062520).

Для серологических исследований были взяты сыворотки крови пациентов, госпитализированных в Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» (ММКЦ «Коммунарка») и в ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ», с первичным диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов), собранные в период с 2020 по 2021 годы. Характеристики сывороток и этика исследования приведены в разделе 2.2.

2.2 Дизайн исследования

Исследование охватывает период с июля 2020 года по январь 2024 года и состоит из 4-х частей (Рисунок 4). В первой части (2020 г.) провели изучение

причин получения ложноположительных результатов определения IgM к вирусу SARS-CoV-2 на выборке медицинских работников [142]. Во 2-й части исследования (с октября 2022 года по январь 2024 года) выделяли изоляты вируса SARS-CoV-2 из назофарингеальных мазков, с последующим секвенированием генома вируса. В 3-й части исследования проводили анализ вируснейтрализующей активности сывороток, собранных от пациентов с диагнозом COVID-19 в 2020-2021 гг., по отношению к вариантам SARS-CoV-2, циркулировавшим в период с 2020 по 2025 гг., включая штаммы, выделенные во второй части исследования, с определением прогностических маркеров течения COVID-19 [143]. В 4-й части исследования в продолжение изучения прогностических характеристик определили порог значимости общей ЛДГ и ее изотипов в прогнозировании неблагоприятного течения пневмонии при COVID-19 [144] (Рисунок 4).

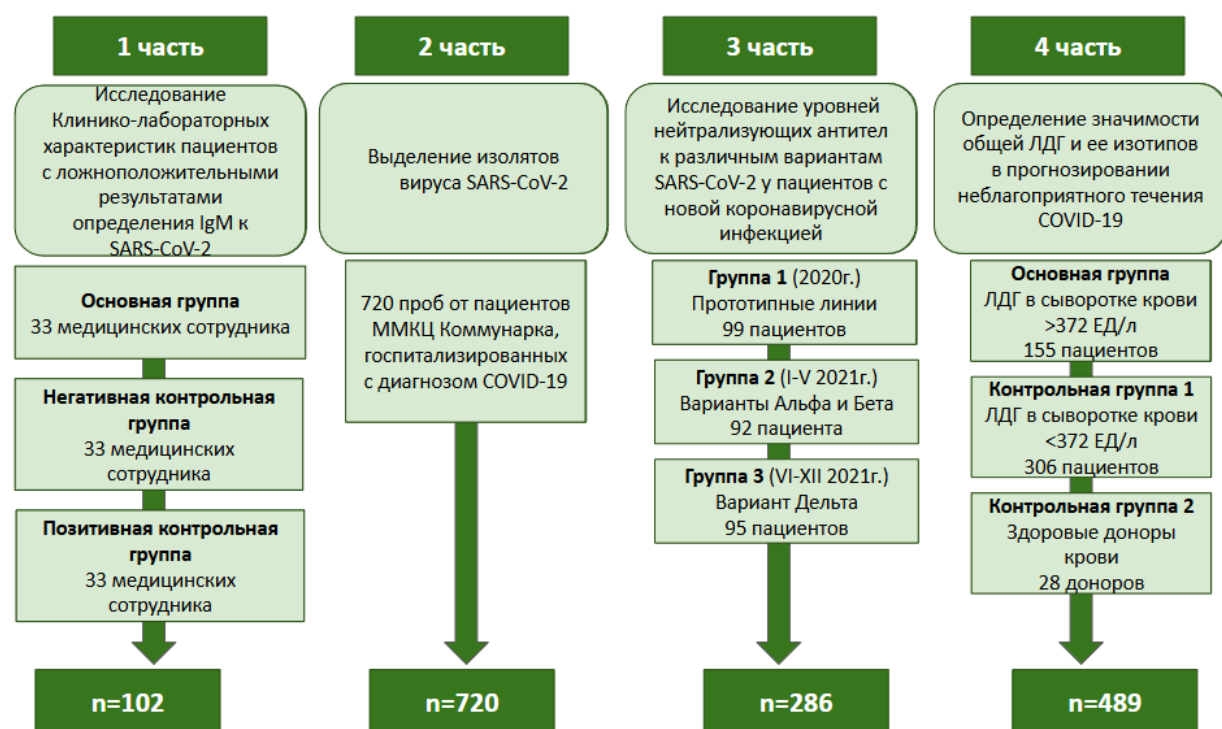


Рисунок 4 - Проведённые исследования: описание и характеристика включенных групп

2.3 Формирование групп исследования

2.3.1 Формирование групп 1-й части исследования

В рамках этой работы было осуществлено пилотное нерандомизированное

одноцентровое исследование, проведенное в период с 8 июля 2020 года по 1 октября 2020 года. Сбор сывороток и данных добровольцев проводили в ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» в отделении клинико-диагностической лаборатории №1 (заведующий отделением Синявкин Д.О.); Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Для проведения межгруппового сравнения были сформированы группы: Основная группа (Группа 1) и негативная контрольная группа (Группа 2). В дополнение к этим группам была создана контрольная группа (Группа 3) с целью уточнения фактических сроков сероконверсии IgG.

Группа 1 (Основная группа)

33 сотрудника ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ»

Критерии включения:

- двукратно положительные результаты определения IgM к вирусу SARS-CoV-2;
- отрицательные результаты определения IgG к вирусу SARS-CoV-2 в парных сыворотках, собранных с интервалом не менее 14 дней;
- отсутствие клинических симптомов COVID-19;
- отрицательные результаты исследования назофарингеальных мазков на РНК SARS-CoV-2 в ходе еженедельного скринингового обследования, проводимого в течение их работы в ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» до включения в исследование и в течение месяца после его завершения.

Группа 2 (Негативная контрольная группа)

33 сотрудника ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ», отобранные методом парного подбора к Группе 1.

Критерии включения:

- наличие двукратных отрицательных результатов определения антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 в парных сыворотках, взятых с интервалом не менее 14 дней;

- отсутствие клинических проявлений COVID-19;
- отрицательные результаты исследования назофарингеальных мазков на РНК SARS-CoV-2 в ходе еженедельного скринингового обследования, проводимого в течение времени работы в ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» до включения в исследование и в течение месяца после.

Группа 3 (Позитивная контрольная группа)

33 пациента, находившихся на лечении в ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» с диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов).

Критерии включения:

- отрицательные результаты определения антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2;
- наличие клинических проявлений COVID-19;
- положительный результат исследования мазков из носоглотки на наличие РНК SARS-CoV-2 (Таблица 1).

Таблица 1 - Формирование групп 1-й части исследования

Группа	Признаки COVID-19	IgM	IgG	Сероконверсия	ПЦР +
Группа 1 (n=33)	Нет	Положительно (×2)	Отрицательно (×2)	Нет	Нет
Группа 2 (n=33)	Нет	Отрицательно (×2)	Отрицательно (×2)	Нет	Нет
Группа 3 (n=33)	Да	Отрицательно при поступлении	Отрицательно при поступлении	Да	Да

Для проведения сравнительного анализа между экспериментальной и положительной контрольной группой был осуществлен анализ амбулаторных диспансерных карт, с акцентом на исследование хронических заболеваний. Кроме того, было проведено анкетирование медицинского персонала, в ходе которого были собраны дополнительные данные о наличии хронических заболеваний у

наблюдаемых [142].

Исследование проведено среди сотрудников ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» (протокол локально-этического комитета ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора №105 от 8 июля 2020 года).

2.3.2 Формирование групп 2-й части исследования

Во второй части исследования было осуществлено выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 из назофарингеальных мазков и частичное секвенирование генома вируса некоторых штаммов, а также закрепления изолятов для дальнейших исследований и внесения в рабочую коллекцию. В выборку исследования вошли пациенты, госпитализированные в центр Коммунарка (ММКЦ «Коммунарка») и в Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ») в период с октября 2022 года по октябрь 2025 года, с первичным диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов).

2.3.3 Формирование групп 3-й части исследования

В период с 24 апреля 2020 года по 3 ноября 2021 года из числа пациентов, госпитализированных в больницу ММКЦ «Коммунарка», с подозрением на COVID-19 методом случайной выборки было отобрано 3503 пациента для анализа. В соответствии с установленными критериями включения, из данной группы было выделено 427 человек, из которых сформированы подгруппы на основании времени возникновения заболевания и возрастных характеристик. В окончательную выборку вошли данные 286 пациентов.

Критерии включения:

- установленный диагноз U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов);

- госпитализация с апреля 2020 г. по ноябрь 2021 г.;
- заболевание при поступлении - средней тяжести и выше;
- положительный результат ПЦР назофарингеального мазка на РНК вируса SARS-CoV-2 во время или до госпитализации;
- отсутствие в анамнезе госпитализации по поводу COVID-19;
- отсутствие в анамнезе вакцинации против COVID-19;
- наличие антител IgG (ИХЛА) в сыворотке крови.

Критерии исключения:

- COVID-19, неподтвержденный методом ПЦР;
- вакцинация против COVID-19 в анамнезе или неизвестный вакцинальный статус;
- наличие предшествующей госпитализации по поводу COVID-19 в анамнезе;
- Ig G <10 ЕД/мл (ИХЛА) или невыполнение анализа на IgG к вирусу SARS-CoV-2;
- введение плазмы переболевших COVID-19 до момента взятия крови на IgG к вирусу SARS-CoV-2 (Рисунок 5) [143].

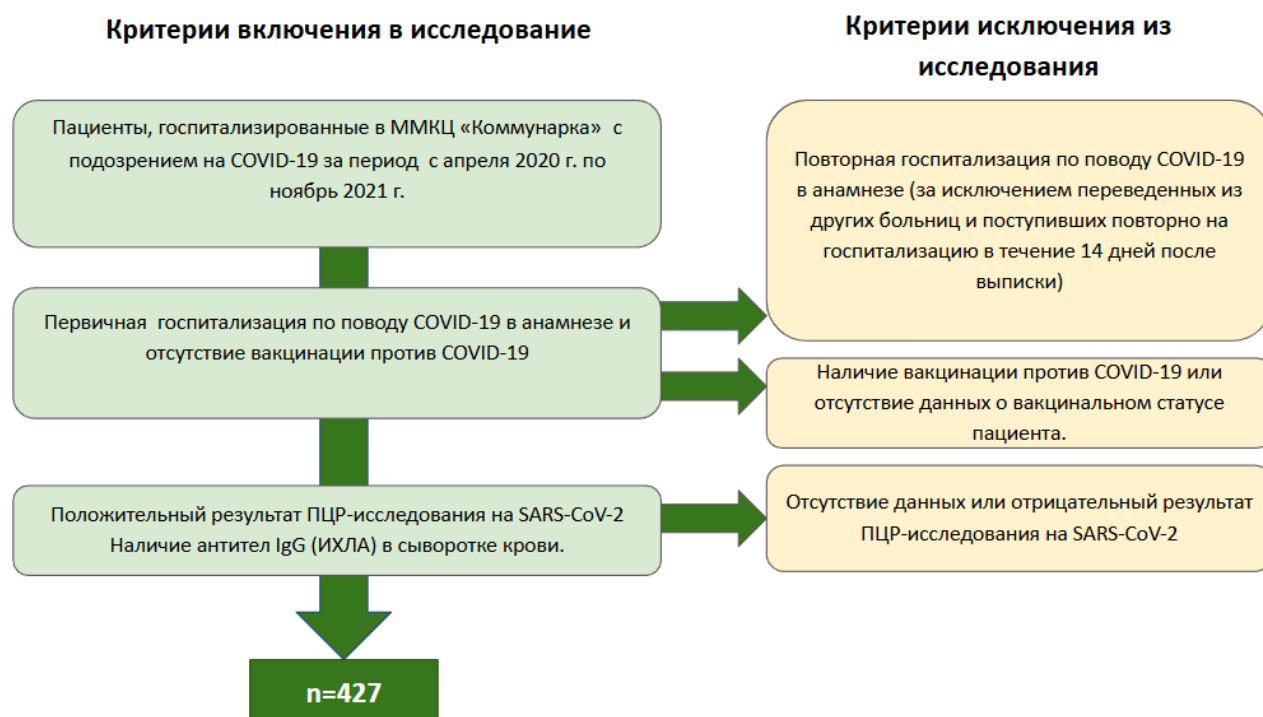


Рисунок 5 - Схема отбора пациентов 3-й части исследования. Формирование групп по временным интервалам

На основании информации о распространении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 в Российской Федерации, выбранные пациенты были классифицированы по временным периодам:

- Группа 1. Пациенты, которые были госпитализированы в 2020 году в период распространения различных вариантов прототипных линий (Pango B.1.1);
- Группа 2. Пациенты, которые были госпитализированы в стационар в период с января по май 2021 года, в условиях распространения вариантов вируса Альфа и Бета (Pango B.1.1.7 и B.1.351), а также их производных;
- Группа 3. Пациенты, которые были госпитализированы в стационар в период с июня по ноябрь 2021 года, в условиях распространения варианта Дельта (Pango B.1.617.2).

В дальнейшем, с целью учета иммунологических характеристик представителей различных возрастных категорий, группы были систематизированы и уравновешены по возрастам:

- пациенты от 18 до 45 лет (включительно);
- пациенты от 46 до 60 лет (включительно);
- пациенты старше 60 лет (Таблица 2) [143].

Таблица 2 - Число участников исследования и их распределение по группам в зависимости от сроков госпитализации и возраста

Параметр	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Циркулирующий вариант SARS-CoV-2 (Pango)	Прототипные линии (B.1.1)	Варианты Альфа и Бета (B.1.1.7, B.1.351)	Вариант Дельта (B.1.617.2)
≤ 45 лет	11	10	7
45–59 лет	20	20	17
≥ 60 лет	68	62	71
Всего	99	92	95

Информированное согласие на проведение диагностических исследований назофарингеальных мазков и сывороток крови было получено от всех участников исследования в первичных клинических учреждениях. Анализ историй болезни

проводился обезличено, без использования персональных данных пациентов, что не требует дополнительных разрешений.

2.3.4 Формирование групп 4-й части исследования

С 08.09.2021 г. по 26.09.2021 г. методом сплошной выборки из пациентов, госпитализированных с подозрением на COVID-19 в не реанимационные отделения ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ», было проанализировано 894 истории болезни. В дальнейшем для анализа, согласно критериям включения и исключения, в исследование были взяты данные 461 истории болезни.

Критерии включения в исследование:

- обнаружение РНК вируса SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки методом ПЦР во время госпитализации;
- известна дата появления клинических симптомов новой коронавирусной инфекции;
- средняя степень тяжести течения COVID-19 по результатам осмотра при поступлении;
- определение активности общей ЛДГ и ее изотипов (при значениях активности общей ЛДГ $>1,5$ нормы) за время госпитализации.

Критерии исключения:

- повторное поступление в стационар за данный период COVID-19 и/или первоначальное поступление в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) из приемного отделения, минуя приемное отделение в связи с тяжестью течения заболевания;
- гемолиз сыворотки крови [144].

Для оценки прогностической значимости активности общей ЛДГ в предсказании неблагоприятного течения COVID-19 результаты измерений были разделены на две группы. Основываясь на данных предыдущих исследований, порог прогностической значимости был установлен на уровне 1,5 нормы от референсного значения, что соответствовало 372 ед/л в применяемой тест-системе [128,132, 144]. С целью оптимизации расхода реагентов определение изотипов ЛДГ

проводили только у пациентов с активностью общей ЛДГ, превышающей норму в 1,5 раза.

В 1-ю группу вошли пациенты, у которых активность общей ЛДГ в сыворотке крови при первичном исследовании составляла ≥ 372 ед/л и было проведено определение изотипов ЛДГ за время госпитализации.

Во 2-ю группу (контрольная Группа 1) вошли данные пациентов, у которых активность общей ЛДГ в сыворотке крови составляла < 372 ед/л во всех исследованиях крови, проведенных за время госпитализации (Рисунок 6).

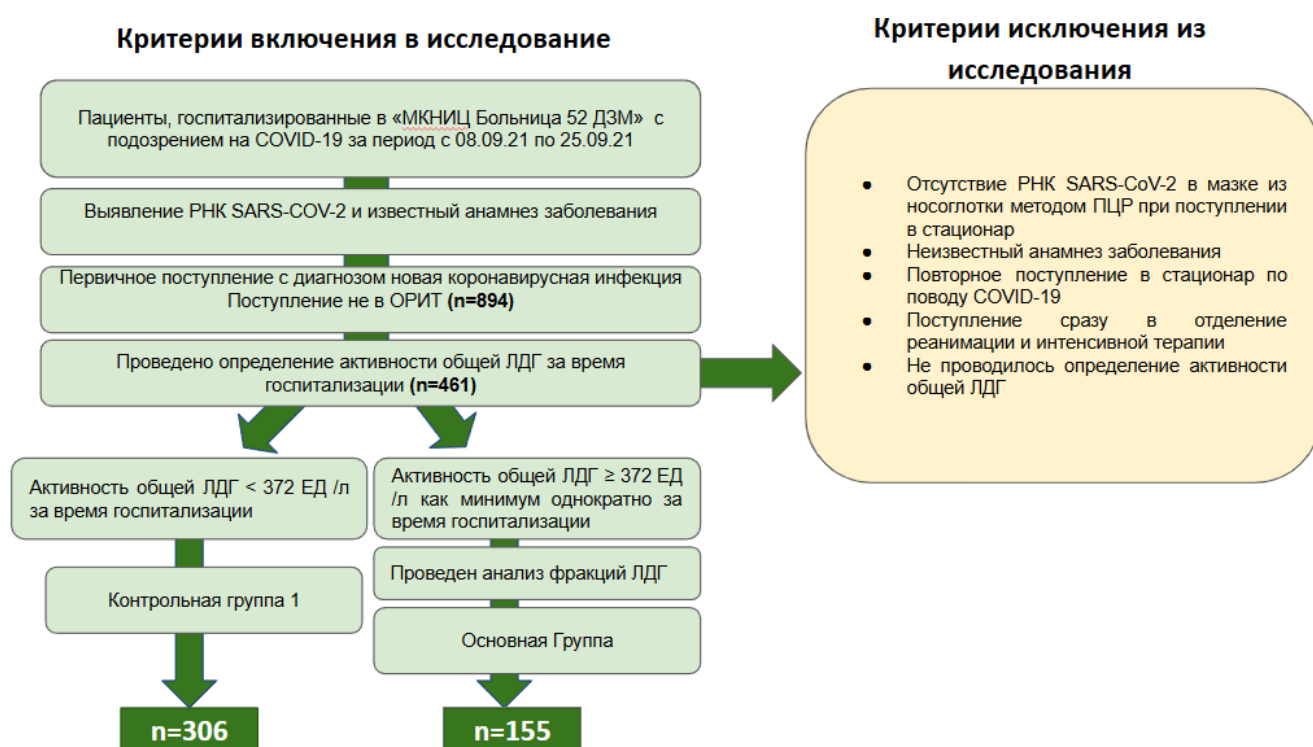


Рисунок 6 - Схема отбора пациентов 4-й части исследования

С целью анализа соотношения изоферментов ЛДГ в контексте диагностики органных поражений, пациенты с COVID-19 из первой группы были разделены на подгруппы, основываясь на исходах заболевания, наличии сопутствующих патологий и органных поражений, которые были подтверждены с использованием альтернативных методов диагностики [144].

Для оценки изменений соотношения фракций ЛДГ при COVID-19 была сформирована контрольная Группа 2 из числа здоровых доноров крови и ее

компонентов, в рамках которых определяли активность общей ЛДГ и исследование изоферментов ЛДГ (n=28).

Критерии включения:

- активность ЛДГ в пределах референтных значений (<248 Ед/л).
- отсутствие острых и/или декомпенсации хронических заболеваний, отсутствие хронических заболеваний, влияющих на активность ЛДГ по результатам обследования.

Критерии исключения:

- наличие острых и/или декомпенсации хронических заболеваний, наличие хронических заболеваний, влияющих на активность ЛДГ.

Информированное согласие было получено от всех участников исследования. Для проведения ретроспективного анализа обезличенных данных, полученных из Единой медицинской информационно-аналитической системы и лабораторной информационной системы «АЛИСА», медицинской информационной системы «ОРБИТА» дополнительного согласия не требовалось. В исследовании использовались только идентификационные номера, без указания фамилий, имен и отчеств и других персональных данных пациентов.

Этические нормы исследования соответствуют Хельсинской декларации (2013 г.) и приказу Минздрава РФ №403н (2016 г.).

2.4 Вирусологические методы

2.4.1 Культивирование клеток Vero

Культивирование клеток проводили сотрудники ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Антонова И.П. и Сиразова Д.И. в лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом.

Для культивирования клеток линии Vero использовали культуральную среду ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита),

Россия) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen, Южная Америка) в концентрации 5% и смесью антибиотиков пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия).

Клетки вели на культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 75 см² и перевивали каждые 48–72 часов с использованием растворов трипсина и Версена (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) в соотношении 1:1.

Для выделения изолятов вируса из назофарингеальных мазков клетки рассаживали на культуральные пробирки со скошенным дном-платформой площадью 5 см² (NUNC, США), а для постановки реакции нейтрализации – на 96-луночные плоскодонные планшеты с обработанным дном (SPL, Корея).

2.4.2 Выделение вируса SARS-CoV-2 из назофарингеальных мазков

К назофарингеальному мазку от пациента с подтвержденным диагнозом U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов) добавляли 1 мл физиологического раствора и встряхивали на вортексе в течение 1 мин при комнатной температуре. Суспензию собирали и использовали для заражения культуры клеток Vero.

В 5 см² культуральные пробирки с 24–48 часовым конфлюэнтным монослоем клеток Vero в среде ДМЕМ ((ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) с добавлением 5-кратной дозы смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия) вносили 500 мкл суспензии назофарингеального мазка и инкубировали при температуре 37 °С с ежедневным мониторингом признаков цитопатического действия (ЦПД) до 7-ого дня после заражения. Пробирки с признаками ЦПД замораживали при -80 °С для дальнейшей работы. Пробирки без признаков ЦПД замораживали/размораживали для разрушения клеток и использовали для второго пассажа в 5 см² культуральных пробирках со свежими клетками Vero. Заражённые клетки наблюдали в течение 7 дней: пробирки с признаками ЦПД замораживали при -80 °С для дальнейшей

работы; пробирки без признаков ЦПД на 7-е сутки после заражения уничтожали и считали негативными. Пробирки с признаками бактериального или грибкового роста на первом или втором пассаже также уничтожали и далее не использовали.

2.4.3 Пассирование вируса в культуре клеток Vero

Изоляты вируса SARS-CoV-2, отобранные для дальнейшего исследования и использования в реакции нейтрализации, размножали в клетках Vero в культуральных флаконах площадью 75 см². Перед заражением монослой клеток промывали средой, после чего вносили 500 мкл вируссодержащей жидкости первого или второго пассажа. Для адсорбции вируса на клетках заражённый флакон помещали в СО₂-инкубатор на 1 час, после чего добавляли 30 мл среды ДМЕМ со смесью антибиотиков пенициллина/стрептомицина. Заражённые клетки инкубировали при 37 °С до появления признаков ЦПД. При достижении распространения ЦПД на 75–100% клеток флакон замораживали/размораживали, а вируссодержащую суспензию разливали по криопробиркам и хранили при температуре -70 °С.

2.4.4 Титрование вируса в культуре клеток Vero

Титрование инфекционной активности изолятов вируса SARS-CoV-2 проводили методом определения 50% тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀) в культуре клеток Vero. Для этого суспензию вируса последовательно разводили в десятикратной прогрессии от 10⁻¹ до 10⁻⁸ на среде ДМЕМ без сыворотки. Каждое разведение вносили в восемь лунок 96-луночного планшета с 24-часовым конфлюэнтным монослоем клеток Vero. После адсорбции вируса в течение 1 часа при 37 °С в лунки добавляли по 100 мкл поддерживающей среды ДМЕМ с 2% фетальной бычьей сывороткой. Клетки инкубировали при 37°С в атмосфере 5% СО₂ в течение 5 суток. Наличие специфического ЦПД учитывали на 5-е сутки. Каждое титрование выполняли в трех независимых экспериментах. Титр рассчитывали по формуле Кербера и выражали в виде log ТЦД₅₀/мл [154]. По результатам трёх экспериментов считали средний геометрический титр (СГТ).

2.4.5 Реакция нейтрализации в культуре клеток Vero

В круглодонных 96-луночных планшетах готовили 8 двукратных разведений сыворотки, начиная с 1:4 на питательной среде ДМЕМ, содержащей 2% фетальную бычью сыворотку. Далее готовили рабочее разведение вируссодержащей суспензии с 100 ТЦД₅₀ на 50 мкл. Рабочее разведение вируса смешивали с разведениями сывороток 1:1 и инкубировали в течение одного часа при температуре 37°C, после чего добавляли по 100 мкл полученной смеси к монослою клеток Vero в двух репликатах. Дозу вируса контролировали посредством титрования, начиная с рабочего разведения и последующих трех десятикратных разведений. Оценку цитопатического действия проводили на пятый день после инфицирования с использованием светового микроскопа (Olympus CKX31, Япония) при увеличении 100×. Расчет титра антител осуществляли согласно методике Кербера [145].

Сыворотки, не демонстрировавшие вируснейтрализующей активности в разведении 1:8, считали негативными.

2.5 Молекулярно-генетические методы

2.5.1 Одноступенчатая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОТ-ПЦР проведено совместно с сотрудником ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Сиразовой Д.И. в лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом.

ОТ-ПЦР для наработки ампликионов для секвенирования гена S SARS-CoV-2 проводили с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Tough Mix, Quantabio; США) по инструкции производителя. Смесь для амплификации готовили из расчёта на 1 пробу: 10 мкл буфера, по 2,5 мкл праймеров, 19 мкл воды, 2 мкл выделенной РНК изолята. Амплификацию проводили на термоциклере Arktik

Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием следующего температурного режима: обратная транскрипция при 50 °С в течение 31 мин, денатурация при 95 °С в течение 15 мин, далее 40 циклов ПЦР, включающих этапы денатурации при 94 °С в течение 30 с, отжига праймеров при 65 °С в течение 30 с и элонгации при 72 °С в течение 2 мин. Завершающий этап амплификации проводили при 72 °С в течение 10 мин.

2.5.2 Аналитический электрофорез продуктов амплификации одноступенчатой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Для анализа наработки специфических ампликонов продукты амплификации ОТ-ПЦР разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле в буфере 1×TAE (0,04 М Трис, 0,02 М CH₃COOH, 1 мМ EDTA, pH 8,3). Для приготовления геля в 100 мл буфера TAE добавляли 1 г агарозы, после чего смесь нагревали с периодическим перемешиванием до полного растворения агарозы. К раствору добавляли 5 мкл бромистого этидия в концентрации 10 мкг/мл до конечной концентрации в агарозном геле 0,5 мкг/мл. В форму для заливки геля помещали гребенку на 30 лунок, заливали раствор агарозы и охлаждали при комнатной температуре до полного застывания. Перед загрузкой в лунки 5 мкл ПЦР-продукта смешивали с 1 мкл 6-кратного буфера для нанесения на гель, содержащего уплотнители и красители (GelPilot Loading Dye; Qiagen, Германия). Полученную смесь вносили в лунки агарозного геля. Для определения длины исследуемых фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в одну из лунок добавляли 3 мкл маркера длины ДНК (GeneRuler DNA Ladder mix, Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в горизонтальной форежной камере Sub-Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Камеру подключали к источнику питания PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories, США). Разделение образцов осуществляли при напряжении 110 В (напряженность поля ~10 В/см) в течение 30–40 минут. Результаты визуализировали с использованием ультрафиолетового излучения трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция).

Образцы, в которых было подтверждено наличие целевого фрагмента ДНК, были отобраны для проведения препаративного электрофореза.

2.5.3 Препаративный электрофорез продуктов амплификации одноступенчатой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Препаративный электрофорез был осуществлён по аналогичной методике с использованием 1% агарозного геля на 1×ТАЕ и гребёнки, рассчитанной на 10 лунок. В каждую из лунок было добавлено по 45 мкл образца, предварительно смешанных с 5 мкл красителя для последующего нанесения на гель. Электрофорез проводили при напряжении 90 В в течение одного часа. Участок геля, содержащий продукт ПЦР необходимой длины, был выявлен с помощью трансиллюминатора, вырезан, помещён в стерильную одноразовую пробирку и заморожен -20 °С для дальнейшего исследования.

2.5.4 Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Пробирку с вырезанным гелем взвешивали, к 1 г геля добавляли 3 мл буфера QG и инкубировали при 50 °С до полного растворения, периодически перемешивая. Затем добавляли эквивалентный объём изопропанола, тщательно перемешивали и наносили образцы на спин-колонки QIAquick, установленные в пробирки на 2 мл. После центрифугирования при 17000 g в течение 1 мин фильтрат удаляли. Колонки промывали 500 мкл буфера QG, затем 750 мкл промывочного буфера с последующим центрифугированием. Для удаления остатков промывочного раствора проводили дополнительное центрифугирование. Колонки переносили в новые стерильные пробирки на 1,5 мл, добавляли 30 мкл буфера EB, выдерживали 4–5 мин и центрифугировали при 17000 g в течение 1 мин. Полученный фильтрат содержал очищенную ДНК, готовую к секвенированию. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически.

2.5.5 Секвенирование гена белка S SARS-CoV-2 и обработка хроматограмм

Секвенирование гена S SARS-CoV-2 и обработка хроматограмм проводилась сотрудниками лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) к.м.н Холодиловым И.С, к.б.н. Литовым А.Г, к.б.н. Шустовой Е.Ю.

Для секвенирования использовали 40 нг очищенной ДНК и 3,2 пикомоль праймера. Секвенирование осуществляли на секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с применением набора реагентов BigDye 3, в соответствии с инструкциями производителя.

Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, были проанализированы с использованием программы SeqMan v7.0.0 из пакета DNASTar LaserGene (DNASTAR, Inc., Мэдисон, США). Референсные последовательности для участка гена S были загружены из базы данных GenBank. Полученные последовательности гена белка S и референсные последовательности были выровнены в программе MEGA X (версия 10.2.6) с использованием алгоритма Muscle.

2.6. Серологические методы

2.6.1 Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа

Определение антител к SARS-CoV-2 методом ИФА проводили сотрудники ФБУН Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для определения антител классов IgM, IgG и IgA к вирусу SARS-CoV-2 использовали наборы реагентов компаний NovaTec Immundiagnostica GmbH (Германия), Euroimmun AG (Германия) и «Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd» (Китай). Исследования проводили по инструкциям производителей.

Планшеты, сенсibilизированные антигенами вируса (N-белком или S1-

субъединицей S-белка с RBD-доменом), инкубировали с разведёнными образцами сыворотки. После отмывки добавляли конъюгат (антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой хрена), затем субстрат ТМБ. Реакцию останавливали стоп-раствором и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Образец считался положительным, если его показатель превышал пороговое значение (cut-off), рассчитанное по инструкции (на основе отрицательных контролей или калибровочной кривой). В количественных тестах концентрацию антител определяли в МЕ/мл по калибровочной кривой с использованием стандартов, предоставленных производителем.

2.6.2 Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 методом иммунохемилюминесцентного анализа

Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 методом ИХЛА проводили совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории №1 ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» и клинико-диагностической лабораторией ММКЦ «Коммунарка».

Для выявления антител классов IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 использовали наборы «SARS-CoV-2 IgM» и «SARS-CoV-2 IgG» (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Китай) на автоматическом анализаторе CL-2000. В исследовании использовали тест-системы следующих лотов: SARS-CoV-2 IgM (лот № 1, 105-019881-00) и SARS-CoV-2 IgG (лот № 1, 105-019882-00), серийный номер 2020050100. При осуществлении ИХЛА для определения иммуноглобулинов к вирусу SARS-CoV-2 использовали лот № 2, который включал реагенты для выявления антител IgM (SARS-CoV-2 IgM 105-019881-00) и IgG (SARS-CoV-2 IgG 105-019882-00), серийный номер 2020050211. Характеристики примененных тест-систем представлены в Таблице 3.

Все процедуры выполняли согласно инструкциям производителя. Метод основан на связывании антител сыворотки пациента с магнитными микрочастицами, покрытыми антигенами вируса (N- и S-белками). На следующем этапе вносили конъюгат (антитела к IgM или IgG человека, меченные

акридиниевым эфиром), что инициировало хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность свечения измеряли в относительных световых единицах, что отражало концентрацию антител. Результаты рассчитывались автоматически. Проба считалась положительной при значении сигнала к пороговому уровню $\geq 1,0$. Для IgG концентрацию антител выражали в МЕ/мл по встроенной в анализатор калибровочной кривой.

Таблица 3 - Диагностическая характеристика использованных тест-систем выявления антител к вирусу SARS-CoV-2

Метод	Производитель, анализатор	Антигены SARS-CoV-2 в составе тест-системы	Аналит	Чувствительность, %	Специфичность, %
ИХЛА, Лот №1	Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Китай, Mindray CL-2000	N, S	IgM	81,7	91,7
			IgG	96,3	93,9
ИХЛА, Лот №2			IgM	89,6	93,3
			IgG	100	94,9
ИХА	Inzek International Trading B.V., Нидерланды, ручной метод	нет данных*	IgM	85,0	96,0
			IgG	100	98,0
ИФА №1	NovaTec Immundiagnostica GmbH, Германия, ручной метод	N	IgM	57	100
			IgG	100	99,2
ИФА №2	Euroimmun AG, Германия, ручной метод	S1(RBD)	IgA	100	92,4
			IgG	93,8	99,0
ИФА №3	Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd, Китай, ручной метод	нет данных*	IgM	95,0	99,5

* Не указано в инструкции производителя.

2.6.3 Выявление маркеров аутоиммунных заболеваний у людей с ложноположительными IgM к SARS-CoV-2

Выявление маркеров аутоиммунных заболеваний проводили совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории №1 ГБУЗ «МКНИЦ

Больница 52 ДЗМ» к.м.н. Сайфуллиным Р.Ф. и Жафаровым Р.Х.

Для исследования аутоиммунных маркеров была проведена оценка общей концентрации иммуноглобулинов А, М и G с использованием метода иммунотурбидиметрии на анализаторе Beckman Coulter Inc. (США, модель AU 640). Также были определены уровни ревматоидного фактора с применением того же метода. Принцип метода основан на формировании иммунных комплексов при связывании антител с антигенами, что приводит к изменению оптической плотности раствора, регистрируемой анализатором.

Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антинуклеарный фактор, антитела к двуспиральной ДНК, к кардиолипину и к β 2-гликопротеину I (определяли методом ИФА с использованием тест-систем фирмы Euroimmun AG (Германия): Anti-dsDNA-NcX ИФА, Anti-CCP ИФА, «Антитела к кардиолипину скрининг». Исследование проводили согласно протоколу производителя, включающему инкубацию сыворотки с покрытой антигеном планшетной поверхностью, серию промываний, добавление фермент-конъюгированного вторичного антитела и колориметрическое выявление результата.

Антитела к тиреоглобулину и антитела к тиреопероксидазе определяли также методом ИФА, но с использованием анализатора Beckman Coulter Inc. (США, модель DxI). Для всех ИФА-проб соблюдали стандартные условия инкубации, контроли и калибровки, что обеспечивало точность и воспроизводимость результатов.

2.7 Биохимические исследования сыворотки крови

Биохимические исследования сыворотки крови проводили сотрудники клинико-диагностической лаборатории №1 ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» и клинико-диагностической лаборатории ММКЦ «Коммунарка».

Для оценки функционального состояния печени, почек и системного воспаления определяли уровни ЛДГ, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, креатинина и ферритина с использованием готовых реактивов на автоматическом биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 680

(США). Принцип анализа основан на спектрофотометрическом измерении изменения оптической плотности раствора в ходе ферментативной реакции или связывания реагента с определяемым веществом.

Для определения концентрации pro-BNP использовали иммуноферментный метод на автоматическом анализаторе Immulite 2000 (Siemens, Германия), где специфические антитела связывают целевой пептид, а образование комплекса выявляется по колориметрическому сигналу, пропорциональному концентрации вещества. Определение изоферментов ЛДГ проводилось с помощью электрофореза на геле HYDRAGEL 7 ISO-LDH (Sebia electrophoresis, Франция). Метод основан на разделении изоферментов по подвижности в электрическом поле и последующем выявлении активности ферментов с использованием субстратного окрашивания.

Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Beckman Coulter DxH (США) с использованием технологии гидродинамического фокусирования и лазерной детекции для определения количества и морфологических характеристик форменных элементов крови.

2.8 Инструментальное обследование пациентов

Инструментальное обследование пациентов проводили сотрудники ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ» и ММКЦ «Коммунарка». Инструментальное обследование включало проведение эхокардиографии (аппарат LOGIQ S8, GE Healthcare, США) и мультиспиральной компьютерной томографии грудной полости на аппарате Toshiba Aquilion PRIME (Япония).

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли с применением программных пакетов MS Excel, IBM SPSS Statistics (версии 23.0 и 26.0) и OriginPro 2020. Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Шапиро-Уилка (для выборок, состоящих менее чем из 50 наблюдений) и критерий Колмогорова-Смирнова (для выборок, содержащих 50 и более наблюдений). В случае нормального распределения данных представлены

среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD). При отклонении от нормального распределения использовали медиану [Me], первый квартиль (Q1) и третий квартиль (Q3), определяющие межквартильный размах. Качественные данные были представлены в виде абсолютных значений, долей (%) и 95% доверительного интервала (ДИ), рассчитанного методом бутстрепа. Для сравнения независимых выборок количественных данных с ненормальным распределением применялся U-критерий Манна-Уитни. В случае сравнения нескольких таких выборок использовали H-критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Бонферрони. Для анализа независимых выборок качественных данных применяли критерий χ^2 (Хи-квадрат Пирсона). При наличии ограничений для применения χ^2 (например, когда ожидаемое значение в одной из ячеек составляет менее 10) использовали точный критерий Фишера. Для оценки величины эффекта при сравнении относительных показателей рассчитывали относительный риск с указанием 95% ДИ. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. 95% доверительные интервалы для средних значений и долей рассчитывали стандартными методами и методом бутстрепа соответственно. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика пациентов с ложноположительными результатами определения IgM к вирусу SARS-CoV-2

Во время пандемии и действия ограничительных мер массовый скрининг населения неизбежно приводил к выявлению случаев, не связанных с истинным инфицированием (от 5 до 27 на 1000 исследований) [12], и создавал значительные трудности в клинической практике и эпидемиологическом надзоре. В литературе описаны примеры ложного выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 на фоне других заболеваний [28-30]. Такие наблюдения не позволяли полноценно оценить истинное количество ложноположительных результатов тестов и определить обстоятельства, приведшие к таким результатам. Первая часть нашего исследования посвящена выявлению причин получения ложноположительных результатов обнаружения IgM к вирусу SARS-CoV-2. Для этого сначала был проведен сравнительный анализ вероятности выявления IgM в образцах сыворотки крови с применением наборов реагентов различных производителей, а затем анализ клинико-лабораторных показателей у пациентов с ложноположительными результатами IgM к вирусу SARS-CoV-2 по сравнению с контрольными группами.

3.1.1 Сравнение лиц с ложноположительными IgM к SARS-CoV-2 (Группа 1) и негативной контрольной группой (Группа 2)

Группа 1 и Группа 2 были сформированы методом подбора пар и по демографическим показателям различий не имеют (Таблица 4). Средний возраст участников составил $43,7 \pm 12,5$ лет. Интервал между заборами крови в первой группе составил 49 дней, при этом межквартильный диапазон составил от 34,5 до 58,0 дней. Для второй группы данный показатель был 43,5 дня, с межквартильным диапазоном от 39,0 до 51,2 дней. В обеих группах наблюдали значительное преобладание женщин (90,9%), что может быть связано с высоким процентом женщин, занятых в сфере здравоохранения. В позитивной контрольной группе доля

женщин составила 47% ДИ(30%–64%) (Таблица 4).

Таблица 4 - Демографические характеристики групп 1-й части исследования

Группа	Женщины, % (95%ДИ)	Возраст, годы		
		Минимум	Максимум	М ± SD
Группа 1. (n=33)	90,9 (80–100)	22	68	43,7 ±12,5
Группа 2. Негативная контрольная (n=33)	90,9 (80–100)	22	68	43,8 ±12,5
Группа 3. Позитивная контрольная (n=33)	47 (30–64)	28	78	56,0 ±12,9

В ходе анализа амбулаторных карт и анкет участников, относящихся к группам 1 и 2, были выявлены следующие аутоиммунные патологии: хронический аутоиммунный тиреоидит (n=6), псориаз (n=3), неспецифический язвенный колит (n=1) и антифосфолипидный синдром (n=1) (Таблица 5).

Таблица 5 - Сравнительный анализ хронических заболеваний у участников в группах 1 и 2

Заболевание в анамнезе	Группа 1 n % (95%ДИ)	Группа 2 n % (95%ДИ)	p (Критерий Фишера)
Аутоиммунные заболевания	5 15 (3–28)	6 18 (6–31)	0,733
Бронхиальная астма	3 9 (0–20)	1 3 (0–10)	*
Гипертоническая болезнь	3 9 (0–20)	9 26 (12–42)	*
Сахарный диабет	1 3 (0–10)	1 3 (0–10)	*
Онкологические заболевания	3 9 (0–20)	3 9 (0–19)	*
Болезни опорно-двигательного аппарата	5 15 (3–27)	7 21 (8–35)	0,751
Патология щитовидной железы	3 9 (0–20)	7 21 (8–35)	*

*— статистическое сравнение невозможно в связи с малым числом ожидаемых наблюдений в ячейках таблиц сопряженности.

Маркеры аутоиммунных болезней были обнаружены у 35 участников из 68, что значительно превышает число лиц с клиническими проявлениями указанных заболеваний (n=11) (Таблица 6). В результате проведенного сравнительного анализа данных о наличии хронических заболеваний, а также оценку маркеров,

ассоциированных с аутоиммунными патологиями, не было установлено статистически значимых различий между исследуемыми группами (Таблица 6).

Таблица 6 - Частота выявления маркеров аутоиммунных заболеваний в группах сравнения

Заболевание в анамнезе	Группа 1 n % (95%ДИ)	Группа 2 n % (95%ДИ)	p (Критерий Фишера)
Наличие любого из маркеров аутоиммунных заболеваний у пациентов	18 53 (38–72)	17 50 (48–80)	0,805
Антитела к гликопротеиду	7 21 (6–36)	4 12 (3–23)	0,511
Антитела к тиреопероксидазе	8 23 (10–38)	5 15 (3–28)	0,537
Ревматоидный фактор, суммарный	0	2 6 (0–14)	*
Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду	0	4 12 (3–23)	*
Антинуклеарный фактор	2 6 (0–15)	0	*
Антитела к двуспиральной ДНК	0	1 3 (0–10)	*
Антитела к кардиолипину	1 3 (0–10)	0	*
Антитела к тиреоглобулину	0	1 3 (0–10)	*

* – статистическое сравнение невозможно в связи с малым числом ожидаемых наблюдений в ячейках таблиц сопряженности.

При анализе общих концентраций иммуноглобулинов классов А, М, G значимые различия выявлены в концентрации IgA, однако данное статистическое различие клинически не значимо (Таблица 7).

Таблица 7 - Сравнение общих концентраций иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотках крови участников в группах 1 и 2

Класс иммуноглобулинов	Группа 1 Me [Q1; Q3]	Группа 2 Me [Q1; Q3]	p (U-критерий Манна-Уитни)
IgA	215,2 ±79,2	245,5 ±97	0,030
IgM	146,5 ±62,1	128,5 ±46,6	0,115
IgG	1179,3 ±206,3	1282,3 ±222,85	0,132

3.1.2 Сравнение воспроизводимости результатов различных тест-систем в определении IgM и IgG антител к вирусу SARS-CoV-2

В первых образцах экспериментальной группы 1, анализируемых с использованием набора реагентов IgM ИХЛА лот №1, во всех образцах крови (34/34) были обнаружены IgM к вирусу SARS-CoV-2 и не обнаружены IgG (критерий для включения в основную группу).

В повторных образцах крови при использовании этого же набора (ИХЛА лот №1) только 20 из 33-х образцов были положительными (Cut-Off Index (COI) $\geq 1,0$). При использовании реагентов IgM ИХЛА лот 2 в этой же группе IgM были выявлены только в одном образце сыворотки крови, отрицательном по данным ИХЛА лот №1 (COI $< 0,9$). При использовании набора ИХА производства Inzek International Trading B.V. (Нидерланды) выявлено 15 положительных результатов (отчетливое окрашивание тестовой полосы) и 2 сомнительных результата (слабое окрашивание тестовой полосы, пограничное для визуальной оценки) определения IgM к вирусу SARS-CoV-2; результаты частично совпадали с ИХЛА лот №1. При использовании реагентов ИФА №1 в 5 образцах были установлены положительные результаты определения IgM (оптическая плотность/ COI $> 1,1$), а в 5 случаях – сомнительные результаты (оптическая плотность/COI 0,9–1,1); результаты также частично совпадали с ИХЛА лот №1. В свою очередь при использовании набора реагентов IgM ИФА №3 положительный результат (оптическая плотность/COI $< 0,9$) выявлен только в 1 образце сыворотки крови отрицательном по данным ИХЛА лот №1.

Исследование IgG к вирусу SARS-CoV-2 в повторных образцах сыворотки крови в группе 1 выявило, что при использовании наборов реагентов ИХЛА лот 2 и ИХА все образцы были отрицательными, тогда как при использовании наборов реагентов ИФА №1 получено 3 положительных результата и 1 отрицательный, а при использовании набора ИФА №2 зафиксирован только один положительный результат определения IgG к вирусу SARS-CoV-2. При этом результаты ИФА №1 и ИФА №2 между собой не совпадали.

Также был отмечен 1 случай выявления IgA к вирусу SARS-CoV-2 в данных образцах с использованием набора IgA ИФА №2 (Таблица 8).

Таблица 8 - Результаты определения антител к вирусу SARS-CoV-2 в различных тест-системах в группе 1 во 2-м образце сыворотки крови

№ п/п	IgM					IgG				IgA	ВНА
	ИХЛА лот 1	ИХЛА лот2	ИХА	ИФА №1	ИФА №3	ИХЛА лот 2	ИХА	ИФА №1	ИФА №2	ИФА №2	РН
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
10	+	–	+	±	–	–	–	+	–	–	–
11	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
12	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	+	–	–	+	–	–	–	±	–	–	–
14	+	–	±	–	–	–	–	–	–	–	–
15	+	–	+	±	–	–	–	–	–	+	–
16	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
17	+	–	+	±	–	–	–	–	–	–	–
18	–	+	–	±	–	–	–	–	–	–	–
19	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
20	+	–	+	±	–	–	–	–	–	–	–
21	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
23	+	–	±	+	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
25	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
26	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
27	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
28	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
30	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
32	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
32	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
33	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

– – отрицательный результат;

± – сомнительный результат;

+ – положительный результат;

Во втором образце сыворотки крови, при определении специфических IgG, IgM и IgA к вирусу SARS-CoV-2 с помощью различных наборов реагентов, отрицательные результаты всех исследований были зарегистрированы лишь у 7 участников (Таблица 8). Положительные (+) или сомнительные (±) результаты определения IgM, полученные с использованием тест-системы ИХЛА лот №1 оставались положительными при повторном исследовании в 59%, при использовании ИХА - в 44%, а при использовании ИФА №1 - в 29% (Таблицы 8 и 10).

В группе 2 в первичных образцах с использованием набора реагентов ИХЛА лот №1 не выявлено IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 (критерий включения в негативную контрольную группу). При исследовании повторных образцов положительные или сомнительные результаты определения IgM/IgG/IgA были получены в 9 случаях.

IgM к вирусу SARS-CoV-2 были выявлены при использовании набора ИХА (1 сомнительный результат), ИФА №1 (1 сомнительный и 1 положительный результат), ИФА №3 (1 положительный результат). Положительные (+) и сомнительные (±) результаты определения IgG к вирусу SARS-CoV-2 при использовании различных наборов реагентов были выявлены в 2-х случаях при использовании ИФА №1. IgA к вирусу SARS-CoV-2 были выявлены в 2 случаях при использовании набора ИФА №2 (Таблицы 9 и 10).

С целью оценки достоверности определения результатов тестирования на антитела к вирусу SARS-CoV-2 было осуществлено исследование вируснейтрализующей активности в первом и втором образцах сыворотки крови участников, принадлежащих к группам 1 и 2. В результате проведенного анализа ВНА к штамму ПИК35 SARS-CoV-2 не были обнаружены ни у одного из участников исследования.

Таблица 9 - Результаты определения антител к вирусу SARS-CoV-2 в различных тест-системах во 2 группе (негативная контрольная группа) во вторых образцах сыворотки крови

№ п/п	IgM					IgG				IgA	ВНА
	ИХЛА лот 1	ИХЛА лот2	ИХА	ИФА № 1	ИФА №3	ИХЛА лот 2	ИХА	ИФА №1	ИФА №2	ИФА №2	РН
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–	±	–	–	–
29	–	–	±	–	–	–	–	–	–	–	–
30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
32	–	–	–	±	–	–	–	–	–	–	–
32	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
33	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–

± – сомнительный результат;

+ – положительный результат;

Таблица 10 - Сравнение результатов определения антител к вирусу SARS-CoV-2 при исследовании второй сыворотки крови в различных тест-системах в группах 1 и 2 «Положительно» / «Сомнительно»

Класс Ig	Метод выявления	«Положительно» / «Сомнительно» n % (95%ДИ)	
		Группа 1	Группа 2
IgM	ИХЛА лот 1	20 60 (41–76)	0
	ИХЛА лот 2	1 3 (0–10)	0
	ИХА	17 51 (29–60)	1 3 (0–10)
	ИФА 1	10 30 (14–46)	2 6(6,0–16)
IgG	ИХЛА лот 2	0	0
	ИХА	0	0
	ИФА 1	4 12 (3–23)	3 9 (0–19)
	ИФА 2	1 3 (0–10)	0
IgA	ИФА 2	1 3 (0–10)	2 6 (0–15)

С целью уточнения фактических временных интервалов сероконверсии по IgG при определении в тестируемых системах ИХЛА было проведено динамическое обследование 33 пациентов с COVID-19 (Группа 3). В среднем, интервал между последним отрицательным и первым положительным результатом определения IgG составил 6 дней (Me 6,0 [5;7] дней). Антитела класса G были обнаружены во всех сыворотках пациентов данной группы на 14–19 день от начала заболевания.

Важным наблюдением данной части исследования является «персистенция» ложноположительных результатов при использовании тест-систем с разными антигенными мишенями. Так в тест-системе NovaTec (ИФА №1) в качестве антигена используется N-белок SARS-CoV-2, а в тест-системе Mindray (ИХЛА, Лот №1; Лот№2) используются рекомбинантные N и S-белки SARS-CoV-2 [146], в свою очередь в тест-системе Inzek (ИХА) конкретный антиген вовсе не указан в

инструкции производителя и в доступной литературе. Следовательно, необходимо учесть, что повторные ложноположительные результаты возможны при использовании тест-систем, основанных на одинаковых антигенах, и последовательное определение антител в других тест-системах без учета используемого антигена не всегда позволяет дать однозначный ответ [142].

Очевидным оптимальным вариантом служит исследование с помощью тест-системы, основанной на другом антигене, или определение ВНА, но такой подход значительно ограничен как необходимостью внедрения двух тест-систем в одном лечебно-профилактическом учреждении одновременно, так и ограниченной информированностью врачей-клиницистов о наличии и составе тест-систем, используемых в лабораториях. Определение же ВНА доступно лишь лабораториям, работающим с ПБА II группы, и не является широко распространенным методом.

В этом контексте парные сыворотки продемонстрировали свою высокую эффективность. Отсутствие сероконверсии по IgG в динамике, подтвержденное нашими данными в позитивной контрольной группе, где 96% пациентов имели определяемые IgG к 14-му дню, является простым и надежным способом дифференциальной диагностики. Это позволяет рекомендовать данный подход как практичный инструмент для верификации сомнительных случаев изолированного выявления IgM (Рисунок 7). Клиническое наблюдение из практики представлено в приложении А (Клиническое наблюдение №1).

Результаты, изложенные в данном разделе, нашли отражение в опубликованной статье и главе монографии [80, 142].

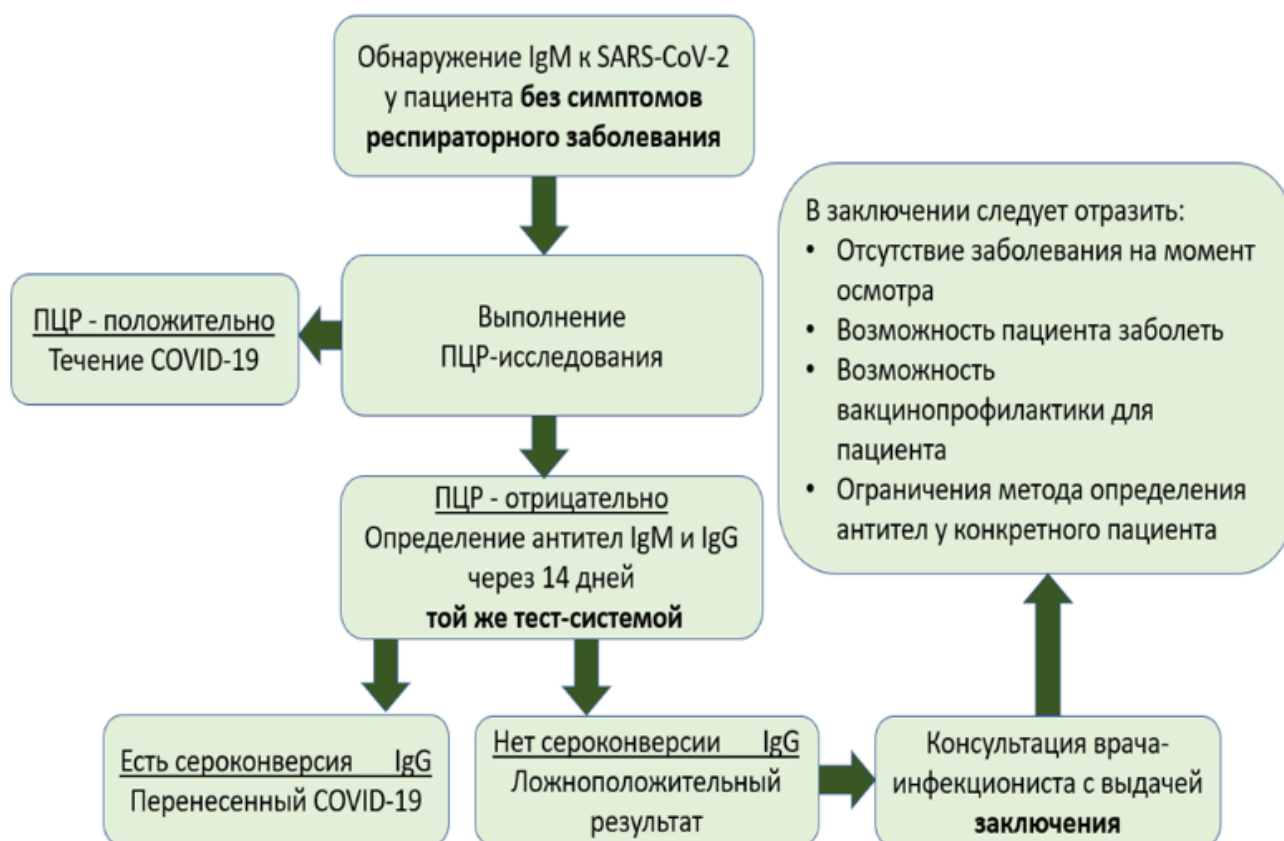


Рисунок 7 - Алгоритм действия при изолированном выявлении IgM к SARS-CoV-2

3.2 Выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 для оценки вируснейтрализующей активности сывороток

Дальнейшее исследование было направлено на изучение эволюции вируса SARS-CoV-2 и получение тест-штаммов для оценки спектра вируснейтрализующей активности сывороток людей, вакцинированных или переболевших COVID-19. Для этого с октября 2021 г. по октябрь 2025 г. собирали назофарингеальные мазки от пациентов, госпитализированных с положительным ПЦР-результатом выявления вируса SARS-CoV-2, в ММКЦ «Коммунарка» (2021-2023 гг.) и ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» (2024–2025 гг.). Всего было собрано 1105 проб. Сбор биологического материала осуществлялся в день поступления пациентов в стационар. Из 1105 проб назофарингеальных мазков было выделено 112 (10,1% ДИ (83–11,9) изолятов вируса SARS-CoV-2, для 54 из которых были получены нуклеотидные последовательности генома (ген S).

Данные о течении заболевания доступны только для пациентов ММКЦ «Коммунарка» за 2021–2023 гг. (Таблица 11). Назофарингеальные мазки, из

которых был выделен вирус, были собраны в среднем на третий день заболевания. Медиана возраста пациентов составила 64 года, с интерквартильным диапазоном от 53 до 69,5 лет. Большинство пациентов поступали в стационар с легкой степенью тяжести новой коронавирусной инфекции и были госпитализированы в связи с наличием сопутствующих соматических заболеваний. Серологическое исследование было проведено у 41 пациента, из которых 19 (46,3% (30–62,2)) были вакцинированными, а 22 (41% (27,3–54,9)) — невакцинированными. При сравнении уровней антител к вирусу SARS-CoV-2 не было выявлено статистически значимых различий в активности сывороток между вакцинированными и невакцинированными пациентами ($p = 0,375$, критерий U Манна-Уитни для независимых выборок). Высокие уровни IgG к вирусу SARS-CoV-2 (>100 AU/mL) отмечались у вакцинированных пациентов после векторной двухкомпонентной вакцины (Таблица 11).

Таким образом, вирус в основном выделяли от людей с лёгкой и средней степенью тяжести течения заболевания, независимо от вакцинации и наличия антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови.

Таблица 11 - Общая характеристика пациентов ММКЦ «Коммунарка», от которых выделены изоляты вируса SARS-CoV-2, в период с декабря 2021 по октябрь 2023 гг.

Параметр	Значение
Возраст, Ме [Q1; Q3], годы	64 [53;69,5]
День болезни по данным анамнеза, Ме [Q1; Q3], дни	3 [2;4]
Вакцинация, n % (95% ДИ)	41 43,6 (33–54,3)
Средняя степень тяжести, n % (95% ДИ)	25 26,6 (18,1–35,1)
Легкая степень тяжести, n % (95% ДИ)	69 73,4 (64,9–81,9)
Анализ на иммуноглобулины к SARS-CoV-2, n % (95% ДИ)	41 43,6 (34–54,3)
Антитела к SARS-CoV-2 у вакцинированных пациентов, Ме [Q1; Q3]	IgM 0,215 [0,155;0,367] IgG 34,02 [15,93;189,74]
Антитела к SARS-CoV-2 у невакцинированных пациентов, Ме [Q1; Q3]	IgM 0,41 [0,235;0,81,5] IgG 19,87 [5,275;72,40]

3.2.1 Распределение изолятов вируса SARS-CoV-2 по времени выделения и по кладам (генетическим линиям)

Из 112 положительных проб нуклеотидная последовательность гена S была получена для 54 изолятов. Эти последовательности были внесены в базу данных GISAID и проанализированы на веб-платформе Nextclade для отнесения к определённому варианту вируса. Анализ фрагмента нуклеотидной последовательности вируса SARS-CoV-2 позволил идентифицировать 9 различных линий: 17 образцов принадлежали к кладе B.1.617 (Дельта), 9 образцов - к кладе 22B (Омикрон), 1 образец - к кладе 22D (Омикрон), 3 образца - к кладе 22E (BQ.1), 9 образцов - к кладе 22F (XBB), 9 образцов - к кладе 23A (XBB.1.9), 4 образца - к кладе 23B (XBB.1.16), 1 образец - к кладе 23D (XBB) и 1 образец - к кладе 23F (EG.5.1) (Таблица 12).

В начале исследования наблюдалось преобладание варианта Дельта (B.1.617.2). 77,8% (57,1–94,7) случаев среднетяжелого течения заболевания среди пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 приходилось на период циркуляции данного варианта, в то время как в период циркуляции варианта Омикрон наблюдались более легкие формы заболевания, что согласуется с мировыми данными о снижении патогенности вируса SARS-CoV-2 [147]. Доля невакцинированных людей в данной части исследования составила 29% (13,5–44,4).

Таблица 12 - Распределение выделенных вирусных изолятов SARS-CoV-2 по генетическим линиям и периодам циркуляции

Группы штаммов (PANGO)	Клада (Nextstrain)	Количество выделенных изолятов, n	Период выявления
Дельта (B.1.617)	-	17	Ноябрь 2021 - Декабрь 2021
Омикрон BA.4/BA.5	22B	9	Июнь 2022 – Декабрь 2023
	22D	1	Август 2022
Омикрон BQ.1	22E	3	Декабрь 2022- Февраль 2023
Омикрон	22F	9	Январь 2023 – Март 2023
	23A	9	Март 2023 – Апрель 2023
	23B	4	Август 2023-Октябрь 2023
	23D	1	Февраль 2023
	23F	1	Сентябрь 2023
Всего		54	

С июня 2022 года подварианты Омикрон BA.2 и BA.5 (22B, 22D) стали доминирующими, вытеснив вариант Дельта. Доля невакцинированных пациентов в этот период составила 64% (38,5–87,5).

В январе 2023 года началась смена доминирующих подвариантов Омикрона: BQ.1 (доминировавший в конце 2022 года) стал вытесняться линиями семейства XBB.1.5 (клады 22F и 23A по системе Nextstrain), что соответствует общемировым данным [50]. В августе 2023 года продолжал циркулировать подвариант 23B (XBB.1.16), а в сентябре 2023 г. выявлен 23F (XBB.1.9.2 подвариант EG.5.1).

Из полученных в ходе исследования мазков ранее в культуре клеток Vero были закреплены штаммы 4724d (линия B.1.617.2, Дельта, GISAID EPI_ISL_8799478) и 7995o (линия BA.1, Омикрон, GISAID EPI_ISL_9613539). Для проведения оценки спектра вируснейтрализующей активности сывороток человека среди изолятов также были выбраны штаммы, относящиеся к подлиниям варианта Омикрон, выделенные в разное время: 10969 (XBB.1.5, 2023 г.), 12454 (JN.1, 2024 г.) и 12751 (LF.7.1.3, 2025 г.), как наиболее актуальные на момент проведения исследования. В целях стандартизации и оптимизации теста данные штаммы были размножены в клеточной линии Vero. Полученные тест-штаммы демонстрировали высокую способность к репродукции в клетках Vero, что проявлялось в виде устойчивых и четко различимых признаков ЦПД, и достигали титров не ниже $10^{5,0}$ ТЦД₅₀/мл, достаточных для проведения реакции нейтрализации. Полученные штаммы задепонированы в рабочую коллекцию ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Таким образом, получен и закреплен набор изолятов SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим линиям, для оценки спектров вируснейтрализующей активности сывороток [143].

3.3 Анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови к различным вариантам вируса SARS-CoV-2

3.3.1 Сравнительный анализ групп пациентов, разделенных по временным интервалам

Анализ сформированных групп показал, что группы, распределенные по временным периодам, были сопоставимы по гендеру, возрасту и по времени поступления в стационар. Пациенты, поступившие в стационар в период циркуляции варианта Дельта (июнь-декабрь 2021г), значительно чаще нуждались в госпитализации в ОРИТ по сравнению с пациентами, поступившими в стационар в 2020 году и в начале 2021 года ($p < 0,001$). В то же время пациенты из Группы 2 (циркуляция вариантов Альфа и Бета (B.1.1.7, B.1.351) SARS-CoV-2) дольше находились в отделениях ОРИТ ($p < 0,001$). При этом значимых различий в летальных исходах и в сопутствующих коморбидных состояниях между исследуемыми группами установлено не было ($p > 0,05$) (Таблица 13, Таблица 14).

Таблица 13 - Основные характеристики анализируемых групп 3 части исследования

Параметр	Группа 1 (2020) N=99	Группа 2 (I-V.2021) N=92	Группа 3 (VI–XI.2021) N=95	p
Возраст, лет Me [Q1; Q3]	64 [58;73]	66,5 [63;69]	69 [57;79]	0,161*
Мужчины, % (95%ДИ)	47,5 (37–57,1)	44 (34,2–55)	40 (30,2–49,4)	0,572**
День болезни на момент поступления по данным анамнеза, Me [Q1; Q3]	8 [5;10]	7 [4;10]	7 [4;11,5]	0,704*
День взятия крови от начала болезни, Me [Q1; Q3]	10 [6;14]	13 [8;17]	11,5 [6;21,5]	0,039*
Дни, проведенные в стационаре Me [Q1; Q3]	8 [5;13]	8,5 [5;16,76]	8 [5;17]	0,846*
Кол-во человек, поступивших в ОРИТ, % (95% ДИ)	24,2 (4,2–33)	29,3 (20,4–39,6)	44,2 (34,2–54,8)	0,009**
Дни, проведенные в ОРИТ Me [Q1; Q3]	6 [3;11,5]	12 [4;18]	2 [1;13]	0,001*
Летальные исходы, % (95ДИ)	7,1 (2,3–12,6)	14,1 (7,4–21,9)	17,9 (10,5–25,9)	0,074**

* Н-Критерий Краскела-Уоллиса; ** χ^2 .

Таблица 14 - Сопутствующие коморбидные состояния групп пациентов, разделенных по временным интервалам

Параметр	Группа 1 (2020) n=99	Группа 2 (I-V.2021) n=92	Группа 3 (VI–XI.2021) n=95	p (χ^2)
Артериальная гипертензия, % (95ДИ)	51,5 (41,8–61,3)	64,1 (54,3–73,7)	70,5 (61,9–80)	0,051
Эндокринные заболевания, % (95ДИ)	24,2 (16,2–33)	25 (16,3–34,2)	30,5 (21,2–40)	0,562
Ожирение, % (95ДИ)	6,1 (1,9–11,3)	10,9 (4,9–17,6)	10,5 (4,5–17,5)	0,43
Нарушение ритма сердца, % (95ДИ)	18,2 (11–25,7)	13 (6,1–20,4)	15,8 (9–23,6)	0,622
Ревматологические заболевания, % (95ДИ)	0	4,3 (1–9)	2,1 (0–5,3)	0,111*
Хронические заболевания легких, % (95ДИ)	9,1 (4,1–14,7)	7,6 (2,5–13)	5,3 (1,1–10,1)	0,589
Хронические заболевания почек, % (95ДИ)	9,1 (4,1–14,7)	20,7 (12,6–29,3)	24,2 (16,5–33,7)	0,16
Онкологические заболевания в анамнезе, % (95ДИ)	7,1 (2,2–12,8)	10,9 (4,7–17,7)	14,7 (7,6–22,4)	0,229

*тест Фишера-Фримена-Холтона

3.3.2 Оценка вируснейтрализующей способности сывороток крови пациентов, госпитализированных в различные периоды пандемии к вариантам вируса SARS-CoV-2

В сыворотках крови всех исследуемых групп, перенесших инфекцию в 2020-2021 гг., были выявлены антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью в отношении вариантов, циркулировавших в период заболевания и ранее (B.1.1, Дельта), а также к вариантам, циркулировавшим позднее – в 2022-2025 гг: к подварианту Омикрона BA.1 (223 сыворотки из 286 проанализированных), к линии ХВВ.1.9. (2023 год) (73 из 286), к изоляту 12454 (2024 год) (всего у 90 из 175) и к изоляту 12751 (2025 год) (всего у 95 из 175). При этом установлено что количество сывороток с ВНА против поздних линий SARS-CoV-2 (ХВВ.1.9), а также против актуальных изолятов 12454 и 12751 значительно выше среди пациентов, перенесших инфекцию в период циркуляции варианта Дельта, чем у пациентов, переболевших в период циркуляции прототипных вариантов (B.1.1.,

В.1.1.7 и В.1.351) ($p < 0,05$, Таблица 15).

Титры ВНА, определенные в сыворотках пациентов, заболевших в период циркуляции соответствующих вирусов, были ожидаемо выше по сравнению с титрами к остальным исследованным вирусам (Таблица 15). Тем не менее, средние титры ВНА к штамму Дельта были значимо выше у пациентов, перенесших инфекцию в период доминирования этого варианта, по сравнению с переболевшими в эпоху циркуляции ранних вариантов SARS-CoV-2 (СГТ $9,90 \pm 1,66$, $p < 0,001$). Это частично объясняет выявленный выше факт того, что большее количество сывороток пациентов, переболевших в период циркуляции варианта Дельта, обладали нейтрализующей активностью против подвариантов Омикрон, циркулировавших в 2023-2025 гг. (ХВВ.1.9 (2023 г.), а также против изолятов 12454 (2024 г.) и 12751 (2025 г.))

Также титры ВНА к циркулировавшему на момент заболевания варианту были статистически значимо выше по сравнению с титрами к варианту Омикрон и его подвариантам ($p < 0,05$).

Таблица 15 - Сравнение вируснейтрализующей активности сывороток крови в зависимости от периода заболевания и варианта вируса SARS-CoV-2

Параметр		Группа по времени госпитализации						p	
		Группа 1 (2020)		Группа 2 (I-V.2021)		Группа 3 (VI–XII.2021)		Критерий Краскела- Уоллиса (для СГТ)	χ2 (абс знач.)
Вариант SARS-CoV-2		Прототипные линии (В.1.1)		Варианты Альфа и Бета		Вариант Дельта			
		СГТ*, log2	+ сыв-ки, п/всего	СГТ, log2	+ сыв-ки, п/всего	СГТ, log2	сыв-ки, п/всего		
В.1.1, шт. ПИК-35 (2020 г.)		5,50 ± 3,45	82/99	5,90 ± 3,30	77/92	7,60 ± 2,70	92/95	0,000	0,01
Дельта шт. 4724d (2021 г.)		4,80 ± 3,24	77/99	4,55 ± 3,34	66/92	9,90 ± 1,66	95/95	0,000	0,001
Омикрон	шт. 8995o (BA.1 ,2022 г.)	2,60 ± 2,36	62/99	3,80 ± 2,84	68/92	8,00 ± 2, 78	93/95	0,000	0,001
	шт.10969 (ХВВ.1.5,2023 г.)	0,34 ± 1,05	10/99	0,58 ± 1,34	15/92	2,25 ± 2,53	48/95	0,001	0,001
	шт. 12454 (JN.1,2024 г.)	0,60 ±1,59	5/36	1,30 ±1,87	17/50	3,35 ± 2,30	68/89	0,001	0,001
	шт.12751 (LF.7.1.3,2025 г.)	0,92 ± 1,78	8/36	1,60 ± 2,13	19/50	3,63 ± 2,34	68/89	0,001	0,001

*СГТ- средний геометрический титр;

Таким образом, анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови от пациентов, госпитализированных в разные периоды пандемии (2020–2021 гг.), выявил фундаментальную закономерность: иммунный ответ, индуцированный ранними вариантами, обладает ограниченной, но не нулевой, перекрестной защитой против антигенно отдаленных штаммов.

Анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови пациентов, сгруппированных по возрастным категориям, демонстрирует сходную динамику в спектре вируснейтрализующей активности. Сыворотки более эффективно нейтрализуют вирус, циркулировавший в период заболевания; при этом титры ВНА значимо выше у пациентов, перенесших инфекцию в период циркуляции варианта Дельта, что позволяет этим сывороткам более эффективно нейтрализовать подварианты Омикрона (ХВВ.1.9, 12454 и 12751) (Рисунок 8).

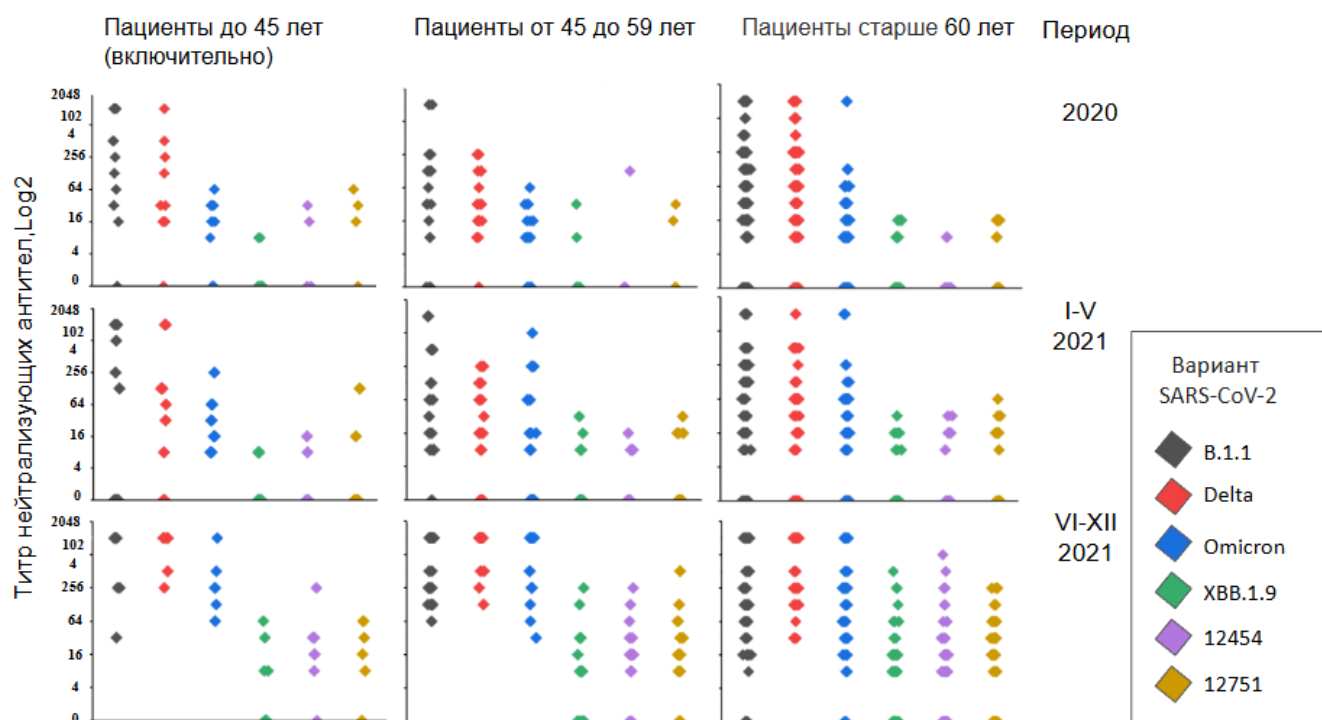


Рисунок 8 - Уровни вируснейтрализующих антител к разным вариантам SARS-CoV-2 в сыворотках пациентов, разделённых на группы по возрасту и периоду заболевания

При сравнении пациентов в группах по возрастам и наличию ВНА в сыворотке крови статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$, χ^2).

Также не было обнаружено достоверных различий в уровнях данных антител между группами ($p > 0,05$, Н-критерий Краскела-Уоллиса) (Таблица 16).

Несмотря на то, что уровни антител к вирусу SARS-CoV-2 не снижались в зависимости от возраста, у пациентов старше 60 лет чаще регистрировали тяжелые формы COVID-19 (Таблица 17, $p = 0,001$), что может быть связано не только с гуморальным иммунитетом, но и с другими факторами, такими как цитокиновый профиль, сопутствующие заболевания и генетические особенности пациента, которые не оценивались в данном исследовании [148-150].

Таблица 16 - Сравнение вируснейтрализующей активности сывороток в зависимости от возраста пациентов

Параметр		Пациенты до 45 лет (включительно)		Пациенты от 45 до 60 лет		Пациенты старше 60 лет		p	
Вариант SARS-CoV-2		СГТ, log2	сыв-ки, п/всего	СГТ, log2	сыв-ки, п/всего	СГТ, log2	сыв-ки п/всего	Критерий Краскела Уоллиса (для СГТ)	χ^2 (абс знач.)
В.1.1, шт. ПИК-35 (2020 г.)		6,89 ± 4,2	22/28	6,67 ± 3,04	53/57	6,16 ± 3,23	176/201	0,229	0,161
Дельта шт. 4724d (2021 г.)		6,64 ± 3,78	24/28	6,25 ± 3,57	50/57	6,44 ± 3,84	166/201	0,822	0,625
Омикрон	шт. 8995o (BA.1 ,2022 г.)	5,25 ± 2,5	26/28	5,23 ± 3,9	45/57	4,62 ± 3,56	152/201	0,380	0,117
	шт.10969 (XBB.1.5,2023 г.)	1,04 ± 1,77	8/28	1,23 ± 2,07	17/57	1,0 ± 1,94	48/201	0,701	0,920
	шт. 12454 (JN.1,2024 г.)	1,98 ± 2,38	10/22	2,59 ± 2,31	21/34	2,13 ± 2,39	59/119	0,541	0,493
	шт.12751 (LF.7.1.3,2025 г.)	2,39 ± 2,58	11/22	2,81 ± 2,25	21/34	2,4 ± 2,46	63/119	0,750	0,571

Таблица 17 - Сравнение активности специфических иммуноглобулинов к вирусу SARS-COV-2 в зависимости от возраста и тяжести течения COVID-19

Параметр	Группа до 45 лет n=28	От 45 до 59 лет n=57	Старше 60 лет n=201	P*
Летальные исходы, % (95%ДИ)	1 3,6(0-11,8)	4 7(1,6–13,8)	32 15,9(11,2–21,3)	**
Тяжелая степень, % (95%ДИ)	6 21.4(6.5-37)	22 38,6(26-52,5)	110 54,7(48,-61,1)	0,001
IgG к SARS-CoV-2, [Q1; Q3]	130[62;414]	154[45;360]	209[45;385]	0,841

*– U критерий Манна-Уитни для количественных показателей; χ^2 - для номинальных значений;

** – статистическое сравнение невозможно

3.3.3 Соотношение между титрами вируснейтрализующих антител и IgG к вирусу SARS-CoV-2

В исследованиях начала пандемии установлена корреляция между титром ВНА и уровнем IgG, определяемых методами ИФА и иммунохемилюминесценции в тест-системах на основе RBD S-белка SARS-CoV-2 [151, 152]. Согласно клиническим рекомендациям, подтверждение диагноза и отбор доноров антиковидной плазмы проводятся с использованием любой зарегистрированной количественной тест-системы для IgG к SARS-CoV-2 независимо от типа иммуносорбента (S, RBD, N) [105]. В стационарах Москвы и Московской области наиболее часто применяется система SARS-CoV-2 IgG (Mindray). Однако смена циркулирующих вариантов вируса может влиять на корреляцию между ВНА и уровнем антител, особенно при использовании тест-систем на основе устаревших антигенов или в связи с изменением спектра индуцируемых функционально активных ВНА.

В данной части исследования был проведен анализ возможной корреляции между уровнем IgG при инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, определенным в клиническом стационаре с использованием тест-системы ИХЛА (Shenzhen Mindray), и титром ВНА к циркулировавшему на момент заболевания вирусу. Сыворотки крови от пациентов, заболевших в 2020 году, продемонстрировали среднюю положительную корреляцию между уровнем IgG и титром ВНА к прототипному штамму ПИК35 линии B.1.1, что подтверждается коэффициентом Спирмена, равным 0,624. Аналогично, сыворотки пациентов, заболевших в 2021 году во время циркуляции варианта Дельта, также показали среднюю положительную корреляцию между уровнем IgG и титром ВНА к штамму 4724d варианта Дельта, однако с меньшим значением коэффициента корреляции Спирмена ($R = 0,523$) (Рисунок 9). Эта величина коэффициента корреляции была существенно ниже значений, представленных в других исследованиях ($R = 0,768$) [82-85].

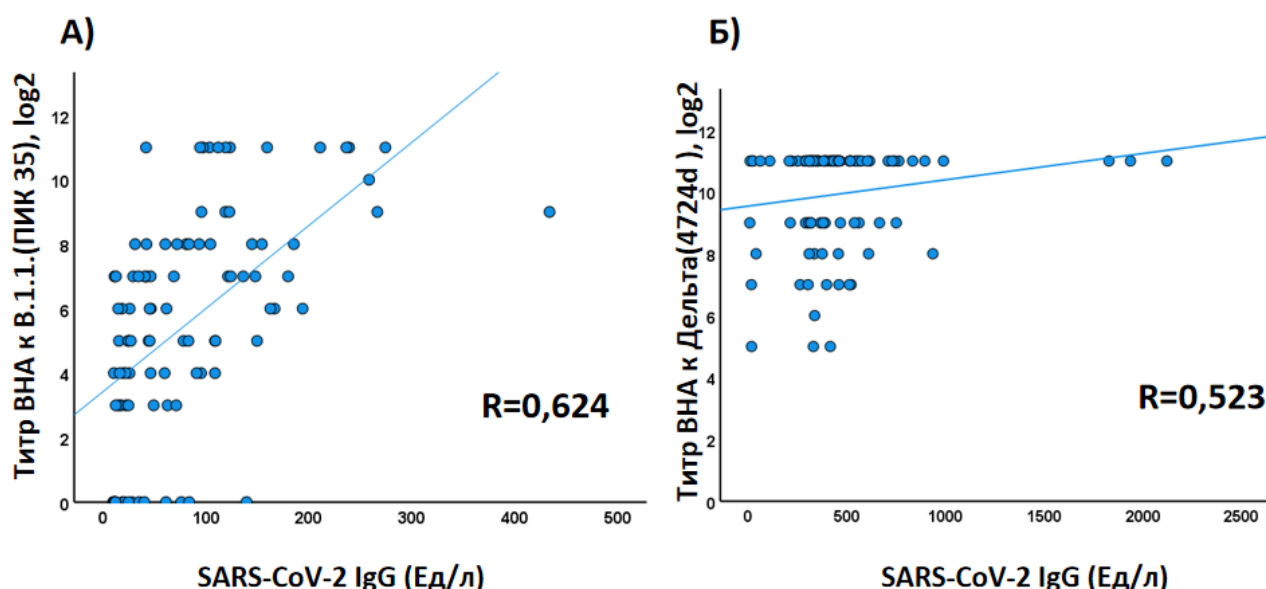


Рисунок 9 - А) Корреляция между уровнями IgG (ИХЛА, Shenzhen Mindray) к вирусу SARS-CoV-2 и уровнями вируснейтрализующих антител (ВНА) к штамму циркулирующего подварианта вируса В.1.1 (шт. ПИК35) в 2020 г. Б) Корреляция между уровнями IgG к вирусу SARS-CoV-2 (ИХЛА, Shenzhen Mindray) и уровнями вируснейтрализующих антител (ВНА) к штамму циркулирующего варианта Дельта (шт. 4724d) в 2021 г.

Ввиду ограничений, связанных с исследованием ВНА, для точной оценки корреляционных взаимосвязей была сформирована скорректированная группа путем исключения образцов с $\text{Log}_2 \geq 11$ и $\text{Log}_2 = 0$.

В сыворотках 2020 г. выявлена более низкая корреляция между уровнем IgG и титром ВНА к прототипному штамму ПИК35 линии В.1.1 по сравнению с нескорректированной группой того же периода (R Спирмена = 0,484). В то же время в сыворотках пациентов, заболевших в 2021 г. в период циркуляции варианта Дельта, наблюдалась средне-положительная корреляция между уровнем IgG и титром ВНА к штамму 4724d ($R = 0,629$). Данный показатель оказался выше, чем в нескорректированной выборке. (Рисунок 10).

Сыворотки с уровнями IgG, составляющими 10–150 Ед/л в 2020 году и 10–500 Ед/л в 2021 году, могли не содержать детектируемых ВНА (титр <1:8). С другой стороны, некоторые сыворотки от переболевших пациентов в 2021 году с титром ВНА, превышающим 1:32, давали негативные результаты по данным ИХЛА, в то время как аналогичная ситуация для сывороток пациентов 2020 года не наблюдалась.

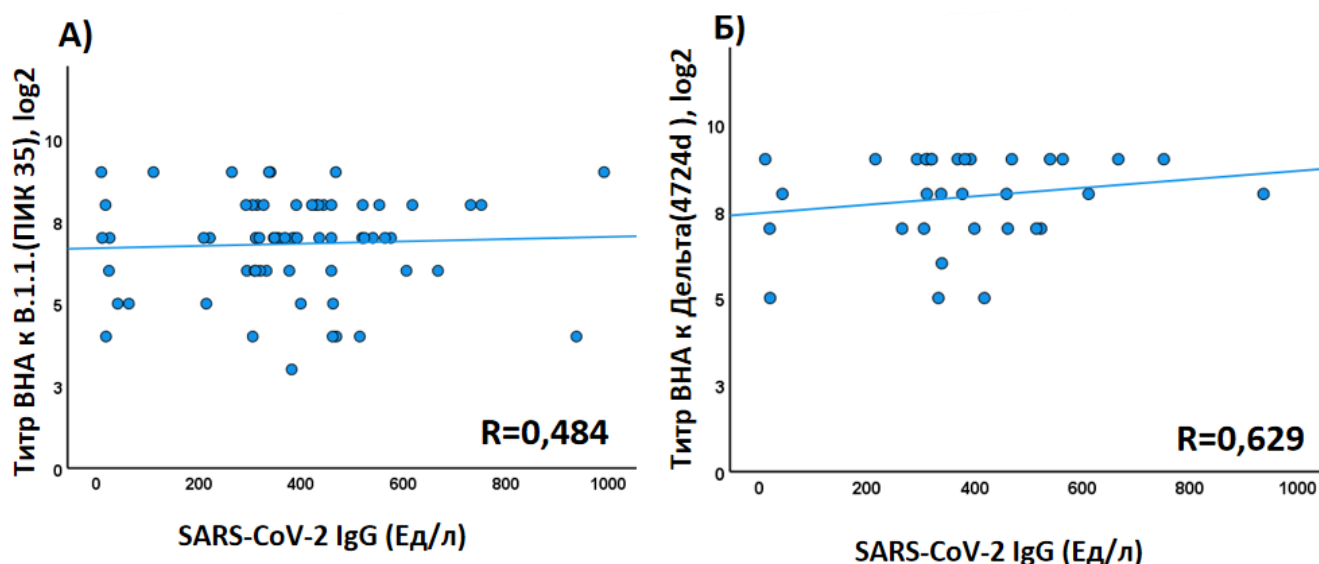


Рисунок 10 - А) Корреляция в скорректированной группе между уровнями IgG (ИХЛА, Shenzhen Mindray) к вирусу SARS-CoV-2 и уровнями вируснейтрализующих антител (ВНА) штамму циркулирующего варианта вируса B.1.1 (шт. ПИК35) в 2020 г.; Б) Корреляция в скорректированной группе между уровнями IgG к вирусу SARS-CoV-2 (ИХЛА, Shenzhen Mindray) и уровнями вируснейтрализующих антител (ВНА) к штамму циркулирующего варианта Дельта (шт. 4724d) в 2021 г.

Таким образом, выявленная корреляция для обоих исследуемых периодов остается на невысоком уровне. Данный феномен можно объяснить как наличием в сыворотках значительной доли ненейтрализующих антител к разным доменам S-белка, так и антигенным несоответствием между рекомбинантным белком в ИХЛА тест-системе и нативным S-белком циркулирующих вариантов. Независимо от причин, данный факт имеет практическое значение, указывая на то, что наличие высокого уровня IgG не может служить надежным маркером защищенности человека от инфицирования новыми вариантами, что затрудняет оценку популяционного иммунитета и требует пересмотра подходов к серологическому мониторингу.

3.3.4 Сравнительный анализ тяжести заболевания и титров вируснейтрализующих антител в различные периоды пандемии

Продолжающаяся циркуляция вируса SARS-CoV-2 и возникновение его новых вариантов способных ускользать от иммунного ответа, подчеркивают необходимость исследования факторов, оказывающих влияние на тяжесть течения

COVID-19 в зависимости от циркулирующего варианта SARS-CoV-2. Таким образом, обновление и верификация прогностических критериев тяжелого течения COVID-19 является необходимым условием для оптимизации лечебно-диагностических алгоритмов и профилактических мероприятий.

В связи с этим группы, сформированные по периодам, были дополнительно разделены на подгруппы в зависимости от степени тяжести заболевания COVID-19: пациенты со средней степенью тяжести и пациенты с тяжелой формой заболевания (Таблица 18). Группы госпитализированных пациентов с тяжелой степенью заболевания на протяжении всех анализируемых периодов демонстрировали значимо более продолжительный срок госпитализации по сравнению с пациентами, имеющими среднюю степень тяжести. Анализ возрастной структуры подгрупп, сформированных с учетом тяжести заболевания и периода циркуляции вируса (прототипные линии, варианты Альфа и Бета), не выявил статистически значимых различий. В период циркуляции варианта Дельта среди пациентов с тяжелым течением COVID-19 преобладали лица более старшего возраста: медианный возраст составил 72 [65;81] года, а в группе пациентов со среднетяжелым течением заболевания он был значительно ниже — 64,5 [51,3;76,8] года (Таблица 18).

Таблица 18 - Сравнение продолжительности госпитализации, возраста и сроков заболевания у пациентов с COVID-19 в зависимости от доминирующего варианта вируса SARS-CoV-2 и степени тяжести

	2020, n = 99 Прототипные линии (B.1.1)			2021 (I-V.2021), n = 92 Варианты Альфа и Бета			2021 (VI–XII.2021), n = 95 Вариант Дельта		
	T/T 44	C/T 55	p*	T/T 43	C/T 49	p*	T/T 51	C/T 44	p*
к/д, Me [Q1; Q3]	13 [8;19,8]	7 [5;10]	0,000	14 [7;21]	6 [5;10,5]	0,000	10,5 [6,8;17,8]	7 [5;12,3]	0,044
Возраст, лет Me [Q1; Q3]	66,5 [61; 78]	63 [6;13]	0,069	68 [61;80]	66 [53,5;71]	0,128	72 [65;81]	64,5 [51,3;76,8]	0,002
День болезни по данным анамнеза Me [Q1; Q3]	11 [7,3;16]	9 [6;13]	0,068	13 [9,25;19]	13 [8;15]	0,265	13 [7;24]	5,5 [3,8;11,5]	0,086

* Н-Критерий Краскала-Уоллиса

C/T – средняя степень тяжести; T/T – тяжелая степень тяжести

Титры ВНА к разным вариантам SARS-CoV-2 достигали сходных уровней в группе пациентов с тяжелым течением заболевания и в группе пациентов со средней степенью тяжести. Исключение составил период начала пандемии новой коронавирусной инфекции, когда титры ВНА у пациентов с тяжелым течением были статистически достоверно выше, чем у пациентов со среднетяжелым течением (Таблица 19, $p=0,009-0,01$). Это наблюдение согласуется с данными исследований, направленными на выявление взаимосвязи между уровнем вируснейтрализующих антител и тяжестью клинического состояния пациентов [82-85]. Этот факт можно было бы объяснить тем, что в 2020 году тяжелое течение было связано в первую очередь с вирус-индуцированным поражением легких (вирусная пневмония).

В последующие периоды пандемии, особенно с приходом варианта Дельта и Омикрона, тяжелое течение чаще было связано с дисрегуляцией иммунного ответа (цитокиновый шторм) и тромботическими осложнениями, развивающимися позже, на фоне уже начавшейся сероконверсии. В этом контексте титр ВНА отражает лишь гуморальный ответ, но не степень гиперактивации макрофагов или коагулопатии, которые стали главными причинами летальности [83-85].

Аналогично, для периода циркуляции прототипных линий медиана уровня IgG к вирусу SARS-CoV-2 составила 60,66 [24,77;118,86] Ед/л в то время, как для периода циркуляции вариантов Альфа и Бета - 176,57 [70,38;335,12] Ед/л, а для периода варианта Дельта – 390,37 [311,91;519,99] Ед/л (Таблица 19). При этом, для периода циркуляции прототипных вариантов вируса уровни IgG у пациентов с тяжелым течением были статистически достоверно выше, чем у пациентов со среднетяжелым течением (Таблица 20, $p=0,007$).

Таблица 19 - Сравнение вируснейтрализующей активности сывороток в зависимости от времени заболевания и тяжести течения COVID-19

	2020 n = 99 Прототипные линии (B.1.1)			I-V.2021 n = 92 Варианты Альфа и Бета			VI–XII.2021 n = 95 Вариант Дельта		
	T/T	C/T	p*	T/T	C/T	p*	T/T	C/T	p*
ВНА к B.1.1 СГТ, M±SD, log ₂	7±3,18	5±3,42	0,01	6±3,03	7±3,56	0,93	7±2,92	8±2,39	0,136
ВНА к B.1.1 n, % (95%ДИ)	41 93,2 (84,9–100)	40 72,7 (60,4–84,6)	0,009	39 90,7 (81,3–98)	40 81,6 (70,2–92,7)	0,213	47 92,2 (84,3–98,3)	44 100	0,121
ВНА к Дельта СГТ, M±SD, log ₂	6±3,12	4±3,18	0,02	5±3,03	5±3,62	0,915	11±1,83	11±1,41	0,307
ВНА к Дельта n, %(95%ДИ)	38 86,4 (75,5–95,7)	39 70,9 (58,3–82,7)	0,066	33 76,7 (63–89,1)	35 71,4 (57,4–83,3)	0,562	51 100	44 100	**
ВНА к Омикрон СГТ, M±SD, log ₂	3±2,74	3±2,02	0,532	3±2,43	4±3,14	0,324	8±3,07	9±2,33	0,169
ВНА к Омикрон n, %(95%ДИ)	27 61,4 (46,7–74,7)	34 61,8 (48,7–74,5)	0,963	32 74,4 (60–87,2)	38 77,6 (64,4–88,9)	0,725	48 94,1 (86,7–100)	44 100	0,246
ВНА к ХВВ1.9, СГТ, M±SD, log ₂	0,48±1,25	0,24±0,86	0,290	0,58±1,37	0,57±1,34	0,990	2,14±2,52	2,14±2,52	0,692
ВНА к ХВВ1.9 n, %(95%ДИ)	5 11,4 (2,7–21,7)	5 9,1 (1,9–17,1)	0,709	4 9,3 (2,2–18,2)	10 20,4 (9,5–32,7)	0,139	26 51 (37,7–64,3)	23 52,3 (36,4–67,5)	0,900
ВНА к 12454 СГТ, M±SD, log ₂	0,79±1,88	0,42±1,31	0,707	1,52±2,04	1,14±1,76	0,477	3,32±2,08	3,32±2,08	0,855
ВНА к 12454 n, %(95%ДИ)	3 6,8 (0–15,2)	2 3,6 (0–10)	**	8 18,6 (7,1–30,6)	9 18,4 (8,2–29,6)	0,977	36 70,6 (58,5–82,4)	32 72,7 (57,9–85,4)	0,818
ВНА к 12751 СГТ, M±SD, log ₂	1,03±2,0	0,82±1,64	0,876	2,17±2,41	1,19±1,83	0,095	3,82±2,11	3,8±2,11	0,515
ВНА к 12751 n, %(95%ДИ)	4 9,1 (2,1–18,9)	4 7,3 (1,7–15,3)	**	10 23,3 (10,3–36,4)	9 18,4 (7,7–30)	0,563	37 72,5 (60,4–83,7)	31 70,5 (57,1–83,9)	0,821

* – U критерий Манна-Уитни для количественных показателей; χ^2 - для номинальных значений;

** – статистическое сравнение невозможно;

T/T – тяжелая степень тяжести; C/T – средняя степень тяжести.

Таблица 20 - Сравнение активности специфических иммуноглобулинов к SARS-COV-2 в зависимости от времени заболевания и тяжести течения COVID-19

	2020 n = 99 Прототипные линии (B.1.1)			I-V.2021 n = 92 Варианты Альфа и Бета			VI–XII.2021 n = 95 Вариант Дельта		
	T/T n=44	C/T n=55	p *	T/T n=43	C/T n=49	p*	T/T n=51	C/T n=44	p*
Ig G к SARS- COV-2	88,6 [42,5; 143,5]	40,5 [19; 95,5]	0,007	176,4 [78,1; 312,1]	176,7 [56,3; 377,5]	0,972	417,7 [326,7; 523,1]	357,8 [292,8; 517,8]	0,126

* U критерий Манна-Уитни; C/T – средняя степень тяжести; T/T – тяжелая степень тяжести.

Таким образом, в условиях стационарного лечения была выявлена статистически значимая разница в уровнях специфических иммуноглобулинов класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 (ИХЛА) у пациентов со среднетяжелой и тяжелой формами COVID-19 в начале пандемии, что согласуется с опубликованными ранее данными [153]. Однако, в последующие временные промежутки, данная закономерность не наблюдалась (Таблица 20). Также стоит отметить, что в большинстве исследований сравниваются группы амбулаторных пациентов и стационарных [82-85], в то время как наше исследование сосредоточено на пациентах, находящихся на госпитализации со средней и тяжелой формой заболевания.

Также в начале пандемии высокий уровень специфических антител рассматривался как прогностический маркер тяжелого течения новой коронавирусной инфекции [95], однако по результатам нашего исследования, проведенного на госпитализированных пациентах, данная закономерность имела место только в период циркуляции прототипных линий (2020 г.). Важно учитывать, что, хотя высокие уровни IgG к SARS-CoV-2, определяемые методом ИХЛА, могут быть связаны с тяжелым течением заболевания, это не означает причинно-следственной связи. Время и характер иммунного ответа могут играть решающую роль в определении исходов заболевания, что требует дальнейшего изучения этих процессов для выяснения их прогностической значимости. Наблюдения из клинической практики приведены в приложении А (Клиническое наблюдение №2 и №3).

Результаты, изложенные в третьей части настоящего исследования, были представлены в опубликованных статьях и в главе монографии [79, 80, 143].

3.4 Исследование прогностической значимости лейкоцитарных индексов и биохимических показателей сыворотки крови для оценки риска тяжелого течения COVID-19 в различные периоды пандемии

Данная часть работы была посвящена поиску и валидации надежных прогностических маркеров. Разработка таких инструментов является важным для

оптимизации сортировки пациентов и выбора терапевтической тактики. Со временем прогностические шкалы и маркеры могут терять свою значимость по мере смены доминирующего варианта и требуют постоянного обновления. Проблемы валидации также проявляются в отсутствии стандартизированных пороговых значений для прогностических маркеров и значительной вариабельности референсных показателей, зависящих от используемых диагностических реагентов и оборудования лабораторий. Эти методологические недостатки существенно затрудняют сравнительный анализ исследований и разработку унифицированных алгоритмов прогнозирования.

Анализ лейкоцитарных индексов показал, что индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам (ИСНЛ), был значимо выше у пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, на протяжении 2020-2021 гг., в то время как другие лейкоцитарные индексы (соотношения нейтрофилов к моноцитам (ИСНМ), индекс соотношения тромбоцитов к лимфоцитам (ИСТЛ) и индекс соотношения лимфоцитов к моноцитам (ИСЛМ)) статистически не различались между группами (Таблица 21).

Таблица 21 - Сравнение лейкоцитарных индексов в зависимости от времени заболевания и тяжести течения COVID-19

Параметр	2020 Прототипные линии (В.1.1), n = 99			I-V.2021 Варианты Альфа и Бета, n = 92			VI–XII.2021 Вариант Дельта, n = 95		
	Тяж. n=44	Среднетяж. n=55	p*	Тяж. n=43	Среднетяж. n=49	p*	Тяж. n=51	Среднетяж. n=44	p*
ИСНЛ Me[Q1; Q3]	5,9 [3,5;10,2]	3,4 [2,6; 6,4]	0,047	6,8 [3,9;11,3]	3,8 [2,4;8,9]	0,023	8,1 [4,2;16,2]	5,2 [3,2;9,9]	0,024
ИСНМ Me[Q1; Q3]	13,4 [7,5;22,1]	9 [6,4;3,1]	0,029	10,08 [6,4;21,6]	9,4 [6,1;23,1]	0,719	12,33 [8,8;16]	11 [7;14,7]	0,2
ИСТЛ Me[Q1; Q3]	16,5 [10,7;28]	10,5 [7,4;17,8]	0,046	18 [10,1;30,5]	10,7 [6,17;32,1]	0,028	21 [10,4;42]	17 [9,1;29,5]	0,151
ИСЛМ Me[Q1; Q3]	2,3 [1,9;3,5]	2,37 [1,8;3,4]	0,356	2 [1,1;2,7]	2,6 [1,5;3,8]	0,03	1,5 [0,8;2,5]	1,8 [1,4;2,5]	0,094

* U критерий Манна-Уитни для количественных показателей;

Повышенные уровни ряда биохимических маркеров также ассоциировались с риском развития тяжелых форм новой коронавирусной инфекции [25-27, 86, 120]. Однако, стабильно на протяжении всех периодов пандемии, прогностически

значимыми лабораторными показателями, выявленными в результате анализа лабораторных показателей крови госпитализированных пациентов, стали ЛДГ, D-димер и С-реактивный белок (Таблица 22).

Таблица 22 - Сравнение биохимических показателей крови в зависимости от времени заболевания и тяжести течения COVID-19

Параметр	2020, n = 99 Прототипные линии			I-V.2021, n = 92 Варианты Альфа и Бета			VI–XII.2021, n = 95 Вариант Дельта		
	Тяж. n=44	Среднетяж. n=55	p*	Тяж n=43	Среднетяж. n=49	p*	Тяж n=44	Среднетяж. n=51	p*
ЛДГ Ме [Q1; Q3]	468 [323;696]	367 [261;540]	0,041	421 [311;585]	311 [244;378]	0,004	421 [311;585]	294 [233;428]	0,001
Ферритин Ме [Q1; Q3]	532 [280;886]	502 [291;730]	0,92	358 [196;627]	257 [199;503]	0,342	358 [196;627]	500 [225;831]	0,695
Фибриноген Ме [Q1; Q3]	5,7 [4,3; 7,9]	5,5 [4,6; 6,7]	0,248	6,3 [4,6; 6,9]	5,02 [4,6; 6,8]	0,451	6,35 [4,6; 6,9]	5,5 [4,1;6,2]	0,991
Д-Димер Ме [Q1; Q3]	755 [363;2194]	255 [170;463]	0,009	912 [516;3714]	450 [294;1237]	0,042	912 [516;3714]	905 [560;1701]	0,001
СРБ Ме [Q1; Q3]	98 [48;154]	66 [21;119]	0,015	86 [35;132]	42 [13;85]	0,005	86 [35;132]	37 [14;99]	0,026

* U критерий Манна-Уитни.

3.5 Определение значимости общей лактатдегидрогеназы и ее изотипов в прогнозировании неблагоприятного течения COVID-19

Для оценки прогностической значимости активности общей ЛДГ в предсказании неблагоприятного течения COVID-19, согласно критериям включения и исключения, были проанализированы данные 461 истории болезни пациентов с COVID-19 из неренимационных отделений (сентябрь 2021 г.)

В основной группе участников с ЛДГ ≥ 372 Ед/л (N=155) распределение по гендеру было равномерным. Напротив, в контрольной группе 1 с ЛДГ < 372 Ед/л (N=306) было обнаружено значительное преобладание женщин ($p < 0,01$, χ^2). Контрольная Группа 2 (n=28) изначально формировалась из здоровых доноров крови с учетом равного соотношения полов, медианный возраст этой группы составил 24,5 [18,2;30,7] года. При сравнении основной группы и контрольной группы 1 по возрасту установлено, что в основной группе медиана возраста была значимо выше: 65 [52; 75] лет против 57 [38;69] лет, ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни). Медиана дня болезни на момент поступления в стационар для обеих групп составила 6 [4;8] дней. Основная Группа и контрольная Группа 1 также были

сопоставимы по дню болезни, когда выполнялся анализ крови: 9 [7;11] дней и 10 [7;12] ($p = 0,168$, U-критерий Манна-Уитни) (Таблица 23).

Таблица 23 - Состав и основные характеристики групп 4 части исследования

Параметр	Основная группа (ЛДГ >372)	Контрольная группа 1 (ЛДГ <372.0)	Контрольная группа 2
Мужчины, % (95%ДИ)	72 (46,4)	96 (31,3)	14 (50)
Возраст, лет Ме [Q1; Q3]	65 [52;75]	57 [38;69]	24,5 [18,2;30,7]
День болезни, на который выполнено исследование	9 [7;11]	10 [7;12]	*
День болезни на момент поступления в стационар по данным анамнеза	6 [4;8]	6 [4;8]	*
Активность ЛДГ Ме [Q1; Q3], Ед/л	421[391;486]	272,7 [221;309]	177,7 [168;208]
Койко-день в стационаре, дней Ме [Q1; Q3]	13 [10;19]	7 [6;10]	*
Кол-во человек, поступивших в ОРИТ, n, % (95%ДИ)	45 29 (22,4–36,9)	5 1,6 (0,3–3,1)	*
Дни в ОРИТ Ме [Q1; Q3], дней	7 [3;16]	1 [1;3]	*
Смерть, n, % (95%ДИ)	25 16,1(10,5–22,5)	0	*

* показатель не применим для данной группы (здоровые доноры крови)

3.5.1 Течение болезни и активность общей лактатдегидрогеназы

При сравнении групп по продолжительности госпитализации, выявлено, что пациенты из основной группы (≥ 372 Ед/л) находились в стационаре значительно дольше, чем пациенты из контрольной группы 1 (< 372 Ед/л): 13 [10;19] дней против 7 [6;10] дней ($p < 0,01$ U-критерий Манна-Уитни).

Статистический анализ выявил достоверно более высокую частоту госпитализации в ОРИТ среди пациентов основной группы по сравнению с контрольной группой 1 ($p < 0,001$, критерий χ^2). Относительный риск необходимости перевода в ОРИТ у пациентов с уровнем ЛДГ, превышающим 1,5 нормы (≥ 372 Ед/л), составил 17,768 (ДИ 7,2–43,8) относительно группы с невысокими показателями ЛДГ ($< 1,5$ нормы или < 372 Ед/л).

При сравнении длительности пребывания в ОРИТ выявлено, что пациенты основной группы с повышенным ЛДГ более чем 1,5 от нормы находились в отделении интенсивной терапии значительно дольше, чем пациенты из контрольной

группы 1: 7 [3;16] дней против 1 [1;3] дней ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни). Стоит отметить, что в контрольной группе 1 четыре пациента из пяти пребывали в отделении реанимации не более 24 часов.

Анализ летальности выявил значимые межгрупповые различия. В основной группе было зарегистрировано 25 случаев летального исхода, что составило 16,1% (95% ДИ: 10,5–22,5) от общего числа пациентов. В отличие от этого, в контрольной группе 1 все пациенты были успешно выписаны из стационара.

Суммируя все описанное выше, пациенты основной группы с повышением активности ЛДГ более чем в 1,5 раза, выявленным на 9-й день болезни в среднем на 5 суток дольше пребывали в стационаре по сравнению с пациентами в контрольной группе 1. Частота поступления в реанимацию у пациентов из этой группы составила 29,0%, а летальность составила 16%, что отражает сильную корреляцию между ЛДГ и тяжестью заболевания, и согласуется с зарубежными и отечественными данными [114-118,144]. В ряде работ, где были известны сроки выполнения анализа, срок забора крови указывался в днях от поступления в стационар [6,8,9,134]. В нашем исследовании срок выполнения исследования определялся в днях от начала болезни, что позволяет не ограничивать определение уровня ЛДГ пациентами стационаров, а использовать исследование как предиктор тяжелого течения, в том числе при амбулаторном ведении пациентов с COVID-19 [144].

3.5.2. Соотношение фракций лактатдегидрогеназы и тяжести течения заболевания

Общая активность ЛДГ не обладает достаточной тканевой специфичностью, поскольку ЛДГ существует в виде пяти различных фракций, представленных в разных тканях. Определение изоферментного спектра ЛДГ является гораздо более информативным инструментом, чем измерение ее общей активности. Так, при физиологическом состоянии организма, фракции ЛДГ в крови находятся в следующем распределении: ЛДГ2 > ЛДГ1 > ЛДГ3 > ЛДГ4 > ЛДГ5 (Таблица 24) [130,131].

Таблица 24 - Распределение и референтные значения изоферментов лактатдегидрогеназы

Изофермент ЛДГ	Преимущественная локализация	Референтные значения*
ЛДГ1	Кардиомиоциты; эритроциты	16,1-31,5
ЛДГ2	Ретикулоэндотелиальная система	29,2-41,6
ЛДГ3	Легочная ткань	17,0-26,2
ЛДГ4	Почечная ткань и поджелудочная железа	5,9-12,3
ЛДГ5	Печень и поперечнополосатая мускулатура	3,2-17,3

*метод электрофореза на агарозном геле HYDRAGEL 7 ISO-LDH, Sebia, Франция.

У пациентов основной группы зарегистрировано достоверное снижение активности ЛДГ1 и ЛДГ2 при одновременном повышении показателей ЛДГ3, ЛДГ4 и ЛДГ5 ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни) в сравнении с контрольной группой 2 (группа доноров крови). Наиболее выраженные различия отмечены для ЛДГ1 и ЛДГ4 ($p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни) (Рисунок 11). Таким образом, проведенный сравнительный анализ изоферментного спектра ЛДГ выявил статистически значимые межгрупповые различия по всем фракциям.

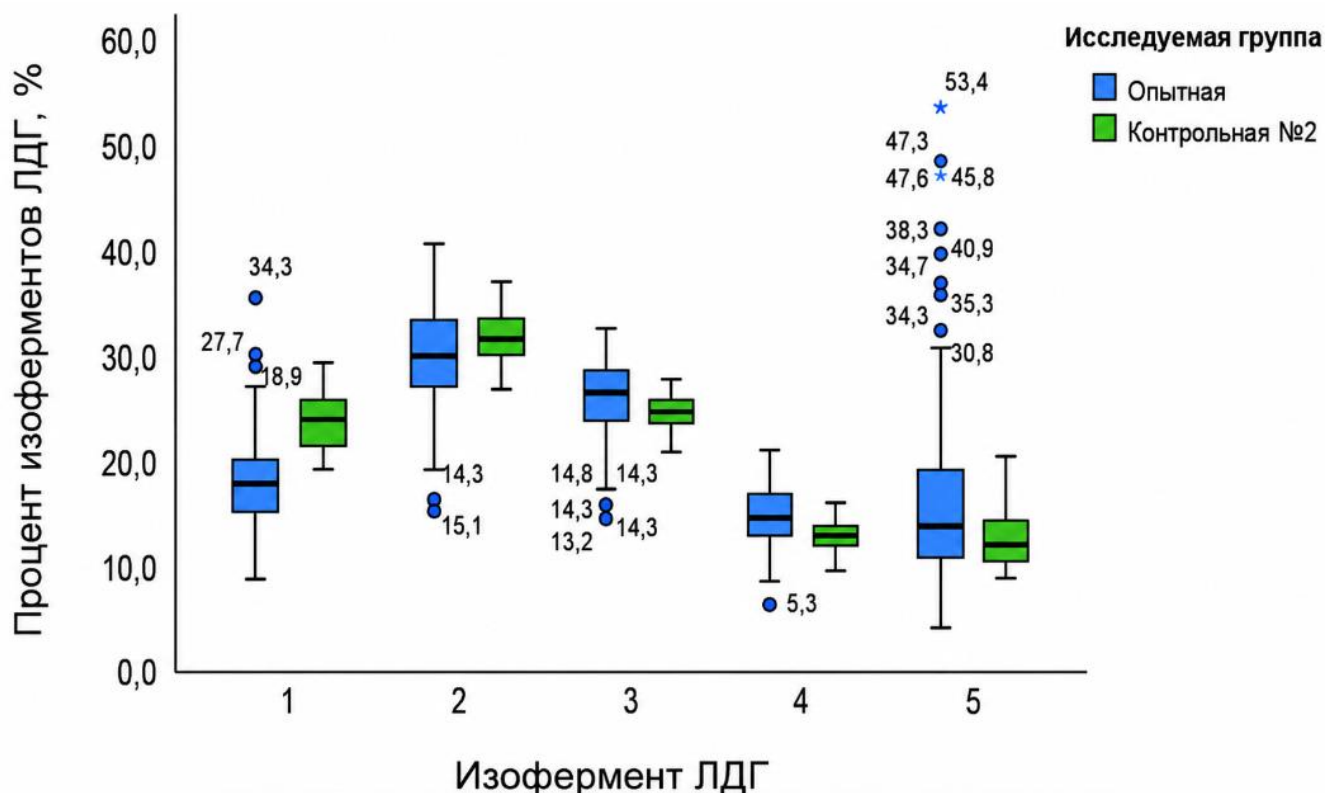


Рисунок 11 - Результаты определения изоферментов лактатдегидрогеназы в основной группе (ЛДГ ≥ 352 Ед/л) и контрольной группе 2

На основании анализа ящичных диаграмм (box plot) были идентифицированы статистические выбросы, лежащие выше верхней границы "усов" ($Q_3 + 1,5 \times$ межквартильный размах). Так, в основной группе выявлено 13 пациентов с высокими показателями ЛДГ5 (ЛДГ5 > 150 Ед/л). Сравнительный анализ данной подгруппы с остальными пациентами основной группы (n=142) выявил, что эти лица имели более высокие средние показатели активности аспартатаминотрансферазы (240,1 [194,07; 298,3] против 48,7 [35,50; 77,2] ЕД/л, $p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни) и аланинаминотрансферазы (303,1 [238,22; 489,67] против 33,8 [23,3; 55,6] ЕД/л, $p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни). В связи с чем основная группа была скорректирована путем исключения этих 13 пациентов с высокими показателями активности печеночных трансаминаз.

Сравнительный анализ скорректированной основной группы с контрольной группой 2 не выявил достоверных различий по показателям ЛДГ5 ($p > 0,05$, U-критерий Манна-Уитни, Рисунок 12; Таблица 25).

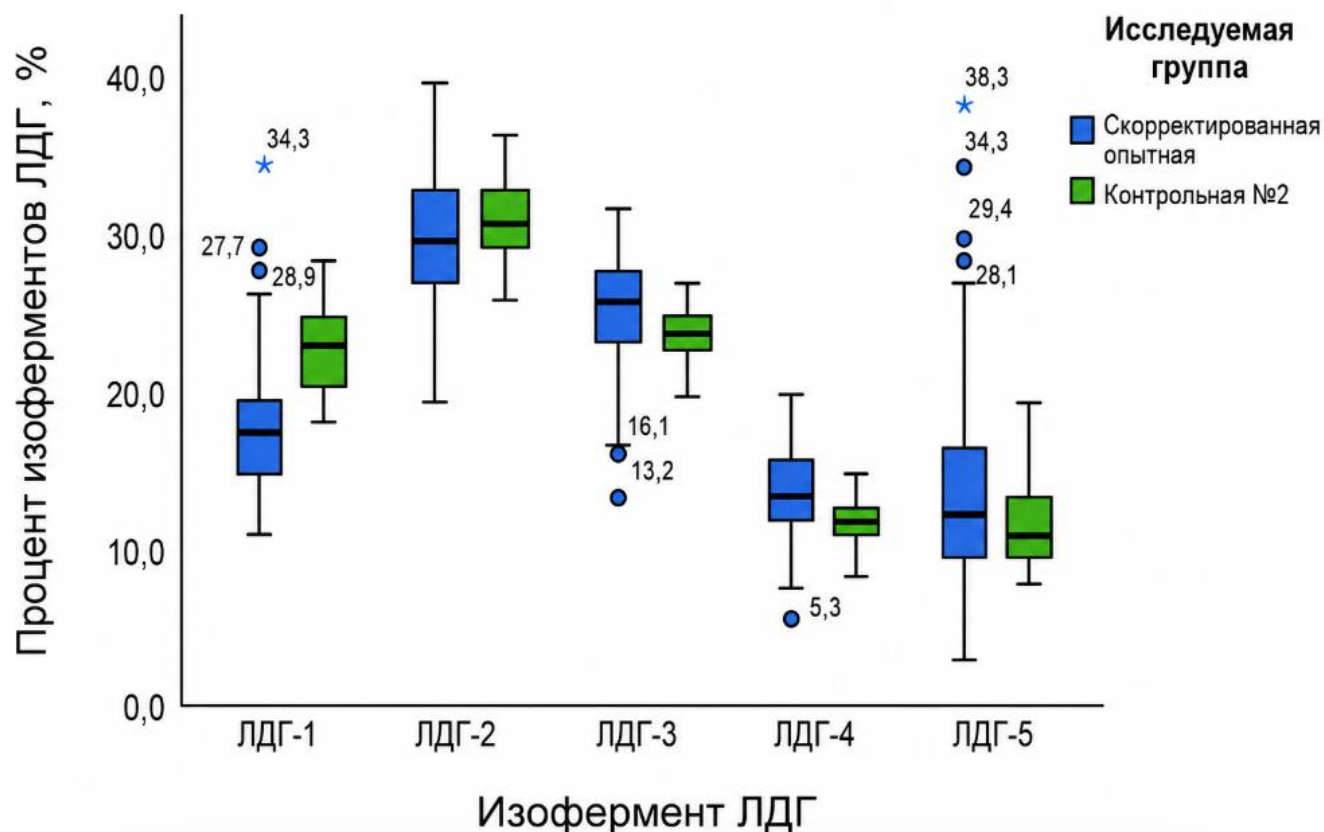


Рисунок 12 - Результаты определения изоферментов лактатдегидрогеназы в скорректированной основной группе и контрольной группе 2

Таблица 25 - Результаты определения изоферментов лактатдегидрогеназы в скорректированной основной группе и контрольной группе 2

Изофермент ЛДГ и его локализация	Доли фракций ЛДГ, Ме [Q1; Q3]		p критерий Манна - Уитни
	Основная группа	Контрольная группа 2	
ЛДГ1 (Кардиомиоциты; эритроциты)	16,8 [14,0;19,2]	22,9 [20,3;24,7]	0,000
ЛДГ2 (Ретикулоэндотелиальная система)	28,9 [26,0;32,7]	30,5 [29,0;32,7]	0,044
ЛДГ3 (Легочная ткань)	25,4 [22,5;27,6]	23,6 [22,5;24,9]	0,012
ЛДГ4 (Почечная ткань и поджелудочная железа)	13,3 [11,6;15,7]	11,7 [10,8;12,7]	0,000
ЛДГ5 (Печень и поперечнополосатая мускулатура)	12,6 [9,6;18,2]	10,8 [9,3;13,4]	0,140

Для анализа изменения изоферментного спектра ЛДГ в зависимости от исхода госпитализации основная группа была стратифицирована на две подгруппы: 1) пациенты с благоприятным исходом (выписка из стационара) и 2) пациенты с летальным исходом.

Сравнительный анализ медиан относительного содержания изоферментов ЛДГ выявил, что у пациентов с летальными исходами отмечались значимые увеличения ЛДГ1 и ЛДГ2 ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни), а также закономерное снижение ЛДГ5 по сравнению с выписанными пациентами. Статистически значимых различий по ЛДГ3 не выявлено ($p > 0,05$, U-критерий Манна-Уитни) (Таблица 26, Рисунок 13).

Таблица 26 - Сравнение средних долей изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от исхода заболевания в основной группе

Фракция ЛДГ	Доля фракции ЛДГ, Ме [Q1; Q3]		p критерий Манна Уитни
	Выписанные пациенты (n=130)	Умершие пациенты (n=25)	
ЛДГ1(Кардиомиоциты; эритроциты)	16,5[13,9;19,02]	18,2[16,4;19,6]	0,028
ЛДГ2 (Ретикулоэндотелиальная система)	28,4[25,9;32,0]	32,4[27,8;34,5]	0,007
ЛДГ3 (Легочная ткань)	25,15[22,17;27,6]	26,7[24,9;27,5]	0,793
ЛДГ4 (Почечная ткань и поджелудочная железа)	13,8[11,75;15,75]	12,8[11,6;15,3]	0,004
ЛДГ5 (Печень и поперечнополосатая мускулатура)	13,5[10,17;20,8]	9,4[7,3;14,4]	0,001

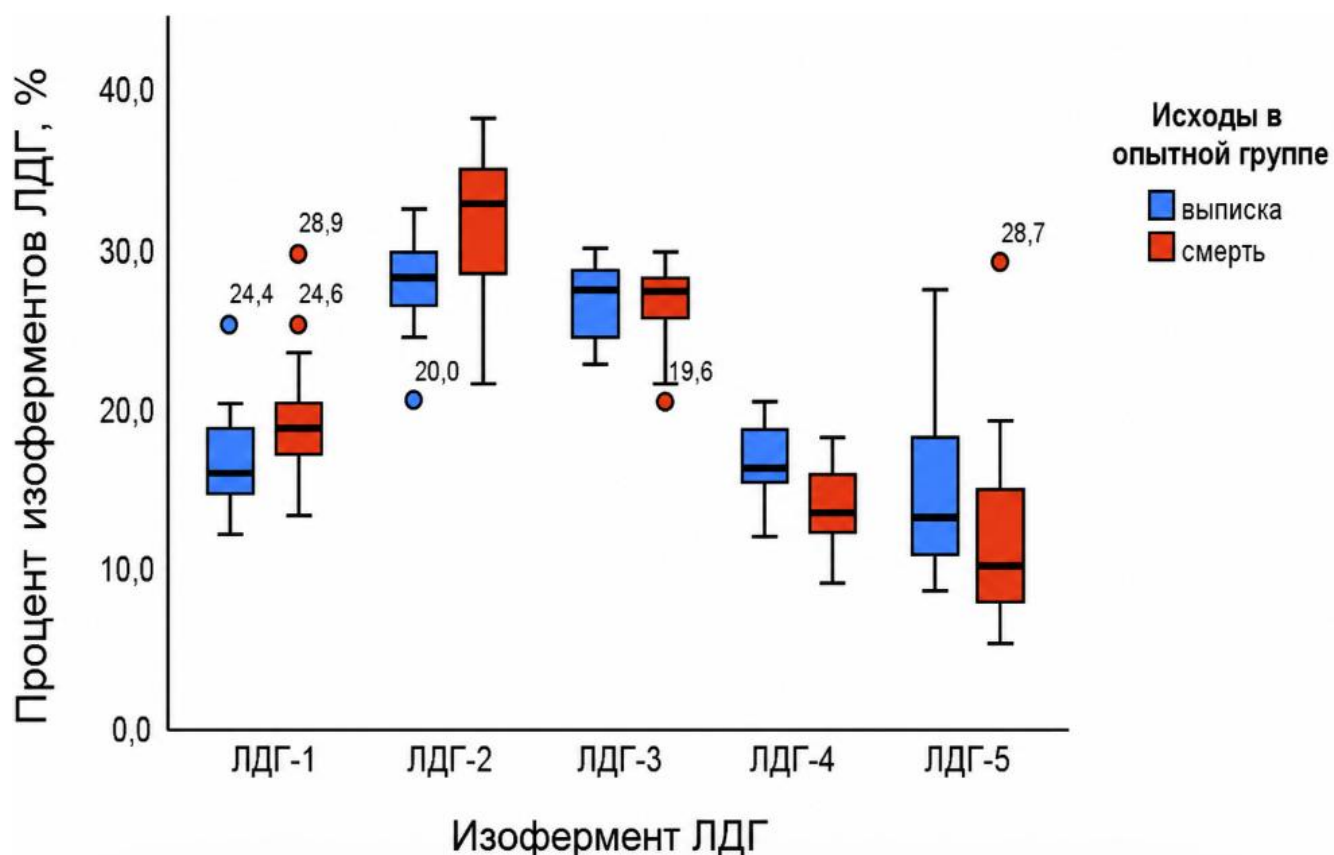


Рисунок 13 - Сравнение средних долей изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от исходов среди пациентов из основной группы

Для оценки возрастных особенностей основная группа была стратифицирована на три возрастные категории: 18–40 лет, 41–60 лет и ≥ 61 года, с последующим определением средних долей изоферментов ЛДГ для каждой из групп (Таблица 26). Было выявлено увеличение с возрастом долей 1 и 2 фракции с пропорциональным уменьшением 5-й фракции ($p < 0,05$, Н-критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Бонферрони для множественных сравнений). Отмечено пропорциональное уменьшение доли 4 фракции ЛДГ с возрастом, однако результаты оказались статистически не значимыми. Доля 3-й фракции ЛДГ с возрастом не изменялась (Таблица 27).

При проведении детализированного сравнения между объединенной группой пациентов 18–60 лет ($n=59$) и группой ≥ 61 лет ($n=96$) выявлено, что при сохранении значимой разницы в ЛДГ1 и ЛДГ2 фракциях, отмечается значимое уменьшение доли ЛДГ4 с возрастом ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни). В свою очередь разница долей в ЛДГ3 оказалась незначимой ($p > 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 27 - Сравнение средних долей изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от возраста в опытной группе

Параметр	Подгруппа 18–40 лет (n=15)	Подгруппа 41–60 лет (n=44)	Подгруппа > 61 лет (n=96)	p (Н-Критерий Краскала- Уоллиса)
ЛДГ1, %, Ме [Q1; Q3]	13,7 [12,2;16,3]	14,6 [12,8;17,9]	18,15 [16,1;20,1]	0,000
ЛДГ2, %, Ме [Q1; Q3]	26,8 [25,2;29,4]	27 [23,5; 30]	30,55 [27,4;33,3]	0,000
ЛДГ3, %, Ме [Q1; Q3]	26,3 [21,4;28,4]	26,6 [22,6;28,2]	25,2 [22,6;27]	0,708
ЛДГ4, %, Ме [Q1; Q3]	15,2 [11,6;18,0]	14,9 [12,7;17,07]	13 [11,5;15,1]	0,103
ЛДГ5, %, Ме [Q1; Q3]	16,2 [12; 23,3]	13,6 [10,1;25,8]	12 [9,32;16,4]	0,024
Летальные исходы, n,% (95%ДИ)	0	2 4,5(0-12,2)	23 24(15,1-32,9)	0,01*

* U-критерий Фишера

При сравнении исходов госпитализации внутри основной группы в зависимости от возраста выявлено, что у лиц ≥ 61 лет смертельные исходы регистрируются значимо чаще, чем у лиц вне этой возрастной группы ($p < 0,01$, Точный критерий Фишера). В подгруппе, состоящей из лиц от 41–60 лет, зарегистрировано 2 летальных исхода (4,5%), в то время как в группе старше 60 лет зарегистрировано 23 смертельных исхода (24%) (Таблица 27). Относительный риск смерти в группе лиц старше 60 лет составил 7,07 (ДИ 1,73; 28,89). Статистических различий в группах по полу не получено.

3.5.3 Сравнение соотношений фракций лактатдегидрогеназы при органических поражениях и сопутствующих заболеваниях

Основная группа (пациенты с уровнем ЛДГ > 372 ЕД/л) была проанализирована на наличие соматических заболеваний, сопутствующих течению COVID-19. Для каждого из рассматриваемых состояний были сформированы подгруппы пациентов с наличием и отсутствием соответствующей патологии. При

сравнении медиан общей активности ЛДГ статистически значимых различий не выявлено ни в одной из пар подгрупп (Таблица 28).

Таблица 28 - Сравнение медиан общей активности лактатдегидрогеназы в зависимости от сопутствующих COVID-19 состояний в опытной группе

Сопутствующие COVID-19 заболевания	Количество наблюдений	ЛДГ, Ме [Q1; Q3]		p (U-критерий Манна-Уитни)
		Пациенты с наличием заболевания	Пациенты с отсутствием заболевания	
Острый коронарный синдром	5	414 [397;464]	422 [391;488]	0,851
Хронические заболевания легких	11	408 [379;515]	425 [391;485]	0,391
Онкологические заболевания	17	414 [382;45]	425 [393;490]	0,201
Сахарный диабет	20	425 [403;465]	420 [390;487]	0,637
Хроническая болезнь почек	34	423 [397;498]	421 [391;485]	0,787
Ожирение	37	424 [394;514]	420 [391;480]	0,681

С целью уточнения наличия органных поражений было проведено углубленное исследование с использованием специфических биомаркеров у пациентов из основной группы. В качестве ключевого маркера кардиальной патологии был избран N-концевой пропептид мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP). Повышение концентрации NT-proBNP в сыворотке крови выявлено у 79,22% (ДИ 72,8–85,5) пациентов, медиана значений NT-proBNP составила 342,5 [143,0; 1269,0] нг/л. Для установления взаимосвязи повышения фракций ЛДГ с повышением NT-proBNP у пациентов основной группы были сформированы дополнительные подгруппы по концентрации NT-proBNP в нг/л: <125 (n=32); от 125 до 299 (n=41); >300 (n=81). При парных сравнениях подгрупп выявлены различия между группой NT-proBNP <125 нг/л и объединёнными группами NT-proBNP от 125 до 299 и NT-proBNP >300 нг/л во всех фракциях ЛДГ за исключением третьей (Таблица 29).

Таблица 29 - Сравнение процентного содержания изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от концентрации NT-proBNP

Фракция ЛДГ	ЛДГ, Ме [Q1; Q3] %			p Критерий Краскела- Уоллиса)
	Pro-BNP <125 нг/л n=32	Pro-BNP 125-299 нг/л n=41	Pro-BNP >300 нг/л n=81	
ЛДГ1	14,05 [12,2;17,02]	16,7 [14,45;18,9]	18,1 [15,0;19,95]	0,000
ЛДГ2	25,7 [23,9;29,2]	28,9 [26,9;31,45]	30,5 [27,1;33,4]	0,000
ЛДГ3	25,75 [22,5;28,07]	25,6 [23,0;27,15]	25,2 [22,0;27,35]	0,812
ЛДГ4	15,05 [12,65;17,4]	14 [12,3;16,65]	13 [11,4;15,15]	0,011
ЛДГ5	15,2 [11,95;25,17]	12,7 [10,35;16,9]	11,2 [9,2;16,8]	0,012

Для оценки зависимости между изменениями фракций ЛДГ и наличием сердечной недостаточности отбирались пациенты из основной группы с проведённой ЭХО-КГ (n=30). Когорта была стратифицирована по показателю фракции выброса левого желудочка: пациенты с фракцией выброса более или равно 50% (n=26, 87%) и пациенты с фракцией выброса менее 50% (n=4, 13%). Статистически значимые различия были получены во всех фракциях за исключением 3 фракции ЛДГ ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

В работе изучена взаимосвязь между спектром изоферментов ЛДГ и маркерами почечной дисфункции (креатинин, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)) для оценки характера полиорганного поражения. В зависимости от концентрации креатинина пациенты были разбиты на 3 группы: менее 100 (n=104, 67,1%, ДИ 60-74,6), 100–200 (n=47, 30,3%, ДИ 23-37,6), более 200 (n=4, 2,6%, ДИ 0,6-5,2). При сравнении отношения фракций ЛДГ в данных подгруппах статистической разницы выявлено не было ($p > 0,05$, H-критерий Краскела-Уоллиса).

Сравнения групп разделённых по значению СКФ в мл/мин/1,73 кв.м (больше 90; меньше 90) выявило, что при снижении скорости клубочковой фильтрации меньше 90 мл/мин/1,73 кв.м, отмечается значимое увеличение долей 1 и 2 фракции с пропорциональным уменьшением доли 4-й фракции ($p < 0,05$ H-критерий Краскела-Уоллиса). Доля 3 и 5-й фракций ЛДГ со снижением СКФ значимо не

изменялась (Таблица 30).

Таблица 30 - Сравнение средних долей изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от значения скорости клубочковой фильтрации

Фракция ЛДГ	ЛДГ, Ме [Q1; Q3]		p (U-критерий Манна-Уитни)
	СКФ (мл/мин/1,73 кв.м) больше 90 n=43	СКФ (мл/мин/1,73 кв.м) меньше 90 n=112	
ЛДГ1	14,7 [12,4;18,1]	17,6 [15;19,6]	0,000
ЛДГ2	27,2 [23,9;31,8]	29,45 [26,8;33,1]	0,026
ЛДГ3	25,8 [22,8;28]	25,4 [22,3;27,4]	0,528
ЛДГ4	14,8 [12,6;16,8]	13,1 [11,5;15,3]	0,041
ЛДГ5	13,1 [10,2;25,3]	12,5 [9,4;16,9]	0,172

Учитывая, что фракции ЛДГ1 и ЛДГ2 являются преимущественными маркерами повреждения кардиомиоцитов и эритроцитов, а не почечной ткани, выявленные изменения, вероятно, отражают не прямое влияние снижения СКФ на изоферментный спектр, а более тяжелое течение COVID-19 у пациентов с исходной почечной дисфункцией, ассоциированное с более частым вовлечением сердечно-сосудистой системы. Кроме того, у данной категории пациентов выше вероятность наличия сопутствующей кардиальной патологии, которая может вносить дополнительный вклад в изменение соотношения фракций ЛДГ. Таким образом, выявленные различия в изоферментном спектре ЛДГ у пациентов со сниженной СКФ следует интерпретировать как маркер полиорганного поражения с вовлечением сердечно-сосудистой системы, а не как прямое следствие почечной дисфункции.

Для оценки изменений фракций ЛДГ в зависимости от повреждения легких, выявленном при проведении мультиспиральной компьютерной томографии грудной полости по классификации, приведенной во временных методических рекомендациях «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 11 от 07.05.2021 г. [105], пациенты были разделены на 2 подгруппы: пациенты с поражением, соответствующим степени КТ 1-2, и пациенты с КТ 3-4. При поражении легких, соответствующим степени КТ 3-4,

отмечается значимое увеличение 1 фракции ЛДГ ($p < 0,05$, U-Критерий Мана-Уитни) (Таблица 31).

Данные по КТ также коррелировали с необходимостью в эскалации респираторной поддержки пациентов. Доля пациентов из опытной группы, находившихся на искусственной вентиляции легких в подгруппе КТ 3–4, была значимо выше, чем с КТ 1–2 ($p < 0,001$, χ^2).

Таблица 31 - Сравнение средних долей изоферментов лактатдегидрогеназы в зависимости от результатов компьютерной томографии

Фракция ЛДГ	ЛДГ, Ме [Q1; Q3]		p (U-критерий Манна-Уитни)
	КТ 1–2 n=106	КТ 3–4 n=49	
ЛДГ1	16,3 [13,8;18,9]	18,2 [15,1;19,6]	0,021
ЛДГ2	28,5 [25,6;32,]	30 [27,1;33,6]	0,056
ЛДГ3	25,6 [22,6;27,6]	25,4 [22,5;27,4]	0,9
ЛДГ4	13,5 [11,5;15,7]	13,2 [11,8;15,7]	0,893
ЛДГ5	13,6 [9,8;20,5]	11,1 [9,4;15,9]	0,058

Таким образом, в подгруппе пациентов с летальным исходом выявлено изменение изоферментного паттерна ЛДГ: соотношение фракций смещалось в сторону ЛДГ2 > ЛДГ1 > ЛДГ3 > ЛДГ4 > ЛДГ5, что приближалось к распределению, характерному для здоровых лиц. В то же время у пациентов с благоприятным исходом сохранялось патологическое смещение спектра с преобладанием «легочно-почечных» фракций (ЛДГ3, ЛДГ4) над «кардиальными» (ЛДГ1, ЛДГ2).

Следовательно, тип изоферментного спектра лактатдегидрогеназы, определяемый на 9-й день заболевания, может рассматриваться в качестве прогностического признака, позволяющего идентифицировать пациентов с преобладающим поражением сердечно-сосудистой системы, ассоциированным с неблагоприятным исходом COVID-19. Клинический пример приведен в приложении А (Клиническое наблюдение №4).

Результаты, изложенные в четвертой части исследования, были отражены в опубликованной статье [144].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия COVID-19 стала сложным испытанием для научной и медицинской сферы, что потребовало всестороннего изучения вируса и его взаимодействия с организмом хозяина и клинических проявлений заболевания. Диссертационная работа направлена на решение актуальных задач, связанных с интерпретацией результатов серологических исследований при COVID-19, оценкой протективного потенциала постинфекционного иммунитета в условиях смены доминирующих вариантов SARS-CoV-2, а также с поиском надежных лабораторных предикторов тяжелого течения заболевания.

В данной работе впервые на обширной выборке российских пациентов проведено комплексное исследование и количественная оценка динамики перекрестной вируснейтрализующей активности сывороток крови от пациентов с COVID-19 в отношении последовательно изменяющихся вариантов вируса SARS-CoV-2. Установлено, что гуморальный иммунитет, сформировавшийся в результате воздействия ранних вариантов вируса (прототипные варианты, варианты Альфа и Бета), характеризуется частичной и сниженной вируснейтрализующей активностью по отношению к антигенно отдалённым подвариантам, таким как ХВВ.1.9. Этот результат подчеркивает непрерывную адаптацию вируса к популяционному иммунитету и объясняет наблюдаемые волны повторных инфекций.

Исследование выявило нарастающее несоответствие между количественными показателями IgG, определяемыми стандартными тест системами, и функциональной активностью антител - их способностью нейтрализовать актуальные варианты SARS-CoV-2. На начальных этапах пандемии основной проблемой в области лабораторной диагностики являлась низкая специфичность ряда тест-систем, которая приводила к возникновению ложноположительных результатов при определении IgM. Однако, с течением времени, в связи с эволюцией вируса, возникла более серьезная проблема. Установлено, что высокие уровни IgG к вирусу SARS-CoV-2, определяемые

коммерчески доступными тест-системами, основанными на антигенах уханьского штамма, утратили свою надежность как индикатор наличия защитных вируснейтрализующих антител против актуальных вариантов вируса.

В процессе исследования были проанализированы прогностические маркеры, применяемые в клинической практике для оценки тяжести течения COVID-19. Установлено, что среди них только индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, уровень С-реактивного белка, Д-димера и лактатдегидрогеназы сохраняли свою прогностическую значимость на протяжении всей пандемии. Кроме того, была установлена и подробно охарактеризована высокая прогностическая значимость изоферментного спектра лактатдегидрогеназы, что позволяет осуществлять оценку риска неблагоприятного исхода и определять ведущую органную патологию.

Полученные нами результаты подчеркивают важность тщательной интерпретации показателей специфических антител и их функциональной состоятельности при оценке уровня иммунологической защиты пациентов. Применение анализа изоферментов лактатдегидрогеназы с целью раннего выявления больных с высоким риском тяжелого течения SARS-CoV-2 имеет важное практическое значение и используется в работе врачей ГБУЗ «МКНИЦ Больница 52 ДЗМ».

ВЫВОДЫ

1. Наиболее достоверным критерием исключения ложноположительных результатов определения антител класса IgM к вирусу SARS-CoV-2 является отсутствие сероконверсии по антителам класса IgG при исследовании «парных сывороток».

2. Установлено, что получение ложноположительных результатов определения антител класса IgM к SARS-CoV-2 не имеет статистически значимой корреляции с наличием аутоиммунных заболеваний.

3. В 78,9% сыворотках крови людей, переболевших новой коронавирусной инфекцией во время циркуляции варианта Дельта, присутствуют антитела, способные нейтрализовать варианты вируса SARS-CoV-2, циркулировавшие в 2023–2025 гг.

4. Показано, что высокий уровень IgG к SARS-CoV-2 (Mindray CL-2000, Китай; имунохемилюминесцентный анализ) не является надежным маркером наличия вируснейтрализующих антител к актуальным вариантам SARS-CoV-2 и требует пересмотра критериев оценки популяционного иммунитета.

5. Уровни показателей лактатдегидрогеназы, D-димера, С-реактивного белка и индекса соотношения нейтрофилов к лимфоцитам являются прогностически значимыми для оценки тяжести течения COVID-19 независимо от циркулирующего варианта вируса.

6. Повышение общей активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови более чем в 1,5 раза от верхней границы нормы (≥ 372 Ед/л) является независимым и значимым прогностическим маркером неблагоприятного течения COVID-19, ассоциированным с риском госпитализации в отделения реанимации и интенсивной терапии, увеличением длительности пребывания в стационаре и летальным исходом.

7. Изменение соотношения изоферментов лактатдегидрогеназы: снижение долей ЛДГ1, ЛДГ2 при одновременном увеличении долей ЛДГ3, ЛДГ4 – является более чувствительным прогностическим маркером, чем общая активность

лактатдегидрогеназы, и позволяет идентифицировать пациентов с высоким риском развития полиорганной недостаточности и неблагоприятного исхода при COVID-19.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изолированном положительном результате IgM к SARS-CoV-2 (с отрицательными IgG и ПЦР-анализа) следует повторно исследовать сыворотку через 14 дней в той же тест-системе. Отсутствие сероконверсии IgG указывает на ложноположительный результат и позволяет отменить карантин.
2. Высокие уровни IgG к SARS-CoV-2 могут быть не ассоциированы с наличием нейтрализующих антител к современным вариантам. Для косвенной оценки иммунной защиты рекомендуется использовать тесты на нейтрализующую активность антител.
3. Для прогнозирования риска тяжелого течения COVID-19 у госпитализированных пациентов рекомендуется учитывать индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, уровни лактатдегидрогеназы, С-реактивного белка и D-димера.
4. При повышении лактатдегидрогеназы более чем в 1,5 раза от нормы (≥ 372 Ед/л) рекомендуется анализировать изоферментный спектр. Снижение ЛДГ1/ЛДГ2 и рост ЛДГ3/ЛДГ4 указывает на полиорганное поражение, а увеличение ЛДГ1/ЛДГ2 при высокой общей лактатдегидрогеназы является неблагоприятным признаком.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенное исследование углубило понимание гуморального иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 в различные периоды пандемии, а также способствовало улучшению методов прогнозирования тяжести течения COVID-19. В условиях продолжающейся эволюции вируса важно осуществлять мониторинг вируснейтрализующей активности антител в отношении новых подвариантов, таких как ХВВ.1.9, EG.5.1 и других. Перспективным направлением является изучение кросс-реактивности антител, индуцированных вакцинацией или перенесенной инфекцией, с актуальными циркулирующими штаммами, что позволит повысить эффективность разрабатываемых вакцин и обосновать необходимость их обновления.

Выделение и секвенирование новых штаммов вируса SARS-CoV-2, остается важным моментом для отслеживания генетической изменчивости вируса. Развитие международных баз данных, таких как GISAID, и внедрение современных методов секвенирования позволят оперативно выявлять новые варианты и оценивать их эпидемиологическую значимость.

Результаты проведенной работы также впервые выявили проблему ложноположительных результатов при определении IgM к вирусу SARS-CoV-2. В связи с этим является целесообразным разработать новые стандартизированные алгоритмы интерпретации серологических тестов, что позволит повысить точность диагностики.

Обнаруженная прогностическая ценность лактатдегидрогеназы и её изоферментов требует дополнительной валидации на более обширных группах пациентов с COVID-19.

Исследование взаимосвязи лактатдегидрогеназы с другими биомаркерами, такими как D-димер, С-реактивный белок и цитокины является перспективным направлением с целью разработки автоматизированного алгоритма оценки многопараметрических моделей для прогнозирования тяжести течения COVID-19.

Важным направлением является анализ постинфекционного иммунитета и отдаленных последствий перенесенной инфекции, что включает в себя риск повторных заражений и развитие постковидного синдрома. Очевидной становится значимость междисциплинарного подхода, который предполагает совместную работу вирусологов, иммунологов, клиницистов и биоинформатиков. Полученные результаты имеют важное практическое значение, способствуют совершенствованию системы здравоохранения и повышают готовность к возможным эпидемическим угрозам в будущем.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНА	–	Вируснейтрализующие антитела
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ДИ	–	Доверительный интервал
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИСЛМ	–	Индекс соотношения лимфоцитов к моноцитам
ИСНЛ	–	Индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам
ИСНМ	–	Индекс соотношения нейтрофилов к моноцитам
ИСТЛ	–	Индекс соотношения тромбоцитов к лимфоцитам
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
ИХА	–	Иммунохроматографический анализ
ИХЛА	–	Иммунохемилюминесцентный анализ
ЛДГ	–	Лактатдегидрогеназа
Me	–	Медиана
ММКЦ	–	Московский многопрофильный клинический центр
ОРИТ	–	Отделение реанимации и интенсивной терапии
ОРС	–	Открытая рамка считывания
ОТ-ПЦР	–	Обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция
ПЦР	–	Полимеразная цепная реакция
РНК	–	Рибонуклеиновая кислота
СГТ	–	Среднее геометрическое титра
СКФ	–	Скорость клубочковой фильтрации
СРБ	–	С-реактивный белок
ТЦД ₅₀	–	Тканевая цитопатическая доза 50%
ЦПД	–	Цитопатическое действие
χ^2	–	Хи-квадрат Пирсона (статистический критерий)
ACE2	–	Angiotensin-Converting Enzyme 2, Ангиотензинпревращающий фермент-2
CKD-EPI	–	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, «Сотрудничество в области эпидемиологии хронических заболеваний почек»
COI	–	Cut-Off Index, индекс отсечения (пороговый индекс)
COVID-19	–	Coronavirus Disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года

GISAID	–	Global Initiative on Sharing All Influenza Data, Глобальная инициатива по обмену данными о гриппе
M	–	Mean, среднее арифметическое
NT-proBNP	–	NT-proBNP – N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide, N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
RBD	–	Receptor-Binding Domain, Рецептор-связывающий домен
SD	–	Standard Deviation, стандартное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ongoing Johns Hopkins COVID-19 Resources: [сайт] – URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (дата обращения: 01.10.2023).
2. World Health Organization. COVID-19 Dashboard: [сайт] – URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c> (дата обращения: 01.07.2025).
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). COVID Data Tracker: [сайт] – URL: https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#trends_weeklydeaths_select_00 (дата обращения: 01.07.2025).
4. Du, L. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19 / L. Du, Y. Yang, X. Zhang // Cellular & Molecular Immunology. – 2021. – Vol. 18 – N 10 – P. 2293–2306. DOI: 10.1038/s41423-021-00752-2.
5. Suthar, M. S. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients / M. S. Suthar, M. G. Zimmerman, R. C. Kauffman [et al.]. // Cell Reports Medicine. – 2020. – Vol. 1 – N 3 – P. 100040. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100040.
6. Lyngse, F. P. Household transmission of SARS-CoV-2 Omicron variant of concern subvariants BA.1 and BA.2 in Denmark / F. P. Lyngse, C. T. Kirkeby, M. Denwood [et al.]. // Nature Communications. – 2022. – Vol. 13 – P. 5760. DOI: 10.1038/s41467-022-33498-0.
7. World Health Organization (WHO). XBB.1.16 Initial Risk Assessment: [сайт] – 2023. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2023-XBB.1.16> (дата обращения: 13.09.2023).
8. Earnest, R. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA / R. Earnest, R. Uddin, N. Matluk [et al.]. // Cell Reports Medicine. – 2022. – Vol. 3 – N 4 – P. 100583. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100583.
9. Tamura, T. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants / T. Tamura, J. Ito, K. Uriu [et al.]. // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14 – N 1 – P. 2800. DOI: 10.1038/s41467-023-38435-3.

10. Selvavinayagam, S. T. Clinical characteristics and novel mutations of Omicron subvariant XBB in Tamil Nadu, India – a cohort study / S. T. Selvavinayagam, S. J. Karishma, K. Hemashree [et al.]. // *The Lancet Regional Health – Southeast Asia*. – 2023. – Vol. 19 – P. 100272. DOI: 10.1016/j.lansea.2023.100272.
11. Kumleben, N. Test, test, test for COVID-19 antibodies: the importance of sensitivity, specificity and predictive powers / N. Kumleben, R. Bhopal, T. Czypionka [et al.]. // *Public Health*. – 2020. – Vol. 185 – P. 88–90. DOI: 10.1016/j.puhe.2020.06.006.
12. Deeks, J. J. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2 / J. J. Deeks, J. Dinnes, Y. Takwoingi [et al.]. // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2020. – Vol. 6 – N 6. – P. CD013652. DOI: 10.1002/14651858.CD013652.
13. Lombardi, Y. External validation of prognostic scores for COVID-19: a multicenter cohort study of patients hospitalized in Greater Paris University Hospitals / Y. Lombardi, L. Azoyan, P. Szychowiak [et al.]. // *Intensive Care Medicine*. – 2021. – Vol. 47 – N 12 – P. 1426–1439. DOI: 10.1007/s00134-021-06524-w.
14. Wynants, L. Prediction models for diagnosis and prognosis of COVID-19: systematic review and critical appraisal / L. Wynants, B. Van Calster, G. S. Collins [et al.]. // *BMJ*. – 2020. – Vol. 369 – P. m1328. DOI: 10.1136/bmj.m1328
15. Chen, H. The role of serum specific SARS-CoV-2 antibody in COVID-19 patients / H. Chen, X. Zhang, W. Liu [et al.]. // *International Immunopharmacology*. – 2021. – Vol. 91 – P. 107325. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107325.
16. Guo, L. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19) / L. Guo, L. Ren, S. Yang [et al.]. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71 – N 15. – P. 778–785. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
17. Li, Z. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis / Z. Li, Y. Yi, X. Luo [et al.]. // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92 – N 9 – P. 1518–1524. DOI: 10.1002/jmv.25727.
18. Dispinseri, S. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival / S. Dispinseri, M. Secchi, M. F. Pirillo [et al.]. // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12 – P. 2670. DOI: 10.1038/s41467-

021-22958-8.

19. Sancilio, A. COVID-19 symptom severity predicts neutralizing antibody activity in a community-based serological study / A. Sancilio, J. M. Schrock, A. R. Demonbreun [et al.]. // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12 – P. 12269. DOI: 10.1038/s41598-022-15791-6.

20. Petráš, M. SARS-CoV-2 vaccination in the context of original antigenic sin / M. Petráš, I. Králová Lesná // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2022. – Vol. 18 – N 1 – P. 1949953. DOI: 10.1080/21645515.2021.1949953.

21. Aguilar-Bretones, M. Impact of antigenic evolution and original antigenic sin on SARS-CoV-2 immunity / M. Aguilar-Bretones, R. A. M. Fouchier, M. Koopmans, G. P. van Nierop // *Journal of Clinical Investigation*. – 2023. – Vol. 133. DOI: 10.1172/JCI162192.

22. Rijkers, G. T. The "original antigenic sin" and its relevance for SARS-CoV-2 (COVID-19) vaccination / G. T. Rijkers, F. J. van Overveld // *Clinical Immunology Communications*. – 2021. – Vol. 1 – P. 13–16. DOI: 10.1016/j.clicom.2021.10.001.

23. NHS England. COVID-19 Daily: [сайт] – 2020. – URL: <https://web.archive.org/web/20200501094237/https://www.england.nhs.uk/statistics/statistical-work-areas/covid-19-daily-deaths/> (дата обращения: 01.07.2025).

24. McMichael, T. M. Epidemiology of COVID-19 in a long-term care facility in King County, Washington / T. M. McMichael, D. W. Currie, S. Clark [et al.]. // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382 – N 21 – P. 2005–2011. DOI: 10.1056/NEJMoa2005412.

25. Liu, Y. Predictive role of platelet and inflammation markers for severe COVID-19 by propensity score matching / Y. Liu, H. Huang, J. Zheng, Z. Liu, D. Peng // *Clinical Laboratory*. – 2024. – Vol. 70 – N 4. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2023.231027.

26. Alkhatip, A. A. A. M. M. The diagnostic and prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19: a systematic review and meta-analysis / A. A. A. M. M. Alkhatip, M. G. Kamel, M. K. Hamza [et al.]. // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2021. – Vol. 21 – N 5 – P. 505–514. DOI: 10.1080/14737159.2021.1915773.

27. Simadibrata, D. M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission to predict the

severity and mortality of COVID-19 patients: a meta-analysis / D. M. Simadibrata, J. Calvin, A. D. Wijaya, N. A. A. Ibrahim // *American Journal of Emergency Medicine*. – 2021. – Vol. 42 – P. 60–69. DOI: 10.1016/j.ajem.2021.01.006.

28. Elefante, E. Are patients with systemic lupus erythematosus more prone to result false-positive for SARS-CoV2 serology? / E. Elefante, C. Tani, D. Zucchi [et al.]. // *Clinical and Experimental Rheumatology*. – 2020. – Vol. 38 – N 3 – P. 577.

29. Tzouvelekis, A. False Positive COVID-19 Antibody Test in a Case of Granulomatosis with Polyangiitis / A. Tzouvelekis, T. Karampitsakos, A. Krompa [et al.]. // *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. – 2020. – Vol. 7 – P. 399. DOI: 10.3389/fmed.2020.00399.

30. To, K. K. False-positive SARS-CoV-2 serology in 3 children with Kawasaki disease / K. K. To, G. T. Chua, K. L. Kwok [et al.]. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2020. – Vol. 98 – N 3 – P. 115141. DOI: 10.3389/fmed.2020.00399.

31. Monte Serrano, J. COVID-19 and Mycoplasma pneumoniae: SARS-CoV-2 false positive or coinfection? / J. Monte Serrano, M. F. García-Gil, J. Cruaños Monferrer [et al.]. // *International Journal of Dermatology*. – 2020. – Vol. 59 – N 10 – P. 1282–1283. DOI: 10.1111/ijd.15090.

32. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): [сайт]. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 18.08.2025)

33. Drosten, C. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome / C. Drosten, S. Günther, W. Preiser [et al.]. // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 348 – N 20 – P. 1967–1976. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.

34. Bleibtreu, A. Focus on Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) / A. Bleibtreu, M. Bertine, C. Bertin [et al.]. // *Médecine et Maladies Infectieuses*. – 2020. – Vol. 50 – N 3 – P. 243–251. DOI: 10.1016/j.medmal.2019.10.004.

35. Bačenková, D. Comparison of Selected Characteristics of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and HCoV-NL63 / D. Bačenková, M. Trebuňová, T. Špakovská [et al.]. // *Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 11 – N 4 – P. 1497. DOI: 10.3390/app11041497.

36. Lan, J. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to

the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.]. // *Nature*. – 2020. – Vol. 581 – N 7807 – P. 215–220. DOI: 10.1038/s41586-020-2180-5.

37. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5 – N 4 – P. 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.

38. Arya, R. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins / R. Arya, S. Kumari, B. Pandey [et al.]. // *Journal of Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 433 – N 2 – P. 166725. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.11.024.

39. Betacoronavirus ViralZone: [сайт]. – URL: https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species (дата обращения: 14.01.2026).

40. Slevc, L. R. SARS-CoV-2/COVID-19 / L. R. Slevc // Elsevier eBooks. – 2023. – P. 197–208. DOI: 10.1016/b978-0-323-90385-1.00028-5.

41. Yadav, R. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19 / R. Yadav, J. K. Chaudhary, N. Jain [et al.]. // *Cells*. – 2021. – Vol. 10 – N 4 – P. 821. DOI: 10.3390/cells10040821.

42. ViralZone. Swiss Institute of Bioinformatics: [сайт] – URL: <https://viralzone.expasy.org/> (дата обращения: 14.01.2026).

43. Mavrodiev, E. V. On Classification and Taxonomy of Coronaviruses (Riboviria, Nidovirales, Coronaviridae) with Special Focus on Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / E. V. Mavrodiev, M. L. Tursky, N. E. Mavrodiev [et al.]. // *bioRxiv*. – 2021. DOI: 10.1101/2021.04.08.438137.

44. Gorbalenya, A. E. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus / A. E. Gorbalenya, E. J. Snijder, W. J. Spaan // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78 – N 15 – P. 7863–7866. DOI: 10.1128/JVI.78.15.7863-7866.2004.

45. Harvey, W. T. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape / W. T. Harvey, A. M. Carabelli, B. Jackson [et al.]. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19 – N 7 – P. 409–424. DOI: 10.1038/s41579-021-00573-0.

46. Ravi, V. Basic virology of SARS-CoV 2 / V. Ravi, S. Saxena, P. S. Panda //

Indian Journal of Medical Microbiology. – 2022. – Vol. 40 – N 2 – P. 182–186. DOI: 10.1016/j.ijmmb.2022.02.005.

47. Jackson, C. B. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells / C. B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2022. – Vol. 23 – N 1 – P. 3–20. DOI: 10.1038/s41580-021-00418-x.

48. Ke, Z. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact viruses / Z. Ke, J. Oton, K. Qu [et al.]. // Nature. – 2020. – Vol. 588 – N 7838 – P. 498–502. DOI: 10.1038/s41586-020-2665-2.

49. Mandal, M. Spatiotemporal genome diversity of SARS-CoV-2 in wastewater: a two-year global epidemiological study / M. Mandal, S. Mandal // Environmental Monitoring and Assessment. – 2023. – Vol. 196 – N 1 – P. 44. DOI: 10.1007/s10661-023-12228-z.

50. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution: [сайт] – URL: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/all-time> (дата обращения: 14.01.2026).

51. Focosi, D. Recombination in Coronaviruses, with a Focus on SARS-CoV-2 / D. Focosi, F. Maggi // Viruses. – 2022. – Vol. 14 – N 6 – P. 1239. DOI: 10.3390/v14061239.

52. Di Giacomo, S. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K / S. Di Giacomo, D. Mercatelli, A. Rakhimov, F. M. Giorgi // Journal of Medical Virology. – 2021. – Vol. 93 – N 9 – P. 5638–5643. DOI: 10.1002/jmv.27062.

53. Teng, S. Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity / S. Teng, A. Sobitan, R. Rhoades [et al.]. // Briefings in Bioinformatics. – 2021. – Vol. 22 – N 2 – P. 1239–1253. DOI: 10.1093/bib/bbaa233.

54. Thomson, E. C. Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity / E. C. Thomson, L. E. Rosen, J. G. Shepherd [et al.]. // Cell. – 2021. – Vol. 184 – N 5 – P. 1171–1187.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.037.

55. Public Health England. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under

investigation in England: [сайт] – 2021. – URL: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/991343/Variants_of_Concern_Technical_Briefing_15.pdf (дата обращения: 01.07.2025).

56. Twohig, K. A. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) compared with Alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study / K. A. Twohig, T. Nyberg, A. Zaidi [et al.]. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 22 – N 1 – P. 35–42. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00475-8.

57. Parums, V. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2 / V. Parums // *Medical Science Monitor*. – 2021. – Vol. 27 – P. e933622. DOI: 10.12659/MSM.933622.

58. Liu, W. Evolution of the SARS-CoV-2 Omicron Variants: Genetic Impact on Viral Fitness / W. Liu, Z. Huang, J. Xiao [et al.]. // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16 – N 2 – P. 184. DOI: 10.3390/v16020184.

59. Shrestha, L. B. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission / L. B. Shrestha, C. Foster, W. Rawlinson [et al.]. // *Reviews in Medical Virology*. – 2022. – Vol. 32 – N 5 – P. e2381. DOI: 10.1002/rmv.2381.

60. Kimura, I. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariants, including BA.4 and BA.5 / I. Kimura, D. Yamasoba, T. Tamura [et al.]. // *Cell*. – 2022. – Vol. 185 – N 21 – P. 3992–4007.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2022.09.018.

61. Parums, D. V. Editorial: A Rapid Global Increase in COVID-19 is Due to the Emergence of the EG.5 (Eris) Subvariant of Omicron SARS-CoV-2: [сайт]. – 2023. – URL: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/942244> (дата обращения: 22.05.2024).

62. World Health Organization. Clinical management of COVID-19: living guideline, June 2025: [сайт]. – 2025. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> (дата обращения: 01.07.2025).

63. Philippine Society for Microbiology and Infectious Diseases. Philippine

COVID-19 Living Recommendations as of January 10, 2022: [сайт] – 2022. – URL: <https://www.psmid.org/philippine-covid-19-living-recommendations/> (дата обращения: 04.02.2022).

64. World Health Organization. Living guidance for clinical management of COVID-19, 23 November 2021: [сайт] – 2021. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2> (дата обращения: 04.02.2022).

65. Wang, D. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China / D. Wang, Y. Yin, C. Hu [et al.]. // *Critical Care*. – 2020. – Vol. 24 – N 1 – P. 188. DOI: 10.1186/s13054-020-02895-6.

66. Wang, D. Clinical course and outcome of novel coronavirus COVID-19 infection in 107 patients discharged from the Wuhan hospital [Preprint] / D. Wang, Y. Yin, C. Hu [et al.]. // *Research Square*. – 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-16485/v1.

67. Menni, C. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study / C. Menni, A. M. Valdes, L. Polidori [et al.]. // *The Lancet*. – 2022. – Vol. 399 – N 10335 – P. 1618–1624. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00327-0.

68. Wang, D. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China / D. Wang, Y. Yin, C. Hu [et al.]. // *Critical Care*. – 2020. – Vol. 24 – N 1 – P. 188. DOI: 10.1186/s13054-020-02895-6.

69. Garibaldi, B. T. Patient Trajectories Among Persons Hospitalized for COVID-19 : A Cohort Study / B. T. Garibaldi, J. Fiksel, J. Muschelli [et al.]. // *Annals of Internal Medicine*. – 2021. – Vol. 174 – N 1. – P. 33–41. – DOI: 10.7326/M20-3905. – Epub 2020 Sep 22. – Erratum in: *Annals of Internal Medicine*. – 2021. – Vol. 174 – N 1 – P. 144. DOI: 10.7326/M20-3905.

70. Long-lasting consequences of coronavirus disease 19 pneumonia: a systematic review / A. A. Smirnova [et al.]. // *Minerva Medica*. – 2022. – Vol. 113 – N 1 – P. 1–10.

DOI: 10.23736/s0026-4806.21.07594-1.

71. Pedraza, L. Long-term clinical, nutritional, and functional outcomes of COVID-19 patients after hospital discharge / L. Pedraza, O. Laosa, R. Segovia-Moreno [et al.]. // Deleted Journal. – 2024. – Vol. 5 – N 2 – P. e97. DOI: 10.1002/rco2.97.

72. Falzone, L. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review) / L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis [et al.]. // International Journal of Molecular Medicine. – 2021. – Vol. 47 – N 6 – P. 100. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4933.

73. Huang, Y. COVID-19 Diagnostic Methods and Detection Techniques / Y. Huang, B. Bernstein, X. L. Temirovna // Elsevier eBooks. – 2023. – P. 17–32. DOI: 10.1016/B978-0-12-822548-6.00080-7.

74. Goudouris, E. Laboratory diagnosis of COVID-19 / E. Goudouris // Jornal de Pediatria. – 2021. – Vol. 97 – N 1 – P. 7–12. DOI: 10.1016/j.jped.2020.08.001.

75. Falzone, L. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review) / L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis [et al.] // International Journal of Molecular Medicine. – 2021. – Vol. 47 – N 6 – P. 100. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4933.

76. S, A. Comprehensive Review of COVID-19: Symptoms, Diagnosis, and Management / A. S, D. Reddy, A. N // Austin Journal of Autism & Related Disabilities. – 2024. – Vol. 10 – N 1 – P. 1069. DOI: 10.26420/austinjautismrelatdisabil.2024.1069.

77. Российская Федерация. Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.3597–20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» : [сайт] – 2020. – URL: <http://publication.pravo.gov.ru> (дата обращения: 18.08.2025).

78. Li, D. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment / D. Li, G. D. Sempowski, K. O. Saunders [et al.]. // Annual Review of Medicine. – 2022. – Vol. 73 – P. 1–16. DOI: 10.1146/annurev-med-042420-113838.

79. Пылаева С.К. Нейтрализующие и ненейтрализующие антитела к SARS-CoV-2: роль при инфекции и в эволюции антигенной структуры / Пылаева С.К., Синюгина А.А., Козловская Л.И. [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2024. – Т. 23. – № 6. – С. 169-176. DOI: 10.31631/2073-3046-2024-23-6-169-176

80. Пылаева С.К. Формирование и спектр нейтрализующей активности

антител у переболевших COVID-19 во время пандемии / Пылаева С.К., Артамонова Е.А., Козловская Л.И. [и др.]. // COVID-19: опыт российской медицины: в 4 томах / гл. ред. В. И. Стародубов. – М.: Изд-во ООО «ГРУППА РЕМЕДИУМ», 2025. – Т. 1: Общие данные о COVID-19 / под ред. В.Г. Акимкина, С.И. Колесникова. – С. 340-355. – ISBN 978-5-906499-85-1.

81. Li, C. J. SARS-CoV-2 spike S2-specific neutralizing antibodies / C. J. Li, S. C. Chang // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12 – N 2 – P. 2220582. DOI: 10.1080/22221751.2023.2220582.

82. Lampasona, V. Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study / V. Lampasona, M. Secchi, M. Scavini [et al.]. // *Diabetologia*. – 2020. – Vol. 63 – N 12 – P. 2548–2558. DOI: 10.1007/s00125-020-05283-3.

83. Feng, S. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection / S. Feng, D. J. Phillips, T. White [et al.]. // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27 – N 11 – P. 2032–2040. DOI: 10.1038/s41591-021-01577-2.

84. Yang, Y. Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection / Y. Yang, M. Yang, Y. Peng [et al.]. // *Nature Microbiology*. – 2022. – Vol. 7 – P. 423–433. DOI: 10.1038/s41564-021-01051-2.

85. Khoury, D. S. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection / D. S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi [et al.]. // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27 – N 7 – P. 1205–1211. DOI: 10.1038/s41591-021-01377-8.

86. Платонова, Т. А. Прогностические критерии развития тяжелых клинических форм COVID-19 у работников медицинской организации / Т. А. Платонова, Т. А. Семененко, А. А. Голубкова [и др.]. // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. – 2022. – Т. 11. – N 4. – С. 19–29. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-4-19-29.

87. Игнатъев, Г. М. Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 у пациентов с новой коронавирусной инфекцией / Г. М. Игнатъев, Л. И. Козловская, К. М.

Мефед [и др.]. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2022. – Т. 11 – N 1. – С. 21–27. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-1-21-27.

88. Wen, J. Antibody-dependent enhancement of coronavirus / J. Wen, Y. Cheng, R. Ling [et al.]. // International Journal of Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 100 – P. 483–489. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.015.

89. Pollán, M. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study / M. Pollán, B. Pérez-Gómez, R. Pastor-Barriuso [et al.]. // The Lancet. – 2020. – Vol. 396 – N 10250 – P. 535–544. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31483-5.

90. George TP. SARS-CoV-2 seroprevalence in Spain. / George TP. // Lancet. – 2020. – Vol. 396 – N 10261– P. 1484. DOI:10.1016/S0140-6736(20)32273-X.

91. Dong, X. Eleven faces of coronavirus disease 2019 / X. Dong, Y. Y. Cao, X. X. Lu [et al.]. // Allergy. – 2020. – Vol. 75 – N 7 – P. 1699–1709. DOI: 10.1111/all.14289.

92. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи взрослому населению при заболевании, вызванном новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) : [сайт] – 2020. – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202003200017> (дата обращения: 18.08.2025).

93. Москва. Департамент здравоохранения. О совершенствовании оказания медицинской помощи пациентам с новой коронавирусной инфекцией COVID-19: [сайт] – 2020. – URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/document.html?docId=12345> (дата обращения: 18.08.2025).

94. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»: [сайт] – 2021. – URL: <https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/055/735/original/BMP-11.pdf> (дата обращения: 18.08.2025).

95. Plume, J. Early and strong antibody responses to SARS-CoV-2 predict disease severity in COVID-19 patients / J. Plume, A. Galvanovskis, S. Šmite [et al.]. // Journal of Translational Medicine. – 2022. – Vol. 20 – N 1 – P. 176 DOI: 10.1186/s12967-022-

03382-y.

96. Feng, S. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection / S. Feng, D. J. Phillips, T. White [et al.]. // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27 – N 11 – P. 2032–2040. DOI: 10.1038/s41591-021-01577-2.

97. Miller, E. Predicting the efficacy of new coronavirus vaccines – Are neutralising antibodies enough? / E. Miller // *eBioMedicine*. – 2022. – Vol. 79 – P. 104034. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104034.

98. Mlcochova, P. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion / P. Mlcochova, S. A. Kemp, M. S. Dhar [et al.]. // *Nature*. – 2021. – Vol. 599 – P. 114–119. DOI: 10.1038/s41586-021-03944-y.

99. Planas, D. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization / D. Planas, D. Veyer, A. Baidaliuk [et al.]. // *Nature*. – 2021. – Vol. 596 – N 7871 – P. 276–280. DOI: 10.1038/s41586-021-03777-9.

100. Greaney, A. J. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies / A. J. Greaney, A. N. Loes, K. H. D. Crawford [et al.]. // *Cell Host & Microbe*. – 2021. – Vol. 29 – N 3 – P. 463–476.e6. DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.003.

101. Dong, J. Genetic and structural basis for SARS-CoV-2 variant neutralization by a two-antibody cocktail / J. Dong, S. J. Zost, A. J. Greaney [et al.]. // *Nature Microbiology*. – 2021. – Vol. 6 – N 10 – P. 1233–1244. DOI: 10.1038/s41564-021-00972-2.

102. Liu, H. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2 / H. Liu, I. A. Wilson // *Immunological Reviews*. – 2022. – Vol. 310 – N 1 – P. 76–92. DOI: 10.1111/imr.13084.

103. Chen, Y. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses / Y. Chen, X. Zhao, H. Zhou [et al.]. // *Nature Reviews Immunology*. – 2023. – Vol. 23 – N 3 – P. 189–199. DOI: 10.1038/s41577-022-00810-2.

104. NHS England. COVID-19 Daily: [сайт] – 2020. – URL: <https://web.archive.org/web/20200501094237/https://www.england.nhs.uk/statistics/statistical-work-areas/covid-19-daily-deaths/> (дата обращения: 01.07.2025).

105. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции

(COVID-19): [сайт] – 2022. – URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/041/original/BMP_COVID-19_V15.pdf (дата обращения: 18.08.2025).

106. Арутюнов, Г. П. Международный регистр «Анализ динамики коморбидных заболеваний у пациентов, перенесших инфицирование SARS-CoV-2 (АКТИВ SARS-COV-2)»: анализ 1000 пациентов / Г. П. Арутюнов, Е. И. Тарловская, А. Г. Арутюнов [и др.]. // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Т. 25. – N 11. – С. 98–107. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-4165.

107. Горошко, Н. В. Основные причины избыточной смертности населения в России в условиях пандемии COVID-19 / Н. В. Горошко, С. В. Пацала // Социальные аспекты здоровья населения. – 2021. – Т. 67 – N 6 – С. 1–15. DOI: 10.21045/2071-5021-2021-67-6-1.

108. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health conditions among patients with coronavirus disease 2019—United States, February 12–March 28, 2020 // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2020. – Vol. 69 – N 13 – P. 382–386. DOI: 10.15585/mmwr.mm6913e2.

109. Cunningham, J. W. Clinical outcomes in young US adults hospitalized with COVID-19 / J. W. Cunningham, M. Vaduganathan, B. L. Claggett [et al.]. // JAMA Internal Medicine. – 2021. – Vol. 181 – N 3 – P. 379–381. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.5313.

110. Dai, M. Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-CoV-2: a multicenter study during the COVID-19 outbreak / M. Dai, D. Liu, M. Liu [et al.]. // Cancer Discovery. – 2020. – Vol. 10 – N 6 – P. 783–791. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0422.

111. Harrison, S. L. Comorbidities associated with mortality in 31,461 adults with COVID-19 in the United States: a federated electronic medical record analysis / S. L. Harrison, E. Fazio-Eynullayeva, D. A. Lane [et al.]. // PLoS Medicine. – 2020. – Vol. 17 – N 9 – P. e1003321. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003321.

112. Губенко, Н. С. Связь показателей общего анализа крови с тяжестью течения COVID-19 у госпитализированных пациентов / Н. С. Губенко, А. А. Будко,

А. Г. Плисюк, Я. А. Орлова // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2021. – Т. 2 – N 1 – С. 90–101. DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-1-90-101.

113. Kim, D. H. Age-adjusted Charlson comorbidity index score is the best predictor for severe clinical outcome in the hospitalized patients with COVID-19 infection / D. H. Kim, H. C. Park, A. Cho [et al.]. // *Medicine*. – 2021. – Vol. 100 – N 18 – P. e25900. DOI: 10.1097/MD.00000000000025900.

114. Арутюнов, Г. П. Регистр «Анализ динамики коморбидных заболеваний у пациентов, перенесших инфицирование SARS-CoV-2» (АКТИВ). Оценка влияния комбинаций исходных сопутствующих заболеваний у пациентов с COVID-19 на прогноз / Г. П. Арутюнов, Е. И. Тарловская, А. Г. Арутюнов [и др.]. // *Терапевтический архив*. – 2022. – Т. 94. – N 1 – С. 32–47. DOI: 10.26442/00403660.2022.01.201320.

115. Kiss, S. Early changes in laboratory parameters are predictors of mortality and ICU admission in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis / S. Kiss, N. Gede, P. Hegyi [et al.]. // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2021. – Vol. 210 – N 1 – P. 33–47. DOI: 10.1007/s00430-020-00696-w.

116. Дрягина, Н. В. Прогностическая значимость лабораторных показателей в определении тяжести течения и исхода новой коронавирусной инфекции (COVID-19) / Н. В. Дрягина, Н. А. Лестева, А. А. Денисова [и др.]. // *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. – 2023. – Т. 20 – N 2. – С. 54–65. DOI: 10.24884/2078-5658-2022-20-2-54-65.

117. Hosseninia, S. Aggregate index of systemic inflammation (AISI) in admission as a reliable predictor of mortality in COPD patients with COVID-19 / S. Hosseninia, H. Ghobadi, K. Garjani [et al.]. // *BMC Pulmonary Medicine*. – 2023. – Vol. 23 – N 1. – P. 107. DOI: 10.1186/s12890-023-02397-5.

118. Fois, A. G. The systemic inflammation index on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients / A. G. Fois, P. Paliogiannis, V. Scano [et al.]. // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25 – N 23 – P. 5725. DOI: 10.3390/molecules25235725.

119. Fouad, S. H. Comparison of hemoglobin level and neutrophil to lymphocyte ratio as prognostic markers in patients with COVID-19 / S. H. Fouad, M. F. Allam, S. I.

Taha [et al.]. // Journal of International Medical Research. – 2021. – Vol. 49 – N 7 – P. 3000605211030124. DOI: 10.1177/03000605211030124.

120. Ахкубекова, З. А. Анализ госпитальной смертности от COVID-19 среди жителей Кабардино-Балкарской республики / З. А. Ахкубекова, Р. М. Арамисова, Л. А. Тиммеева [и др.]. // Трудный пациент. – 2021. – Т. 19. – N 6. – С. 18–21. DOI: 10.224412/2074-1005-2021-6-18-21.

121. Визель, А. А. Оценка прогностической значимости отдельных показателей у пациентов с COVID-19 на различных этапах наблюдения / А. А. Визель, А. Б. Казанская, Е. В. Короткова [и др.]. // Практическая пульмонология. – 2021. – N 2. – С. 29–41. DOI: 10.24412/2409-6636-2021-12689.

122. 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 [и др.]. // Инфекционные болезни. – 2021. – Т. 19. – N 2. – С. 5–15. DOI: 10.20953/1729-9225-2021-2-5-15.

123. Маржохова, А. Р. Характеристика больных с тяжелым и крайне тяжелым течением коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, по данным реанимационного отделения госпиталя № 1 г. Нальчика / А. Р. Маржохова, А. А. Плоскирева, З. Ф. Хараева [и др.]. // Инфекционные болезни. – 2021. – Т. 19. – N 3. – С. 37–42. DOI: 10.20953/1729-9225-2021-3-37-42.

124. Хавкина, Д. А. Лабораторные особенности поражения сердечно-сосудистой системы при COVID-19 и других острых респираторных вирусных инфекциях / Д. А. Хавкина, П. В. Чухляев, Т. А. Руженцова // Академия медицины и спорта. – 2021. – Т. 2. – N 3. – С. 5–7. DOI: 10.15829/2712-7567-2021-32.

125. Шихнебиев, Д. А. Клинико-лабораторные особенности COVID-19 / Д. А. Шихнебиев, Р. М. Рагимов, З. Г. Тагирова [и др.]. // Инфекционные болезни. – 2021. – Т. 19. – N 4 – С. 23–28. DOI: 10.20953/1729-9225-2021-4-23-28.

126. Laguna-Goya, R. IL-6-based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19 / R. Laguna-Goya, A. Utrero-Rico, P. Talayero [et al.]. // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2020. – Vol. 146 – N 4 – P. 799–807.e9. DOI:

10.1016/j.jaci.2020.07.009.

127. Zhou, F. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395 – N 10229 – P. 1054–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

128. Aloisio, E. A comprehensive appraisal of laboratory biochemistry tests as major predictors of COVID-19 severity / E. Aloisio, M. Chibireva, L. Serafini [et al.]. // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2020. – Vol. 144 – N 12 – P. 1457–1464. DOI: 10.5858/arpa.2020-0389-SA.

129. Bats, M. L. Covichem: a biochemical severity risk score of COVID-19 upon hospital admission / M. L. Bats, B. Rucheton, T. Fleur [et al.]. // *PLoS ONE*. – 2021. – Vol. 16 – N 5 – P. e0250956. DOI: 10.1371/journal.pone.0250956.

130. Bennouar, S. Usefulness of biological markers in the early prediction of coronavirus disease-2019 severity / S. Bennouar, A. Bachir Cherif, A. Kessira [et al.]. // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2020. – Vol. 80 – N 8 – P. 611–618. DOI: 10.1080/00365513.2020.1821396.

131. Shi, J. Lactate dehydrogenase and susceptibility to deterioration of mild COVID-19 patients: a multicenter nested case-control study / J. Shi, Y. Li, X. Zhou [et al.]. // *BMC Medicine*. – 2020. – Vol. 18 – N 1 – P. 168. DOI: 10.1186/s12916-020-01633-7.

132. Poggiali, E. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in COVID-19 patients / E. Poggiali, D. Zaino, P. Immovilli [et al.]. // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 509 – P. 135–138. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.012.

133. Kim, C. W. COVID-19, cardiovascular diseases and cardiac troponins / C. W. Kim, W. S. Aronow // *Future Cardiology*. – 2021. DOI: 10.2217/fca-2021-0054.

134. Bezerra, R. Outcomes of critically ill patients with acute kidney injury in COVID-19 infection: an observational study / R. Bezerra, F. Teles, P. B. Mendonça [et al.]. // *Renal Failure*. – 2021. – Vol. 43 – N 1 – P. 911–918. DOI: 10.1080/0886022X.2021.1933530.

135. Chudasama, Y. V. Patterns of multimorbidity and risk of severe SARS-CoV-

2 infection: an observational study in the U.K. / Y. V. Chudasama, F. Zaccardi, C. L. Gillies [et al.]. // BMC Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 21 – N 1 – P. 908. DOI: 10.1186/s12879-021-06600-y.

136. Zhang, Y. Characteristics and in-hospital outcomes of COVID-19 patients with acute or subacute liver failure / Y. Zhang, X. Guo, Z. Ma [et al.]. // Digestive and Liver Disease. – 2021. – Vol. 53 – N 9 – P. 1069–1070. DOI: 10.1016/j.dld.2021.05.027.

137. Ihlow, J. COVID-19: a fatal case of acute liver failure associated with SARS-CoV-2 infection in pre-existing liver cirrhosis / J. Ihlow, A. Seelhoff, V. M. Corman [et al.]. // BMC Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 21 – N 1 – P. 901. DOI: 10.1186/s12879-021-06605-7.

138. Mokhtari, A. K. Rhabdomyolysis in severe COVID-19: male sex, high body mass index, and prone positioning confer high risk / A. K. Mokhtari, L. R. Maurer, M. A. Christensen [et al.]. // Journal of Surgical Research. – 2021. – Vol. 266 – P. 35–43. DOI: 10.1016/j.jss.2021.03.049.

139. Hosseinzadeh-Hesari, M. Evaluating the Economic Impact of Airborne Infectious Diseases on the Health System: A Cross-sectional Study Utilizing Disability-adjusted Life Years and Lost Productivity / M. Hosseinzadeh-Hesari, M. Miri // International Journal of Environmental Health Engineering. – 2025. – Vol. 14 – N 3 – P. 12. DOI: 10.4103/ijehe.ijehe_32_24.

140. Roomi, M. W. The Covid Crisis: Return of Fear and Uncertainty / M. W. Roomi // Journal of Otolaryngology Research & Reports. – 2025. – Vol. 4 – N 3 – P. 1–24. DOI: 10.47363/jolrr/2025(4)133.

141. Kumar, A. COVID-19: Global Perspectives on a Pandemic's Evolution, Management, and Lessons Learned / A. Kumar, P. M. Krishna, D. Gupta // International Journal of Science and Advanced Technology. – 2025. – Vol. 16 – N 2 – P. 6205. DOI: 10.71097/ijst.v16.i2.6205.

142. Пылаева С.К. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ложноположительным результатом определения IgM к SARS-CoV-2 / Пылаева С.К., Сайфуллин Р.Ф., Карань Л.С.[и др.]. // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2024. – Т. 4. – С. 14-21. DOI: 10.14427/jipai.2024.4.14

143. Пылаева С.К. Спектр вируснейтрализующих антител у пациентов с COVID-19, заболевших во время циркуляции различных вариантов SARS-CoV-2 / С. К. Пылаева, Л. И. Козловская, А. А. Еровиченков [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2024. – Т. 23. – N 5 – С. 63–72. DOI: 10.31631/2073-3046-2024-23-5-63-72.

144. Сайфуллин Р. Ф. Определение активности общей лактатдегидрогеназы и ее изотипов для прогнозирования тяжести течения и диагностики органических поражений при COVID-19 / Сайфуллин Р. Ф., Пылаева С.К. , Фролова Н. Ф. [и др.]. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 12. – N 4. – С. 39–47. DOI: 10.33029/2305-3496-2023-12-4-39-47.

145. Р 4.2.3676-20. 4.2. Биологические и микробиологические факторы. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности : руководство : утвержден Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ А. Ю. Поповой от 18 декабря 2020 г.: дата введения 2021-07-01/ разработан «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора». – Москва, 2020. – 99 с.

146. Nucetelli, M. SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? / M. Nucetelli, M. Pieri, S. Grelli [et al.]. // Cell Death Discovery. – 2020. – Vol. 6 – P. 38. DOI: 10.1038/s41420-020-0275-2.

147. Chan, J. F.-W. Virological features and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 / J. F.-W. Chan, B. Hu, Y. Chai [et al.]. // Cell Reports Medicine. – 2022. – Vol. 3 – N 9 – P. 100743. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100743.

148. Liu, W. Genetic predisposition in patients with severe COVID-19 / W. Liu, D.-L. Liu, J. Yan, X. Lu, Q. Wang // Chinese Journal of Medical Genetics. – 2022. – Vol. 44 – N 8 – P. 672–681. DOI: 10.16288/j.yczz.22-058.

149. Fatmawati, F. Risk factors associated with the severity of COVID-19 / F. Fatmawati, S. Mulyanti // Malaysian Journal of Medical Sciences. – 2023. – Vol. 30 – N 3 – P. 84–92. DOI: 10.21315/mjms2023.30.3.7.

150. Safwat, M.-A. COVID-19; immunology, pathology, severity and immunosuppressants / M.-A. Safwat, A. R. Abdul-Rahman, H. F. Forsan [et al.]. // Alexandria International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences. – 2021. – Vol. 1 – N 1 – P. 1–12. DOI: 10.21608/AIJPMS.2021.50103.1005.

151. El-Ghitany, E. M. Determining the SARS-CoV-2 Anti-Spike Cutoff Level Denoting Neutralizing Activity Using Two Commercial Kits / E. M. El-Ghitany, M. H. Hashish, A. G. Farghaly, E. A. Omran // Vaccines. – 2022. – Vol. 10 – N 11 – P. 1952. DOI: 10.3390/vaccines10111952.

152. Hoher, B. Outliers Matter—Correlation between S1 IgG SARS-CoV-2 Antibodies and Neutralizing SARS-CoV-2 Antibodies / B. Hoher, A. Schönbrunn, X. Chen [et al.]. // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10 – N 10 – P. 2067. DOI: 10.3390/microorganisms10102067.

153. Chen, X. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19 / X. Chen, Z. Pan, S. Yue [et al.]. // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2020. – Vol. 5 – N 1 – P. 180. DOI: 10.1038/s41392-020-00301-9.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Клиническое наблюдение №1

Пациентка К., 42 года, медицинский работник.

При плановом скрининге в августе 2020 г. в сыворотке крови методом ИХЛА (лот № 1) выявлены IgM к SARS-CoV-2 (COI = 2,34) при отсутствии IgG. Пациентка не отмечала симптомов ОРВИ в предшествующие 2 недели; результат ПЦР назофарингеальных мазков (еженедельный скрининг) был отрицательным. Несмотря на отсутствие клинико-лабораторных признаков инфекции, пациентка была отстранена от работы и направлена на дообследование в соответствии с действовавшими на тот момент нормативными актами.

Аутоиммунные заболевания у пациентки отсутствовали.

При повторном исследовании сыворотки крови через 45 дней: IgM к SARS-CoV-2 (ИХЛА, лот № 1): COI = 0,67 (отрицательно); IgG к SARS-CoV-2: отрицательно;

IgM к SARS-CoV-2 в альтернативной тест-системе (ИХЛА, лот № 2): положительно (COI = 2,28); ИХА: отрицательно; ИФА 1: сомнительно (оптическая плотность/COI 0,9–1,1); ИФА №3: отрицательно. Исследование IgG к SARS-CoV-2 во всех тест-системах дало отрицательный результат. Вируснейтрализующие антитела (ВНА) к SARS-CoV-2 отсутствовали (<1:8). Маркеры аутоиммунных заболеваний отсутствовали. Таким образом, у пациентки был выявлен ложноположительный результат определения IgM к SARS-CoV-2 на фоне аутоиммунной патологии щитовидной железы без признаков активной инфекции COVID-19. Отсутствие сероконверсии IgG через 45 дней явилось ключевым критерием верификации диагноза и основанием для возвращения пациентки на рабочее место.

Клиническое наблюдение №2

Пациент А., 61 год, госпитализирован в июле 2021 г. с подтвержденным диагнозом «COVID-19, среднетяжелая форма», осложненным внебольничной полисегментарной двусторонней вирусной пневмонией (J12.8). Идентифицирован

вариант Дельта (B.1.617.2). В анамнезе: гипертоническая болезнь. Не вакцинирован против COVID-19. На 14-й день болезни в сыворотке крови определены: IgG к SARS-CoV-2 (ИХЛА): 80,94 Ед/л; титр ВНА к штамму Дельта (4724d): 1:256; титр ВНА к штамму B.1.1: 1:256; титр ВНА к Омикрон BA.1: 1:32; титр ВНА к ХВВ.1.9: 1:8; титр ВНА к изолятам 12454 и 12751: не выявлен ($< 1:8$). Через 2 года (в 2023 г.) пациент перенес повторное заболевание COVID-19 (подтвержденный ПЦР) в легкой форме, без госпитализации. Так, предположительно, у пациента, переболевшего вариантом Дельта, сформировались ВНА, обеспечивающие частичную перекрестную защиту против отдаленных подвариантов Омикрона, что клинически проявилось легким течением повторной инфекции.

Клиническое наблюдение №3

Пациент Л., 69 лет, госпитализирован в мае 2021 г. с диагнозом: U07.1 — «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19, вирус идентифицирован» (подтверждён лабораторным тестированием независимо от тяжести клинических признаков или симптомов); J12.8 Внебольничная полисегментарная двусторонняя вирусная пневмония, тяжелое течение». Из анамнеза: гипертоническая болезнь. Не вакцинирован против COVID-19.

На 10-й день болезни в сыворотке крови определены: IgG к SARS-CoV-2 (ИХЛА): 139 Ед/л; титр ВНА к прототипному штамму B.1.1: $< 1:8$; титр ВНА к варианту Дельта (B.1.617.2): $< 1:8$; титр ВНА к варианту Омикрон BA.1: $< 1:8$.

Пациент находился на лечении в отделении реанимации в течение 22 дней (общий срок госпитализации составил 33 дня).

Таким образом, у пациента зафиксирован высокий уровень IgG к вирусу SARS-CoV-2 по данным стандартного теста, однако он не сопровождался наличием функционально активных антител. Данный случай демонстрирует, что пациент, несмотря на формально высокий титр IgG, оставался серологически уязвимым к вирусу SARS-CoV-2. Оценка защищенности только по данным количественных тестов без учета нейтрализующей активности антител может быть ошибочной и создавать ложное чувство безопасности.

Клиническое наблюдение №4

Пациент С., 68лет. Госпитализирован в сентябре 2021 г. на 6-й день болезни с диагнозом «COVID-19, среднетяжелая форма». Сопутствующие заболевания: ишемическая болезнь сердца, хроническая болезнь почек 3А стадии. При поступлении: общая ЛДГ: 465 Ед/л ($>1,5$ нормы); изоферментный спектр ЛДГ: ЛДГ1 – 15,1%, ЛДГ2 – 26,3%, ЛДГ3 – 27,8%, ЛДГ4 – 16,2%, ЛДГ5 – 14,6% (снижение ЛДГ1/ЛДГ2, повышение ЛДГ3/ЛДГ4/ЛДГ5); NT-proBNP: 1280 нг/л; СКФ: 52 мл/мин/1,73 м² (хроническая болезнь почек 3А стадии, умеренное снижение функции почек). На 10-й день болезни – ухудшение, перевод в ОРИТ с явлениями острого респираторного дистресс-синдрома и острой сердечной недостаточности. Проводилась искусственная вентиляция легких. Общий койко-день – 24, в ОРИТ – 9 дней. Выписан с улучшением. Повышение общей ЛДГ в 1,5 раза в сочетании с характерным сдвигом изоферментного спектра на фоне повышенного NT-proBNP позволили уже при поступлении идентифицировать пациента как крайне высокого риска тяжелого течения и своевременно начать интенсивную терапию.