

ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ COVID-19

Методические рекомендации № 35

УДК 618.5-07
ББК 53.45

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение города Москвы «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы»

Авторы:

А. Н. Цибин, М. Ф. Латыпова, О. И. Иванушкина, С. М. Цибина, А. Г. Комаров

Рецензенты:

Х. С. Саядян, д. м. н., профессор, ведущий научный консультант по клинической фармакологии и иммунологии ГБУЗ «ЦПРИН ДЗМ»; Т. В. Морозова, д. м. н., профессор, заведующая учебной частью кафедры медицины труда, авиационной, космической и водолазной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); С. Н. Щербо, д. б. н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России.

Временное руководство по лабораторной диагностике состояния иммунитета при COVID-19: методические рекомендации / составители: А. Н. Цибин, М. Ф. Латыпова [и др.]. – М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2021. – 178 с.

Предназначение:

Данные методические рекомендации предназначены в помощь организаторам здравоохранения, главным медицинским сестрам, процедурным медицинским сестрам, заведующим лабораториями, лабораторным специалистам с высшим медицинским/биологическим и средним медицинским образованием, медицинским специалистам смежных специальностей, принимающим участие в лечении больных новой коронавирусной инфекцией.

В настоящих методических рекомендациях изложен литературный обзор, включающий в себя текущие знания и основные выводы, а также теоретический и методологический вклад в диагностику состояния иммунитета во время и после воздействия нового коронавируса, порядок лабораторной диагностики состояния иммунитета при различных формах тяжести COVID-19 с указанием прогностических маркеров, уровень которых подлежит мониторингу, с целью предупреждения тяжелых форм заболеваний и смертности. Представлена стратегия серологического контроля на SARS-CoV-2 для выявления людей, потенциально защищенных от заражения, для осуществления эпидемиологического контроля за COVID-19 на территории Российской Федерации.

Описан комплекс мероприятий, направленных на проведение международного, внешнего и внутреннего контроля качества серологических лабораторных исследований.

На основе требований санитарного законодательства РФ подробно сформулированы нормы, обязательные к соблюдению, для обеспечения биологической безопасности пациентов и медицинского персонала при осуществлении лабораторного процесса. Изложены правила: взятия биологического материала, маркировки проб и оформления сопроводительных направлений на анализы, упаковки биоматериала и режима хранения, сроков и условий транспортировки образцов к месту проведения исследований, приема проб при доставке в лабораторию и бракеражу.

Рекомендации, представленные в документе, составлены на основе действующих нормативно-правовых документов Министерства здравоохранения РФ, органов Роспотребнадзора, правительства Российской Федерации, правительства Москвы, ДЗМ, в значительной степени базируются на материалах по диагностике, профилактике и лечению COVID-19, опубликованных специалистами ВОЗ, китайского, американского, английского и европейского центров по контролю за заболеваемостью, анализе отечественных и зарубежных научных публикаций.

Представленные методические рекомендации распространяются в качестве временного руководства по лабораторной диагностике состояния иммунитета при COVID-19 для медицинских организаций РФ и медицинских организаций ДЗМ.

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения. За представленные данные в методических рекомендациях авторы несут персональную ответственность.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Нормативные ссылки | 7 |
| Определения..... | 9 |
| Список сокращений | 17 |
| Введение | 19 |
| Глава 1. Литературный обзор | 20 |
| 1.1. Этиология..... | 20 |
| 1.2. Пути передачи SARS-CoV-2..... | 20 |
| 1.3. Периоды инкубации и развития симптомов COVID-19..... | 21 |
| 1.4. Клинические проявления COVID-19 | 21 |
| 1.5. Постковидные синдромы | 22 |
| 1.5.1. Фенотип COVID-19 | 22 |
| 1.5.2. Длительный COVID-19 | 23 |
| 1.5.3. Мультисистемный воспалительный синдром..... | 24 |
| 1.5.4. Индукция аутоиммунного заболевания | 24 |
| 1.6. Инфицирование..... | 26 |
| 1.7. Виды иммунитета | 26 |
| 1.7.1. Врожденный иммунный ответ..... | 27 |
| 1.7.2. Перекрестно-реактивный/тренированный Т-клеточный иммунитет..... | 29 |
| 1.7.3. Адаптивный иммунитет..... | 31 |
| 1.7.3.1. Т-клеточный иммунитет..... | 34 |
| 1.7.3.2. Гуморальный иммунитет..... | 35 |
| 1.8. Иммунопатогенез COVID-19..... | 37 |
| 1.8.1. Иммунопатология COVID-19 | 37 |
| 1.8.2. Механизмы иммунопатологии, вызванной SARS-CoV-2 | 40 |
| 1.8.2.1. Механизм эндотелиальной дисфункции. Иммунотромбоз..... | 40 |
| 1.8.2.2. Механизм повышенного истощения уровня и дисфункции лимфоцитов..... | 46 |
| 1.8.2.3. Механизм антителозависимого усиления (ADE)..... | 47 |
| 1.8.3. Клинические последствия иммунопатологии, вызванной SARS-CoV-2 | 49 |
| 1.9. Поствакцинальный протективный иммунитет..... | 51 |
| 1.10. Новые варианты SARS-CoV-2 | 55 |
| 1.11. Коллективный иммунитет..... | 56 |
| 1.12. Возраст как фактор риска тяжелого COVID-19..... | 59 |
| 1.13. Пол, как фактор риска тяжелого COVID-19 | 60 |
| 1.14. Группа крови как фактор риска тяжелого COVID-19 | 61 |
| 1.15. Сопутствующие заболевания как фактор риска тяжелого COVID-19 | 61 |
| 1.16. Реинфекция (повторное заражение) SARS-CoV-2 | 61 |

| | |
|---|-----------|
| Глава 2. Организация проведения лабораторных исследований состояния иммунитета населения на SARS-CoV-2 в медицинских организациях | 62 |
| 2.1. Общие нормативные требования | 62 |
| 2.2. Общие требования к специалистам | 63 |
| 2.3. Общие санитарные требования к помещениям лабораторий | 65 |
| 2.4. Общие требования к порядку использования средств индивидуальной защиты..... | 68 |
| 2.5. Общие требования к биологическому материалу для серологических (иммунологических) исследований на SARS-CoV-2..... | 70 |
| | |
| Глава 3. Лабораторная диагностика состояния иммунитета при COVID-19 | 75 |
| 3.1. Общие требования | 75 |
| 3.2. Требования к медицинским изделиям (МИ)..... | 77 |
| 3.3. Комплекс иммунодиагностики SARS-CoV-2..... | 77 |
| 3.4. Диагностика иммунологических прогностических маркеров воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга..... | 78 |
| 3.5. Методы исследования Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2..... | 80 |
| 3.5.1. Сложные платформы..... | 80 |
| 3.5.2. Более простая платформа | 82 |
| 3.5.3. ELISPOT | 83 |
| 3.5.4. Проточная цитометрия (FACS-анализ) | 85 |
| 3.5.5. T-Detect COVID | 89 |
| 3.6. Этиологическая лабораторная диагностика COVID-19 непрямыми методами | 90 |
| 3.6.1. Порядок выполнения | 90 |
| 3.6.2. Специфическая диагностика сывороточных антител IgM, IgA и IgG к SARS-CoV-2..... | 90 |
| 3.6.3. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 непрямыми (серологическими) методами..... | 91 |
| 3.6.4. Технологии определения антител для выявления вирусных белков SARS-CoV-2..... | 91 |
| 3.6.5. Тестовые платформы для диагностики антител к SARS-CoV-2: Point-of-Care (POC), ELISA/ИФА, CLIA/ИХЛА | 92 |
| 3.6.6. Схемы проведения тестовых платформ | 94 |
| 3.6.7. Кинетика гуморального ответа в диагностике COVID-19 | 100 |
| 3.7. Золотой стандарт для определения серопозитивности «Анализ нейтрализующей активности антител» | 100 |
| 3.7.1. Кинетика нейтрализующих антител | 103 |
| 3.8. Подход к созданию алгоритма лабораторного обследования на COVID-19 | 104 |
| 3.8.1. Характеристики теста для принятия решения о его использовании | 104 |
| 3.8.2. Стратегии тестирования на COVID-19 | 108 |
| 3.8.3. Тестирование на COVID-19 в условиях ограниченных ресурсов (в отдаленных районах)..... | 109 |
| 3.9. Контроль качества лабораторных исследований на COVID-19 | 110 |

Глава 4. Временные рекомендации по иммунодиагностике

| | |
|---|------------|
| COVID-19 для медицинских организаций | 114 |
| 4.1. Общие требования | 114 |
| 4.2. Учет динамики гуморального иммунитета..... | 115 |
| 4.3. Тесты на антитела | 115 |
| 4.4. Выявление связывающих и нейтрализующих антител..... | 116 |
| 4.5. Стратегии тестирования..... | 117 |
| 4.6. Стратегии для улучшения положительной прогностической ценности | 117 |
| 4.7. Эффективность алгоритмов последовательного тестирования..... | 117 |
| 4.8. Учет ограничений серологического исследования | 117 |
| 4.9. Учет требований к серологическому обследованию на COVID-19 | 118 |
| 4.10. Проведение серологических исследований для категорий пациентов..... | 119 |
| 4.11. Тактика серологической диагностики COVID-19 | 120 |
| 4.12. Серологическая диагностика пациентов с симптомами при подозрении на острый COVID-19 | 121 |
| 4.13. Серологическая оценка перенесенной ранее естественной инфекции SARS-CoV-2 и иммунного ответа на вакцину: у человека, никогда не вакцинированного, у вакцинированного человека | 121 |
| 4.14. Применение методов серологических исследований | 122 |
| 4.15. Ключевые маркеры для диагностики иммунитета при различном течении COVID-19 | 123 |
| 4.16. Диагностика коагулопатии при подтвержденном COVID-19 | 126 |
| Заключение | 127 |
| Литература..... | 129 |
| | |
| Приложение 1. Процедура тестирования с использованием в качестве метки фермента-катализатора (по приведенным инструкциям в наборах «Шэньчжэнь Майндрэй Био-Медикал Электроникс Ко., Лтд.», имеющих РУ на территории РФ) | 164 |
| | |
| Приложение 2. Аналитические и диагностические возможности высокопроизводительных иммунохимических тест-систем (ИХЛА/CLIA) для определения антител к SARS-CoV-2 («Шэньчжэнь Майндрэй Био-Медикал Электроникс Ко., Лтд.»; BioMérieux Vidas III («БиоМерье», «Марси-л'Этуаль», Франция; Roche Elecsys® Anti SARS-CoV-2 («Роше», Швейцария))..... | 172 |
| | |
| Приложение 3. Российские авторизованные/одобренные вакцины | 175 |

При разработке использованы действующие нормативные документы и акты Российской Федерации, правительства города Москвы:

1. ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
2. ГОСТ Р 53079.4-2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».
3. ГОСТ ISO 6710-2011 «Межгосударственный стандарт. Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний».
4. ГОСТ ISO 15189:2012 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности».
5. Федеральный закон от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».
6. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
7. Приказ МЗ РФ от 07.02.2000 №45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
8. Временные методические рекомендации МЗ РФ Версия 10 от 08.02.2021. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
9. Письмо Роспотребнадзора от 07.04.2020 № 02/6339-2020-32 «О направлении памятки по применению многоразовой защитной одежды при COVID-19».
10. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 28 января 2008 г. № 4).
11. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» (утверждены главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 28 ноября 2013 г. № 64).

12. СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами» (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.04.2003. №85).
13. СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» (утверждены и введены в действие Постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 28 августа 1995 г. № 14).
14. Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 13.11.2020 №35 «О внесении изменений в постановление главного государственного врача РФ от 22.05.2020 №15 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
15. Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 24.12.2020 №44 «Об утверждении санитарных правил СП 2.1.3678-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг».
16. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 №3).
17. Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 18.12.2020г. №928н «Об утверждении Правил по охране труда в медицинских организациях».
18. Методические рекомендации ДЗМ МР №28 от 04.07.2017г. «Организация работы пунктов приема биологического материала».
19. Методические рекомендации ДЗМ МР №89 от 21.07.2020 «Временное руководство по лабораторной диагностике COVID-19 в условиях пандемии».

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

- AID/аутоиммунные заболевания – широкая группа заболеваний, которые объединяет то, что иммунная система организма начинает атаковать его собственные клетки и ткани.
- APLS/антифосфолипидные синдромы – аутоиммунная патология, в основе которой лежит образование антител к фосфолипидам, являющимся главными липидными компонентами клеточных мембран.
- ASC-олигомеры – вещества, состоящие из молекул, которые содержат некоторое количество одного или более типов атомов или групп атомов (составных звеньев), соединенных повторяющимся образом друг с другом.
- CD4+ Т-клетки с фолликулярным помощником Т (TFH) – Т-фолликулярные хелперы указывают на созревание гуморального иммунного ответа и создание пула специфических В-клеток памяти.
- CRS/синдром высвобождения цитокинов – потенциально угрожающий жизни системный воспалительный ответ организма на определенные лекарственные препараты или инфекции.
- EBV/Эпштейна-Барра вирус – вид вирусов из подсемейства гамма-герпесвирусов семейства герпесвирусов.
- FCN1+/моноцитарная популяция макрофагов – клетки в организме животных и человека, способные к активному захвату и перевариванию бактерий, остатков погибших клеток и других чужеродных или токсичных для организма частиц.
- FcγR – рецепторы Fc, при помощи которых макрофаг связывает комплексы антиген – антитело и фагоцитирует их.
- GBS/синдром Гийена – Барре (СГБ, острый полирадикулоневрит) – острая аутоиммунная воспалительная полирадикулоневропатия, проявляющаяся вялыми парезами, нарушениями чувствительности, вегетативными расстройствами.
- G-CSF/фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов – полипептидный цитокин, относится к группе гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов вместе с интерлейкином 3 и интерлейкином 5.
- GM-CSF – гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор – гликопротеид, стимулирующий пролиферацию клеток, предшественников миелопоэза в костном мозге, их созревание и дифференцировку в клетки крови (нейтрофилов, макрофагов и эозинофилов).

- HLH/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз – группа врожденных и приобретенных заболеваний, возникающих вследствие нарушений регуляции иммунного ответа и характеризующихся гиперпродукцией гистиоцитов, а также цитотоксических Т-лимфоцитов.
- IL-1 β – цитокин, высвобождаемый во время пироптоза.
- IP-10/интерферон-индуцируемый (индуцибельный) белок-10 – особый вид белка, обладающего плейотропными функциями, включая стимуляцию моноцитов, миграцию NK- и Т-клеток, регуляцию Т-клеток и созревание клеток – предшественников костного мозга, модуляцию экспрессии молекул адгезии и ингибирование ангиогенеза.
- ISG – это гены, экспрессия которых стимулируется интерфероном, их разделяют в зависимости от того, каким классом интерферона они активируются: тип I, тип II, или же интерферон III типа. Белковые продукты ISG контролируют патогенные инфекции.
- LPS/бацилла Кальметта – Герена (Bacille Calmette – Guerin) – экспериментально полученный штамм бациллы *Mycobacterium bovis* (возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота), который был использован для создания вакцины против туберкулеза (BCG/БЦЖ).
- MAC/комплекс атаки комплемента на мембрану, или комплекс терминального комплемента (ТСС), представляет собой комплекс белков, обычно образующихся на поверхности мембран клеток патогенов в результате активации системы комплемента хозяина, и как таковой является эффектором иммунной системы.
- MCP1 – человеческий моноцитарный хемотаксический фактор-1.
- MCP3 – человеческий моноцитарный хемотаксический фактор-3.
- МНС молекулы (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости – комплекс генов, кодирующих белки, ответственные за представление (презентацию) антигенов Т-лимфоцитам при иммунном ответе.
- MIP1 α /макрофагальный воспалительный белок – один из хемотаксических цитокинов, известных как хемокины (цистеин-цистеин/CC).
- MIS-C/мультисистемный воспалительный синдром у детей – воспалительный процесс, поражающий одновременно несколько систем организма, вызывающий у детей высокую (38,5° С и выше) температуру, пониженное давление, кислородную недостаточность и в некоторых случаях отказ органов, что сближает его по клиническим проявлениям с синдромом Кавасаки. Сообщения о синдроме впервые появились в мае 2020 года, предполагается, что синдром может являться осложнением от заражения SARS-CoV-2.

- MIS-A/мультисистемный воспалительный синдром у молодых людей – это тяжелое осложнение после перенесенного инфекционного заболевания, когда иммунная система реагирует на вирус не так, как обычно. Ранее подобное явление носило название синдрома Кавасаки и наблюдалось только у малышей.
- NET/внеклеточные ловушки нейтрофилов – представляют собой трехмерные хроматин-содержащие структуры, выделяющиеся нейтрофилами в ответ на инфекционные или воспалительные агенты в процессе запрограммированной клеточной гибели NETosis.
- NLRP3 инфламмосома – макромолекулярные комплексы, которые содержат множество копий рецепторов, распознающих молекулярные структуры патогенных (инфекционных) агентов и повреждающих факторов (PAMP и DAMP), а также включают молекулы белка-адаптора ASC и прокаспазы-1.
- PAI1/активатор плазминогена 1 – один из белков, относящихся к группе секретируемых протеаз, превращающих профермент плазминоген в активную форму – плазмин, являющийся фибринолитическим ферментом.
- PD-1/белок запрограммированной гибели клеток 1 – белок на поверхности клеток, регулирующий ответ иммунной системы посредством сдерживания такового в целях обеспечения аутолерантности, реализуемой посредством подавления Т-клеточной воспалительной активности.
- SJIА/системный юношеский идиопатический артрит – это системное мультифакторное заболевание, часто провоцируемое инфекцией, вызывает нарушение иммунной системы организма.
- SMF/синдром Миллера – Фишера – наиболее распространенный клинический вариант синдрома Гийена – Барре (SGB), клинически характеризуется наличием классической триады симптомов, определяемых появлением арефлексии, атаксии и офтальмоплегии.
- TF/TNF- α /фактор некроза опухоли – внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами.
- Th2/T-хелперы 2-го типа – участвуют в противопаразитарном иммунитете и аллергических реакциях; продуцируют интерлейкины 4, 5 и 13; согласно современным представлениям, они располагаются в тканях, а не в герминативных центрах лимфоузлов.
- Th17 – клетки, продуцируют воспалительный цитокин IL-17.
- TIM-3/T-клеточный домен иммуноглобулина и муцинового домена-3 – (HAVCR2) трансмембранный белок, экспрессирующийся на Т-хелперах типа 1 (Th1) CD4+, продуцирующих интерферон гамма (IFN- γ), и Т-киллерах типа 1 (Tc1), а также на Treg и иммунocyтах врожденной иммунной системы (дендритных клетках, естественных киллерах, моноцитах), являющийся отрицательным регулятором их функций.

- TLR7 – общий сенсор вирусов, экспрессируется на X-хромосоме.
- TMPRSS2/сериновая протеаза – одна из наиболее распространенных групп протеолитических ферментов; название получено вследствие того, что аминокислотный остаток серина входит в состав активного центра данных протеаз и принимает непосредственное участие в расщеплении субстрата.
- β-глюкан – полисахарид природного происхождения с длинной цепочкой, структурного звена глюкозы; биологически активное вещество, воздействует на организм в целом.
- Альвеолярные клетки II типа (AT2) легких – пневмоциты II типа, или большие эпителиоциты (*epitheliocytī magni*), называются часто секреторными из-за участия в образовании сурфактантного альвеолярного комплекса (САК).
- Альвеолярные макрофаги – это фагоциты, которые играют решающую роль в гомеостазе, защите хозяина и ремоделировании тканей; это третий тип клеток в альвеолах; их плотность населения имеет решающее значение для многих процессов.
- Бляшкообразующая единица (БОЕ) – это наименьшее количество вируса или бактериофага, способное вызвать образование одной негативной колонии (бляшки) соответственно на однослойной культуре клеток позвоночных или на агаровой культуре бактерий.
- Воспалительные моноциты (CD14+, CD16+) – наряду с нейтрофилами крови и микроглиальными клетками мозга, которые являются аналогом моноцит/макрофагальной системы в мозге, участвуют в развитии скрытого, или так называемого системного неинфекционного воспаления в организме человека.
- ДВС-синдром – это патологический неспецифический процесс, характеризующийся образованием диссеминированных тромбов (фибриновых, эритроцитарных и гиалиновых) в сосудах микроциркуляторного русла в сочетании с несвертываемостью крови, приводящей к множественным массивным кровоизлияниям.
- Интерлейкины – группа цитокинов, синтезируемая в основном лейкоцитами, а также мононуклеарными фагоцитами и другими тканевыми клетками; являются частью иммунной системы.
- Интерквартильный интервал – это интервал значений признака, содержащий центральные 50 % наблюдений выборки, т. е. интервал между 25-м и 75-м процентилями.
- ИТП/первичная иммунная тромбоцитопения/болезнь Верльгофа – хроническое аутоиммунное гематологическое заболевание, обусловленное повышенным разрушением тромбоцитов и ассоциированной тромбоцитопенией, одна из наиболее частых причин геморрагического синдрома.

- Клетки Vero-E6 – это линия клеток (клон от Vero 76) применяющаяся в качестве клеток-хозяев для выращивания вируса; например, для определения наличия или отсутствия репликации вируса или для выращивания вирусных культур в научно-исследовательских целях.
- Клиренс вируса – это наиболее распространенный показатель измерения элиминации/исчезновения случаев заболевания на большой территории в результате прекращения передачи возбудителя инфекции.
- Клональная экспансия – процесс интенсивного деления В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов, в результате которого из одной клетки возникают миллионы копий; процесс запускается после того, как лимфоцит обнаружил чужеродный микроорганизм или белок (антиген); образовавшиеся в результате клональной экспансии клетки будут распознавать и эффективно бороться с антигеном.
- Коагулопатия – патологическое состояние организма, обусловленное нарушениями свертываемости крови.
- MAS/синдром активации макрофагов – серьезное, потенциально опасное для жизни осложнение нескольких хронических ревматических заболеваний детского возраста. Чаще всего возникает при системном ювенильном идиопатическом артрите (SoJIA). Кроме того, было описано в сочетании с системной красной волчанкой (СКВ), болезнью Кавасаки и во взрослом возрасте болезнью Стилла. Считается, что он тесно связан и патофизиологически очень похож на реактивный (вторичный) гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).
- Монослойные клетки хозяина – это монослойный способ культивирования.
- Нейтрализующие аутоантитела представляют собой антитела, которые защищают клетку от патогена или инфекционной частицы, нейтрализуя любой биологический эффект, который они оказывают. Нейтрализация делает частицу более не инфекционной или патогенной. Нейтрализующие антитела являются частью гуморального ответа адаптивной иммунной системы против вирусов, внутриклеточных бактерий и микробного токсина.
- Нейтрализующие антитела к коронавирусной инфекции штамма SARS-CoV-2 нацелены на RBD белка S, чтобы блокировать взаимодействие между вирусом и рецептором хозяина.
- Область Fc-антитела – фрагмент, ответственный за взаимодействие с компонентом и его активацию и связывание с рецепторами на мембране клеток.
- ОРДС – это жизнеугрожающее воспалительное поражение легких, характеризующееся диффузной инфильтрацией и тяжелой гипоксемией.
- Ответ зародышевого центра – это участки внутри вторичных лимфоидных органов (лимфы узлы и селезенки), где зрелые В-клетки пролиферируют, дифференцируются и мутируют свои гены антител (посредством соматиче-

ской гипермутации при достижении более высокого сродства) во время нормального иммунного ответа на инфекцию.

- Паттерн-распознающие рецепторы PRR – это белки, присутствующие на поверхности клеток иммунной системы и способные узнавать стандартные молекулярные структуры, специфичные для больших групп патогенов. Их также называют рецепторами, опознающими патоген. По сравнению с системой адаптивного иммунитета такие рецепторы и связанные с ними механизмы иммунной защиты являются эволюционно более древними.
- Пироптоз – вид программируемой некротической гибели клетки, при котором в результате активации каспазы 1 происходит нарушение целостности плазматической мембраны и быстрое высвобождение наружу содержимого клетки.
- Псевдовирус – вирусоподобная частица, состоящая из оболочки вируса и нуклеиновой кислоты хозяина, образуется при совместном культивировании нескольких вирусов, у которых геном происходит от одной родительской формы, а наружная оболочка – от другой.
- Рекомбинантный вирус – это вирус, в состав генома которого входят нуклеотидные последовательности геномов других вирусов или клеток.
- Секвенирование следующего поколения – группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания ее первичной структуры. Технология методов секвенирования нового поколения позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования.
- Синергизм между цитокинами – взаимодействие, взаимоперекрывание между цитокинами, направленное на достижение оптимального в данный момент конечного эффекта.
- Система комплемента – комплекс защитных белков, постоянно присутствующих в крови, это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов, участвует в реализации иммунного ответа организма.
- Созревание аффинности антител – феномен сродства антитела к антигену состоит в том, что образующиеся на поздних стадиях иммунного ответа антитела имеют большую аффинность, чем те, что образовались ранее, т. к. по мере снижения концентрации антигена в лимфоидной ткани, конкуренция за связывание с редким антигеном приводит к тому, что для размножения отбираются более успешные В-клетки – это В-лимфоциты с поверхностным рецептором самой высокой аффинности (антиген связывается более прочно) будут побеждать, а синтезируемый ими тип антител станет в конечном счете преобладающим.

- Тсм/Т-лимфоциты центральной памяти – это подвид Т-лимфоцитов, которые хранят информацию о ранее действовавших антигенах. Доля центральных клеток памяти ожидаемо растет с течением жизни, в соответствии с ростом числа инфекций, которые успели встретиться организму и попасть в библиотеку памяти иммунной системы.
- Th1/Т-хелперы 1-го типа – это подвид Т-лимфоцитов, которые образуют цитокины IL2, IL12, IFN- γ , ФНО, участвующие в формировании клеточных реакций (клеточный иммунитет), противовирусного иммунитета, аутоиммунных реакций.
- Т-клетки памяти CD4+ – трансмембранный гликопротеин, названный по коду кодирующего гена CD4, называют клетками-помощниками, они первыми атакуют инфекции. Это особый клон клеток, получивших название Т-хелперов/индукторов. В функциональном отношении делятся на два вида хелперных лимфоцитов: Т-хелперы 1-го порядка (Th1-клетки) и 2-го порядка (Th2-клетки), продуцируют разные наборы цитокинов.
- Т-клетки памяти CD8+ – трансмембранный гликопротеин, названный по коду кодирующего гена CD8, обнаруживается на поверхности тимоцитов и Т-лимфоцитов и участвует в распознавании антигенных пептидов в контексте с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I.
- CD3 – типичный маркер всех Т-лимфоцитов, позволяет идентифицировать зрелые покоящиеся (интактные) Т-клетки и подсчитать общее количество Т-лимфоцитов, передает сигнал активации от TCR внутрь Т-лимфоцитов.
- CD4 – маркер Th (хелперов), рецептор для молекул HLA II, его определение имеет значение в диагностике состояний, связанных с дефектами антителопродукции и реакций клеточно-опосредованного иммунитета.
- CD45RO – экспрессируется на эффекторных Т-клетках, Т-клетках памяти, В-клетках, моноцитах и макрофагах. Увеличение Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD4+CD45RO+ (клетки памяти) характеризует активный гуморальный ответ на чужеродный антиген в прошлом и потенциальную возможность развития острых воспалительных при повторном контакте с чужеродным антигеном за счет сформированной иммунологической памяти.
- Т-клеточные рецепторы/TCR – ключевая молекула адаптивного иммунного ответа, поверхностный белковый комплекс Т-лимфоцитов, ответственный за распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпредставляющих клеток.
- Тромбомодулин – специфический маркер активации эндотелия, высвобождается при повреждении эндотелиальных клеток.
- Тромботическая микроангиопатия – состояние, общее для многочисленных заболеваний с различными патогенетическими механизмами, при этом цен-

тральным звеном патогенеза является повреждение сосудистого эндотелия в органах-мишенях, главным образом в почках. Триггерные механизмы активации эндотелиальных клеток различны: бактериальные экзо- и эндотоксины при типичных формах гемолитико-уремического синдрома, воздействие антител или иммунных комплексов при системных заболеваниях, лекарств.

- Хемокины – это низкомолекулярные цитокины, ответственные за хемотаксис клеток лейкоцитов и лимфоцитов.
- Хемокины (CCL2, CCL3, CCL4 и CCL7) – большое семейство структурно-гомологических цитокинов, которые стимулируют передвижение лейкоцитов и регулируют их миграцию из крови в ткани.
- Хемокин CCL2 (C-C motif ligand 2) или MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) – цитокин, относится к группе CC-хемокинов (β -хемокинов), является наиболее мощным фактором хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих, осуществляет контроль за эGRESSом клеток из кроветворных органов, их трафиком к фокусам воспаления в окружающую ткань.
- Хемокин CCL3 – участвует в остром воспалительном состоянии в рекрутинге и активации полиморфно-ядерных лейкоцитов посредством связывания с рецепторами CCR1, CCR4 и CCR5.
- Хемокин CCL4 – белок, который у человека кодируется геном CCL4, известен как воспалительный белок макрофагов – 1β (MIP- 1β), является CC Chemokine со специфичностью к рецепторам CCR5. Это хемокин для естественных клеток-киллеров, моноцитов и ряда других иммунных клеток.
- Хемокин CCL7 – опосредует эффекты на типы иммунных клеток посредством связывания с многочисленными рецепторами, включая CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 и CCR10, которые принадлежат к семимембранным рецепторам, связанным с G-белком. CCL7 может также взаимодействовать с гликозаминогликанами клеточной поверхности (ГАГ), присутствующими на всех поверхностях клеток животных.
- Цитокины – это низкомолекулярные регуляторные белки или гликопротеины, секретируемые иммунными клетками (моноцитами, макрофагами, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, клетками-киллерами и т. д.) и различными другими клетками (эндотелиоцитами, эпителиальными клетками, фибробластами и т. д.) в организме в ответ на ряд стимулов. Это универсальные регуляторы жизненного цикла клеток, они контролируют процессы дифференцировки, пролиферации, функциональной активации и апоптоза последних.
- Цитопатический эффект (ЦЭ) – это цитопатогенное действие вируса, специфическая морфологическая деструкция (разрушение) и функциональная патология зараженных вирусами клеток, культивируемых вне организма.
- Цитотоксический фенотип – код кодирующего гена или группы кодирующих генов цитотоксических Т-лимфоцитов, играющих ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток.

- Экспрессия – в медицине это генетический процесс, посредством которого содержащаяся в генах информация преобразуется в определенные клеточные структуры.
- Эндотелиопатия – эндотелиальная дисфункция.
- Эпигенетическое перепрограммирование клеток врожденного иммунитета – это наследуемые изменения в экспрессии генов и фенотипе клетки, которые не затрагивают последовательности самой ДНК, при этом эпигенетические модификации полностью обратимы.
- Метаболическое перепрограммирование клеток врожденного иммунитета – процесс со сдвигом в энергообеспечении от митохондриального окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу, является важнейшей отличительной характеристикой, которую приобретают клетки в процессе трансформации.
- Эпитоп – часть макромолекулы антигена, которая распознается иммунной системой.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AID – аутоиммунные заболевания

APLS – антифосфолипидные синдромы

СИЗ – средства индивидуальной защиты

ДВС-синдром – диссеминированное внутрисосудистое свертывание, тромбогеморрагический синдром

ДЗМ – Департамент здравоохранения города Москвы

ИТП – иммунная тромбоцитопеническая пурпура

CRS – синдром высвобождения цитокинов

GBS – синдром Гийена – Барре

G-CSF – фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов

GM-CSF – гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор

EBV- Эпштейн – Барр-вирус

HLH – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз

ISG – интерферон-регулируемые (индуцируемые, стимулируемые) гены

ПБА – патогенные биологические агенты

БМБ – бокс микробиологической безопасности

MAS – синдром активации макрофагов

MIS-C – мультисистемный воспалительный синдром у детей

MIS-A – мультисистемный воспалительный синдром у молодых людей

МО – медицинская организация

NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов

NLR/Nod-like receptors – Nod-подобные рецепторы

NLRP3 – инфламмосома

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ОИТ/ICU – отделение интенсивной терапии

ОРДС/ARDS – острый респираторный дистресс-синдром

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

к-ДНК – комплементарная ДНК

РУ – регистрационное удостоверение

SJIA – системный юношеский идиопатический артрит

SMF – синдром Миллера – Фишера

TCR – T – клеточные рецепторы

TF/TNF - α – фактор некроза опухоли

TLR/Toll-like receptors – Толл-подобные рецепторы

TMPRSS2 – сериновая протеаза

Пандемия COVID-19 [1, 2, 3] привела к тяжелой заболеваемости и смертности во всем мире. Именно отсутствие у населения ранее существовавшего иммунитета к SARS-CoV-2 стало причиной резкого увеличения числа случаев заболевания. Доказано, что инфицирование SARS-CoV-2 создает определенный тип защитного иммунитета от повторного заражения [4, 5, 6, 7, 8]. Практически все модели передачи SARS-CoV-2 предполагают, что он вызывает иммунитет к повторной инфекции на срок не менее 1 года. Исследование Службы общественного здравоохранения Англии показало, что иммунитет, приобретенный естественным путем, в результате перенесенной инфекции, обеспечивает 83 %-ю защиту от повторного заражения длительностью не менее 5 месяцев [9]. Очевидно, что продолжительность иммунитета к SARS-CoV-2 будет определять общий ход пандемии и постпандемического периода [10]. Понимание временной динамики защитного иммунитета имеет решающее значение, поскольку резкие вспышки SARS-CoV-2 по всему миру могут привести к сокращению числа доступных, восприимчивых к нему хозяев, а предшествующие иммунные взаимодействия с эндемичными коронавирусами могут влиять на краткосрочность или долгосрочность распространения SARS-CoV-2 [11, 12] посредством перекрестной защиты или антителозависимого усиления [13]. Контакт с патогеном вызывает реакцию выработки антител, уровень содержания которых изменяется со временем, причем у всех по-разному. В случае повторного контакта с SARS-CoV-2 предыдущее инфицирование может сыграть роль в обеспечении защиты от COVID-19.

При оценке воздействия SARS-CoV-2 на основе данных о серологической распространенности следует учитывать: чувствительность и специфичность лабораторного теста, тяжесть течения инфекционного процесса, изменяющуюся во времени, зависимость от возраста, сероконверсию, серореверсию и перекрестную реактивность между штаммами. Исследования серологической распространенности с разбивкой по возрасту позволяют лучше объяснить наблюдаемые закономерности, помочь в принятии адекватных ответных мер на пандемию SARS-CoV-2 и прогнозировать эпидемическую ситуацию с COVID-19.

Профилактические меры, предназначенные для снижения риска, в том числе вакцинация и терапия антителами реконвалесцентов, выздоровевших от COVID-19, требуют более пристального внимания. Результаты серологических тестов у вакцинированных должны подлежать оценке с целью выявления потенциальных иммунопатогенных эффектов. Наиболее точное соотношение пользы и риска от вышеперечисленных процедур будет определяться в группе людей старшего возраста, подвергающихся более высокому риску тяжелого заболевания, чем молодых [14].

1

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Этиология

Новый трансмиссивный коронавирус SARS-CoV-2 вызывает острое инфекционное заболевание, преимущественно поражающее легкие (Corona Virus Disease 2019, COVID-19). COVID-19 включен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих (Постановление правительства РФ от 31 января 2020 г. № 66). Впервые этот вирус обнаружен в городе Ухань провинции Хубэй в Китае в декабре 2019 года. SARS-CoV-2 – одноцепочечный РНК-содержащий вирус, семейство Coronaviridae, род Betacoronavirus (Beta-CoV), отнесен к II группе патогенности, как и другие представители этого семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV) [15].

Известно, что коронавирусы вызывают заболевания у людей и животных. Четыре из них (человеческие коронавирусы 229E, NL63, OC43 и HKU1) обычно поражают только верхние дыхательные пути и вызывают относительно легкие симптомы [16]. Однако существует три коронавируса: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома MERS-CoV и SARS-CoV-2, которые могут реплицироваться в нижних дыхательных путях и вызывать пневмонию с вероятностью смертельного исхода. SARS-CoV-2 на 79 % генетически сходен с SARS-CoV [17].

1.2. Пути передачи SARS-CoV-2

Основной источник инфекции – больной человек, в том числе находящийся в инкубационном периоде заболевания [18].

Основные пути передачи нового коронавируса: воздушно-капельный и контактный. Воздушно-капельный (основной) – реализуется при кашле, чихании и разговоре на близком (менее 2 метров) расстоянии, контактный – во время рукопожатий и при других видах непосредственного контакта с инфицированным человеком, а также через пищевые продукты, поверхности и предметы, загрязненные вирусом. Не исключен фекально-оральный путь передачи.

1.3. Периоды инкубации и развития симптомов COVID-19

Средний инкубационный период инфекции составляет приблизительно 4–5 дней до появления симптомов [19, 20, 21].

У детей и молодых людей заболевание в большинстве случаев протекает бессимптомно, тогда как пожилые люди и/или люди с сопутствующими заболеваниями подвергаются более высокому риску тяжелой формы COVID-19.

Инкубационный период в среднем составляет ~ 5 дней, тяжелое заболевание обычно развивается ~ 8 дней после появления симптомов, а критическое заболевание и смерть наступают через ~ 16 дней. (ОРДС, острый респираторный дистресс-синдром; ICU, отделение интенсивной терапии).

У 97,5 % пациентов симптомы развиваются в течение 11,5 дня [22]. В течение 5–6 дней после появления симптомов вирусная нагрузка SARS-CoV-2 достигает своего пика [23, 24, 25, 26]. Тяжелые случаи COVID-19 могут прогрессировать до острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС/ ARDS) в среднем за 8–9 дней от начала заболевания [27, 28].

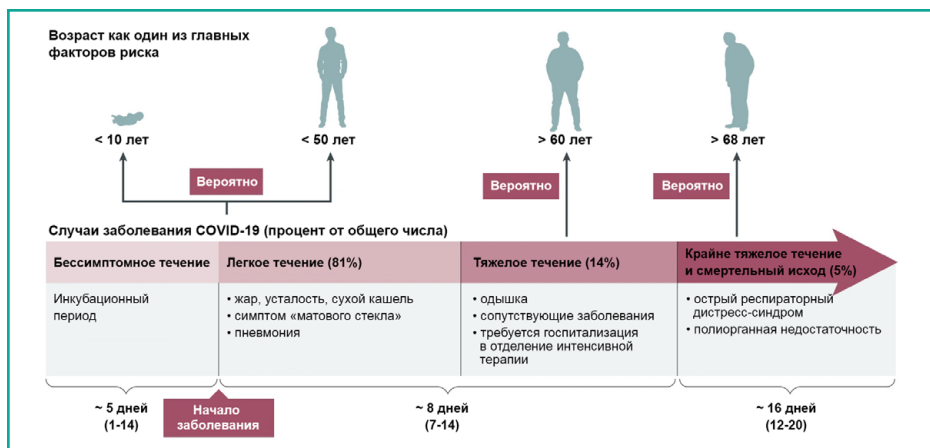


Рисунок 1. Возраст как один из главных факторов риска

Источник: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7?elqTrackId=5b8351cf9422460d9dabe28a717f8631>

1.4. Клинические проявления COVID-19

Клиническая картина заболевания обычно представляет собой респираторную инфекцию, тяжесть симптомов которой варьируется от легкого гриппоподобного заболевания до тяжелой вирусной пневмонии, приводящей к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС/ARDS). Как правило, от 3 до 10 % пациентов нуждаются в госпитализации, причем до 20 % из них страдают тяжелой формой и имеют высокий уровень смертности [29, 30].

На момент госпитализации у пациентов с COVID-19 обычно наблюдаются лихорадка и сухой кашель; реже пациенты испытывают затрудненное дыхание, боли в мышцах и/или суставах, головную боль, головокружение, диарею, тошноту и кровохарканье [31, 32, 33, 34, 35]. ОРДС, наблюдаемый при тяжелом течении COVID-19, характеризуется затрудненным дыханием и низким уровнем кислорода в крови [36] с последующим развитием гипоксемии, одышки [37] и дыхательной недостаточности, являющейся причиной смерти в 70 % случаев летальных исходов COVID-19 [38]. У некоторых пациентов развиваются вторичные бактериальные и грибковые инфекции [39], которые в совокупности с мощным выбросом цитокинов в ответ на SARS-CoV-2 способствуют возникновению цитокинового шторма, что приводит к летальному исходу в 28 % случаев COVID-19 [40].

Характерные симптомы такие как лихорадка, кашель, одышка и потеря вкуса/обоняния, могут привести к аносмии и агевзии, главному конъюнктивиту, болям в животе, диарее или сердечному повреждению. Симптомы могут быть устойчивыми и сохраняться в течение более чем 12 недель. Среди осложнений тяжелого заболевания, помимо прочих, полиорганная недостаточность, септический шок и венозная тромбоэмболия. У некоторых пациентов отмечено бессимптомное течение COVID-19.

Многие метаанализы выявили, что люди с ранее существовавшими заболеваниями, такими как рак [41], цереброваскулярные заболевания [42], сахарный диабет 2-го типа [43], хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [44, 45], гипертония [46], хроническая болезнь почек [47, 48], повышенный индекс массы тела и наличие сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, более восприимчивы к инфекции COVID-19 и подвержены риску плохого исхода. Обнаружено, что после клиренса SARS-CoV-2 частота повторных госпитализаций выше среди пациентов с плевральным выпотом во время первичной инфекции. Более того, в этой когорте отмечено увеличение количества осложнений, проявляющихся острым повреждением почек, острым респираторным дистресс-синдромом, анемией, сердечной аритмией, гипертонией и плевральным выпотом. Предполагается, что многие из госпитализаций после клиренса обусловлены не реинфекцией как таковой, а, скорее, вторичными осложнениями по отношению к системной воспалительной реакции.

1.5. Постковидные синдромы

Наблюдения показали, что после первоначального заражения SARS-CoV-2, кроме различий в степени тяжести заболевания, возможен ряд других исходов.

1.5.1. Фенотип COVID-19

Фенотип COVID-19 напоминает фенотип других патологических синдромов, вызванных неконтролируемой активацией иммунной системы и цитокиновым штормом. Последующее воспаление может привести к повреждению тканей и органов. COVID-19 имеет общие черты с острым респираторным дистресс-синдромом

(ARDS) и поствирусными синдромами: MIS-C (легкие поражаются меньше и больше признаков болезни Kawasaki); CRS (синдром высвобождения цитокинов); EBV (Эпштейн – Барр-вирус); HLH (гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз); Malign (малигнизация); MAS (синдром активации макрофагов); SJIA (системный юношеский идиопатический артрит).

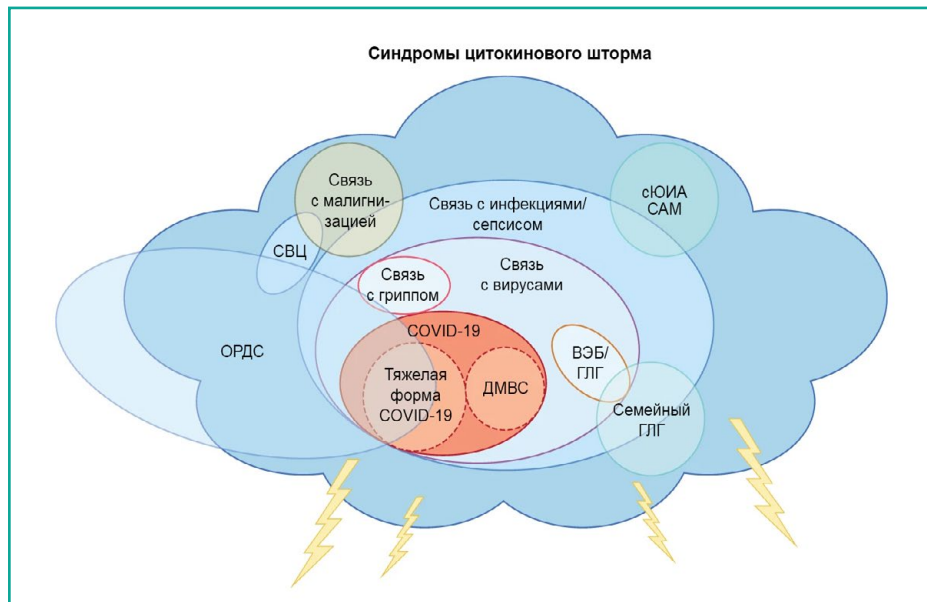


Рисунок 2. Синдромы цитокинового шторма

Источник: *Nature Immunology* | VOL 22 | April 2021 | 404–411 | www.nature.com/natureimmunology

1.5.2. Длительный COVID-19

Некоторые пациенты с более легкими начальными проявлениями COVID-19 страдают от различных изнурительных симптомов в течение многих месяцев после болезни [49, 50]. Среди них: стойкая усталость, миалгия, вегетативная дисрегуляция, проявляющаяся в виде синдрома постуральной ортостатической тахикардии, аномальной терморегуляции, кишечных расстройств и кожных проявлений [51]. Такое состояние обычно называют длительным COVID, т. к. симптомы продолжаются более 2 месяцев. Этот постковидный синдром имеет сходство с постинфекционными синдромами, которые также наблюдали после вспышек чикунгуньи [52] и лихорадки Эбола [53], а отдельные симптомы частично совпадают с миалгическим энцефаломиелитом, также вызываемым вирусным агентом и активацией иммунной системы [54]. Длительный COVID проявляется по-разному, затрагивая сердце, легкие, желудочно-кишечный тракт, мозг, психическое здоровье и т. д. Наиболее частыми проблемами, о которых сообщают, являются: одышка, утомляемость, нарушение обоняния и вкуса, беспокойство у госпита-

лизированных и негоспитализированных пациентов. Для некоторых людей эти проблемы могут быть изнурительными.

Для понимания и лечения длительного COVID потребуются интенсивные, быстрые и многопрофильные исследования. Ключевой проблемой при лечении длительного COVID является отсутствие общепризнанного определения случая, включая патологические корреляты. Неизвестно, является ли длительный COVID новым и отличным от других синдромом, или он представляет собой множественные, частично перекрывающиеся синдромы, проявляющиеся по отдельности или в комбинации, или объясняется последствиями после интенсивной терапии.

1.5.3. Мультисистемный воспалительный синдром

Мультисистемный воспалительный синдром – это редкое и серьезное постинфекционное состояние, связанное с COVID-19. Впервые описан у детей (MIS-C) [55, 56, 57] и совсем недавно – у молодых людей (MIS-A) [58]. Этот синдром может возникнуть через 2–6 недель после заражения SARS-CoV-2, поражает детей более старшего возраста и имеет общее с клинической картиной болезни Kawasaki [59]. У значительной части пациентов с тяжелой формой COVID-19, включая пациентов моложе 50 лет, молодых людей и детей, в несколько раз чаще развиваются: венозные и артериальные осложнения в виде инсульта крупных сосудов, сердечная недостаточность, поражения кишечника и клинические проявления, характерные для токсического или септического шока [60]. Патогенез MIS-C до конца не изучен.

Большинство пациентов с MIS-C получают в качестве иммуномодулирующей терапии высокие дозы стероидов, внутривенно иммуноглобулины и антицитокинные препараты в сочетании с антикоагулянтами для противодействия микроангиопатии, активации каскадов комплемента и коагуляции во время фазы гипервоспалительного заболевания [61, 62]. Задержка возникновения MIS-C от 2 до 6 недель от момента первоначального инфицирования SARS-CoV-2 указывает на роль адаптивных иммунных ответов [63, 64].

1.5.4. Индукция аутоиммунного заболевания

Наиболее заметным клиническим результатом воздействия SARS-CoV-2, сохраняющимся долгое время после разрешения острого вирусного процесса, является индукция аутоиммунного заболевания. У пациентов, перенесших инфекцию SARS-CoV-2, были описаны симптомы, соответствующие иммунной тромбоцитопенической пурпуре (ИТП), синдрому Миллера – Фишера (SMF), синдрому Гийена – Барре (GBS), антифосфолипидным синдромам (APLS) и MIS-C.

Существует три основные гипотезы [65], лежащие в основе индукции аутоиммунитета после тяжелой вирусной инфекции:

1. молекулярная мимикрия, суть которой состоит в том, что изменение процессинга и презентации эндогенных антигенов способствует распознаванию аутоантигенов;

2. потеря толерантности связана с апоптозом лимфоцитов и с последующим неравномерным расширением репертуара/увеличением аутореактивных лимфоцитов;
3. вирусные суперантигены SARS-CoV-2, изменяющие репертуар Т-клеток – наиболее сильный триггер гипертрофического синдрома и индукции аутоиммунных заболеваний (AID).

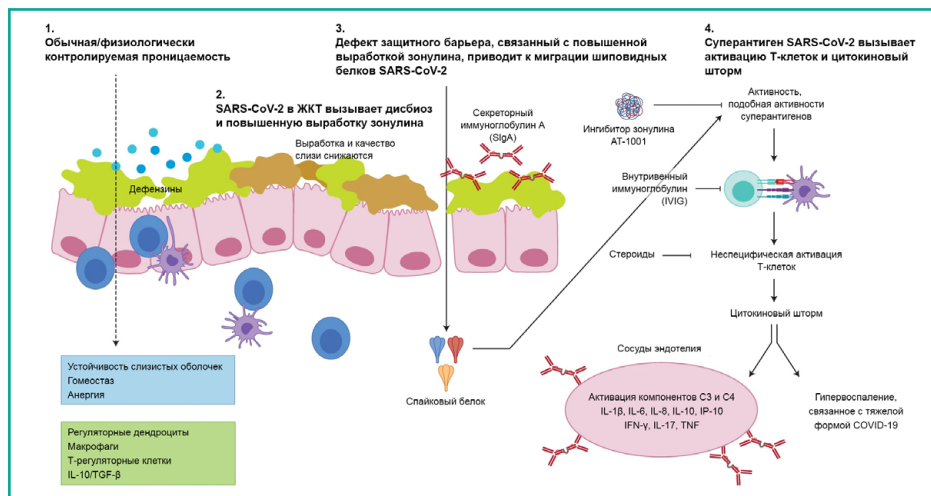


Рисунок 3. Присутствие SARS-CoV-2 в желудочно-кишечном тракте

Источник: *Nature Immunology* | VOL 22 | April 2021 | 404–411 | www.nature.com/natureimmunology

Путь 1: в физиологических условиях гомеостаз слизистой оболочки кишечника поддерживается за счет строго контролируемого переноса антигена из просвета кишечника в собственную пластинку кишечника.

Путь 2: присутствие SARS-CoV-2 (в виде жизнеспособных или нежизнеспособных вирусов) в желудочно-кишечном тракте вызывает дисбактериоз и стимулирует экспрессию зонulina – молекулы, контролирующей параклеточную проницаемость.

Путь 3: зонулин-зависимая повышенная проницаемость кишечника позволяет параклеточному прохождению больших, интактных молекул, в том числе шипованных белков SARS-CoV-2, в собственную пластинку.

Путь 4: спайковые белки, действующие как суперантигены, запускают пролиферацию Т-клеток и цитокиновый шторм с последующим началом тяжелых желудочно-кишечных симптомов и системного воспаления, которые типичны для MIS-C и MIS-A (IVIg – внутривенный иммуноглобулин; S IgA – секреторный иммуноглобулин).

Еще один аутоиммунный компонент – IFN типа I, участвующий в контроле за вирусной нагрузкой. У пациентов со сниженной функцией IFN из-за врожденных сбоев иммунитета к IFN I типа или наличия аутоантител к IFN I типа [66, 67] повышен риск тяжести COVID-19.

Синергизм между цитокинами способствует разрушительному гипервоспалению, связанному с тяжелой формой COVID-19. Показано, что TNF и IFN- γ могут синергически опосредовать PANоптоз (пироптоз, апоптоз и некроптоз), связанный с индукцией и продолжением цитокинового шторма, гибелью клеток, которые наблюдают при сепсисе [68]. Экспрессия цитокинов, индуцированная SARS-CoV-2, не только прогностический биомаркер исхода заболевания и тяжести COVID-19, но и мощный фактор, влияющий на иммунную систему хозяина, приводящий к деструктивному аутовоспалению, органной недостаточности и смерти.

1.6. Инфицирование

Иммунная реакция на вирус отличается у разных людей уже с первых часов заражения. Она зависит от наследственных факторов, факторов среды (например, загрязненный городской воздух), от привычек (например, курение или занятия спортом), влияющих на состояние иммунитета слизистых оболочек дыхательных путей.

На ранней стадии инфекции SARS-CoV-2 попадает в организм хозяина через клетки-мишени, имеющие на своей поверхности рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа (ACE2), экспрессирующиеся в больших количествах на эпителиальных клетках [69] в слизистой оболочке носа и ротовой полости [70]. Репликация вируса может происходить в горле. Однако почти у 20 % пациентов вирусная инфекция распространяется по трахее в легкие, т. к. SARS-CoV-2 главным образом нацелен на эпителиальные клетки дыхательных путей, альвеолярные клетки II типа (AT2) легких, альвеолярные макрофаги, что определяет развитие пневмоний [71], и на эндотелиальные клетки сосудов [72, 73, 74]. Экспрессия SARS-CoV-2 описана в клетках печени, почек, кишечника, сердца [75] мозга и глаз. Многие типы клеток, присутствующие в этих органах, экспрессируют ACE2 и протеазы, такие как TMPRSS2. TMPRSS2 высоко экспрессируется в нескольких тканях и участках тела и коэкспрессируется с ACE2 в эпителиальных клетках носа, легких и бронхиальных ветвях, что объясняет некоторый тканевый тропизм SARS-CoV-2.

1.7. Виды иммунитета

Иммунная система традиционно делится на врожденную и адаптивную. Как врожденный, так и адаптивный иммунные ответы играют важную роль в распознавании и устранении чужеродных патогенов. Накапливающиеся данные свидетельствуют, что субоптимальный (неограниченный) иммунный ответ во время инфекции SARS-CoV-2 определяет клинические картины, тяжесть заболевания и прогрессирование COVID-19. Идентификация специфических иммунных сигнатур предоставляет новое понимание расходящихся траекторий болезни, наблюдаемых у отдельных пациентов, и вносит вклад в совершенствование терапевтических подходов.

1.7.1. Врожденный иммунный ответ (innate immunity)

Врожденный иммунный ответ на цитопатические вирусы ингибирует их репликацию, способствует клиренсу, вызывает восстановление тканей и запускает длительный адаптивный (приобретенный) иммунный ответ.

Особенности врожденного иммунитета:

- распознавание патогена по специфичным для него молекулярным маркерам (образам патогенности);
- быстрое реагирование и взаимодействие с ними при помощи специальных рецепторов врожденного иммунитета, таких как TLR (Toll-like receptors, Толл-подобные рецепторы) и NLR (Nod-like receptors, Nod-подобные рецепторы);
- реализация своей защитной функции [76, 77].

После активации любого из ряда рецепторов распознавания внутриклеточных образцов молекулярные сигнальные каскады завершаются активацией факторов транскрипции, которые, в свою очередь, запускают начальную клеточную противовирусную защиту, вызывая активацию транскрипции интерферонов I и III типов (IFN-I и IFN-III) и генов, стимулированных интерфероном (ISG), а также цитокинов и хемокинов.

Инфицирование клеток легких SARS-CoV-2 запускает местный иммунный ответ с привлечением макрофагов и моноцитов, которые в ответ на вирусное воздействие высвобождают цитокины и активизируют первичные адаптивные иммунные ответы Т- и В-клеток.

Благоприятный иммунный сценарий. При попадании в организм SARS-CoV-2 связывается с рецептором ACE2 для входа в клетки [78], вызывает повреждение или гибель инфицированных им клеток и тканей в ходе репликативного цикла. Вирусная РНК распознается TLR3, запускающим транскрипционные ответы и цитоплазматические изменения, активирующие инфламмасому NLRP3. Репликация вируса в эпителиальных клетках дыхательных путей [79] может вызывать высокий уровень пироптоза, сопровождающийся повышением проницаемости сосудов. Пироптоз обычно наблюдается при цитопатической вирусной инфекции [80] и является вероятным триггером для последующего воспалительного ответа [81]. Во время инфекции SARS-CoV-2 повышается уровень IL-1 β , важного цитокина, высвобождаемого во время пироптоза [82]. Используя различные паттерн-распознающие рецепторы (PRR), альвеолярные эпителиальные клетки и альвеолярные макрофаги, обнаруживают высвобожденные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP), такие как вирусная РНК и связанные с повреждением молекулярные структуры (DAMP), включая АТФ, ДНК и ASC-олигомеры. Возникает волна локального воспаления, стимулирующая повышенную секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-6, IFN γ , MCP1 и IP-10) в кровь [83]. Эти цитокины являются индикаторами ответа Т-хелперов 1-го типа (Th1). Секреция таких цитокинов и хемокинов привлекает иммунные клетки (моноциты и Т-лимфоциты, но не нейтрофилы) из крови в очаг инфекции [84, 85]. Рекрути-

рование/перемещение иммунных клеток из кровотока в легкие и инфильтрация дыхательных путей лимфоцитами объясняют лимфопению и увеличение соотношения нейтрофилов и лимфоцитов примерно у 80 % пациентов с SARS-CoV-2 [86, 87]. В большинстве случаев рекрутированные клетки элиминируют инфекцию в легких, иммунный ответ уменьшается и пациенты выздоравливают.

Однако не исключен дисфункциональный иммунный сценарий, вызывающий тяжелую легочную или даже системную патологию из-за запуска цитокинового шторма. Было отмечено, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19, нуждающихся в интенсивной терапии, наблюдались более высокие уровни IL-2, IL-7, IL-10, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), IP-10, MCP1, макрофагального воспалительного белка 1 α (MIP1 α) и фактора некроза опухоли (TNF) в плазме крови [88]. Уровни IL-6 у этих пациентов продолжали увеличиваться с течением времени и являлись относительно более высокими у погибших, чем у выживших [89]. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа выявило обширную воспалительную моноцитарную популяцию макрофагов FCN1+ [90], а в периферической крови – больший процент воспалительных моноцитов CD14+ и CD16+ [91], секретирующих воспалительные цитокины, включая MCP1, IP-10 и MIP1 α , которые способствуют развитию цитокинового шторма.

Другая характерная особенность SARS-CoV-2 – способность ингибировать и задерживать индукцию IFN типа I в инфицированных клетках. Замедление или общее подавление ответов IFN типа I создает условия для усиленной репликации вируса [92, 93], вызывающей большее повреждение тканей и более сильный иммунный ответ. Иммунная патология продолжается, клетки врожденного иммунитета отправляются в очаг воспаления и производят все большее количество провоспалительных цитокинов, усугубляя ситуацию. Такие несбалансированные иммунные ответы, частично вызванные нарушением ответов IFN типа I, являются наиболее вероятным фактором, определяющим общую тяжесть острого COVID-19 [94, 95, 96, 97]. Недавние результаты исследований [98] подтвердили, что нарушения ответов IFN типа I [99] или наличие нейтрализующих аутоантител к IFN типа I [100] были выявлены в большей мере среди тех, у кого развился угрожающий жизни COVID-19.

Неограниченная воспалительная инфильтрация клеток сама по себе может привести к повреждению легких через чрезмерную секрецию протеаз и активных форм кислорода в дополнение к прямому повреждению, вызванному SARS-CoV-2. Вместе они приводят к диффузному альвеолярному повреждению, включая десквамацию альвеолярных клеток, образование гиалиновых мембран и отек легких [101, 102]. Перечисленные процессы ограничивают эффективность газообмена в легких, способствуют затруднению дыхания и снижению уровня кислорода в крови. При этом легкие становятся более уязвимыми для вторичных инфекций.

1.7.2. Перекрестно-реактивный/тренированный Т-клеточный иммунитет

Обширный сбор эпидемиологических данных [103] показал, что живые вакцины, такие как вакцина БЦЖ, противокоревая вакцина, противооспенная вакцина и пероральная вакцина против полиомиелита, обладают благоприятным неспецифическим защитным действием против инфекций, отличных от целевых болезней [104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111]. Впоследствии были проведены доказательные испытания вакцины БЦЖ у взрослых [112, 113] и детей [114, 115], которые продемонстрировали, что эта вакцина вызывает неспецифическую активацию клеток врожденного иммунитета. Тем не менее эпидемиологические и иммунологические исследования показали, что действие вакцины может длиться месяцами, может быть изменено или даже обращено вспять при введении неживой вакцины [116, 117].

Иммунная память является определяющим признаком приобретенной иммунной системы, но активация врожденной иммунной системы может способствовать усилению реакции на последующие триггеры. Этот процесс получил название «тренированный иммунитет». Исследования последних лет указали не только на широкие преимущества тренированного иммунитета для защиты хозяина, но и на потенциально пагубные последствия при иммунопосредованных и хронических воспалительных заболеваниях.

Концепция тренированного иммунитета описывает долгосрочное функциональное перепрограммирование клеток врожденного иммунитета, которое вызывается экзогенными или эндогенными повреждениями, приводит к измененному ответу на второй вызов после возврата в неактивированное состояние. Вторичный ответ на последующий неспецифический стимул может быть изменен таким образом, что клетки реагируют более или менее сильно, чем на первичный ответ, с учетом контекста и времени. Важно подчеркнуть, что тренированный иммунитет представляет собой концепцию долгосрочной адаптации клеток врожденного иммунитета. Действительно, различные стимулы, как, например, β -глюкан, LPS или бацилла Кальметта – Герена, могут вызывать различные программы тренированного иммунитета.

В отличие от адаптивных иммунных ответов, не рекомбинация генов, а эпигенетическое перепрограммирование транскрипционных путей опосредует тренированный иммунитет.

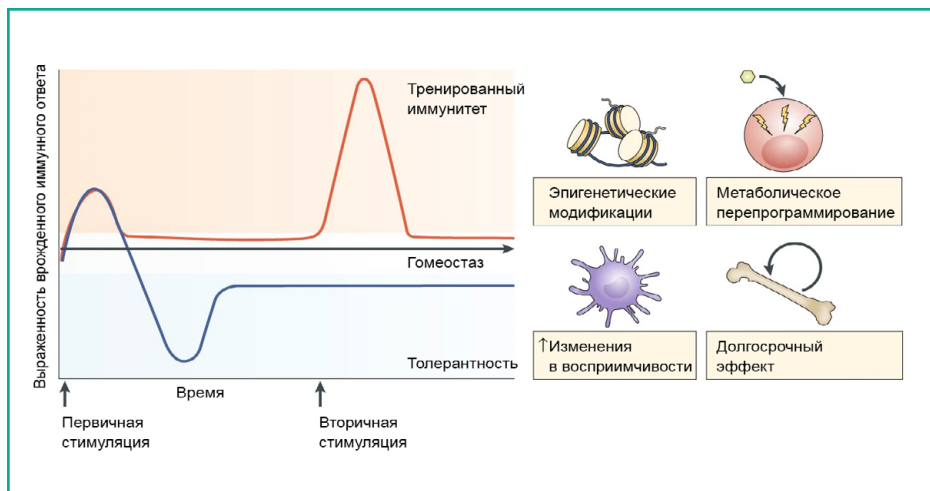


Рисунок 4. Тренированный иммунитет и толерантность – две противоположные функциональные программы врожденного иммунитета

Источник: Mihai G. Netea et al/ *Defining trained immunity and its role in health and disease/ NATURE RevleWS | Immunology volume 20 | June 2020 | 375*

Доказано, что иммунологический фенотип тренированного иммунитета сохраняется от 3 месяцев до 1 года, хотя гетерологичная защита от инфекций, вызванных живыми вакцинами, может длиться до 5 лет [118].

Инфекции или триггеры очищения тканей вызывают воспаление и активацию иммунных эффекторных механизмов. Одновременно с провоспалительным ответом срабатывают противовоспалительные механизмы для предотвращения чрезмерного воспаления/повреждения тканей и ограничения воспалительного ответа во времени. Тренированный иммунитет включает эпигенетическое и метаболическое перепрограммирование клеток врожденного иммунитета, позволяющее качественно и количественно скорректировать ответы клеток врожденного иммунитета на последующую гетерологичную стимуляцию с задержкой во времени. Неправильно настроенные реакции иммунитета могут способствовать прогрессированию заболевания, что приводит либо к хроническому гиперовоспалительному состоянию, либо к стойкому состоянию иммунологической толерантности – механизму, ослабляющему воспалительную реакцию хозяина для поддержания гомеостаза и предотвращения повреждения тканей и отказа органов.

Роль ранее существовавшего иммунитета к простудным коронавирусам – еще один возможный фактор, определяющий тяжесть заболевания COVID-19 [119]. Реактивность Т-клеток обнаружена у людей, не подвергавшихся воздействию, и была связана с предшествующим контактом с простудными коронавирусами [120]. Кроме того, IgG, специфичные для белка шипов SARS-CoV-2, были обнаружены у людей, не подвергавшихся воздействию, особенно у детей и молодых

людей, причем, некоторые из них обладали нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2, что указывает на потенциально защитный эффект против тяжелого COVID-19 [121]. Тем не менее в другом исследовании при выявлении таких же антител доказательств их защитного действия против COVID-19 не выявлено [122]. Перекрестно-реактивные антитела продолжают чаще обнаруживаться в образцах сыворотки индивидуумов, собранных до пандемии COVID-19 [123], что позволяет объяснить удивительно низкое число тяжелых случаев COVID-19, наблюдаемых в той популяции.

Существование нескольких родов коронавирусов, отличающихся по антигенам, может не только обеспечивать перекрестную защиту, но и способствовать получению ложноположительных результатов анализов из-за перекрестной реактивности. Ложноотрицательные результаты, вероятно, могут быть результатом снижения уровня антител. Отсутствие однозначных ответов обусловлено тем, что на текущий период времени значительная доля исследований кинетики антител проводится населению с субклиническими формами SARS-CoV-2, а не с клиническими проявлениями COVID-19 разной степени тяжести [124].

1.7.3. Адаптивный иммунитет (adaptive immunity)

Этот уровень защиты реагирует на вирусы медленнее, но значительно эффективнее различает индивидуальность патогенов и обладает иммунологической памятью. Адаптивная иммунная система состоит из 2 составных частей: клеточной (Т-клеточный иммунитет, эффекторы звена – Т-лимфоциты) и гуморальной (антительный, или В-клеточный иммунитет, ключевой элемент защиты – антитела, продукты В-клеток). Т- и В- клеточные звенья иммунитета взаимосвязаны. Реакция адаптивного иммунитета эффективнее и безопаснее, в этой фазе организм стремится уменьшить активность врожденного иммунитета и быстро ответить с помощью адаптивных иммунных клеток.

Адаптивный иммунный ответ контролирует и устраняет вирусные инфекции, опередившие врожденный иммунный контроль. Через несколько дней после заражения вирус-специфические цитотоксические CD8 + Т-клетки мигрируют к месту(ам) инфекции, где они убивают инфицированные вирусом клетки. В-клетки с ранним ответом продуцируют и выделяют вирус-специфические антитела иммуноглобулины М (IgM). В свою очередь, CD4 + Т-хелперные клетки способствуют переключению класса В-клеток зародышевого центра с IgM на IgG или выработку вирус-специфических антител IgA. После удаления вируса пул В-клеток памяти IgG/IgA и Т-клеток остается, что называют вирус-специфической памятью, которая быстро реактивируется при повторном заражении тем же вирусом. Вакцинация направлена на формирование защитной адаптивной иммунной памяти без необходимости в подлинной первичной инфекции.

Считается, что адаптивный иммунитет к SARS-CoV-2 возникает в течение первых 7–10 дней после заражения с одновременной активацией Т-клеток в первую неделю инфекции. Т-клетки памяти CD4+ и CD8+, специфичные для SARS-CoV-2, достигают пика через 2 недели, однако остаются выявляемыми в течение

≥100 дней. Ответ Т-клеток продолжают наблюдать у большинства взрослых через 6 месяцев после первичного заражения [125].

Устойчивый ответ В-клеток памяти и плазмобластов отмечается на ранней стадии инфекции. При этом выработка антител IgA и IgM происходит к 5-7-му дню от проявления симптомов. Титры IgA и IgM снижаются приблизительно через 28 дней, а титры IgG достигают пика приблизительно через 49 дней. Ответы со стороны Т-клеток и антител у каждого индивидуума происходят по-разному и зависят от степени тяжести заболевания [126].

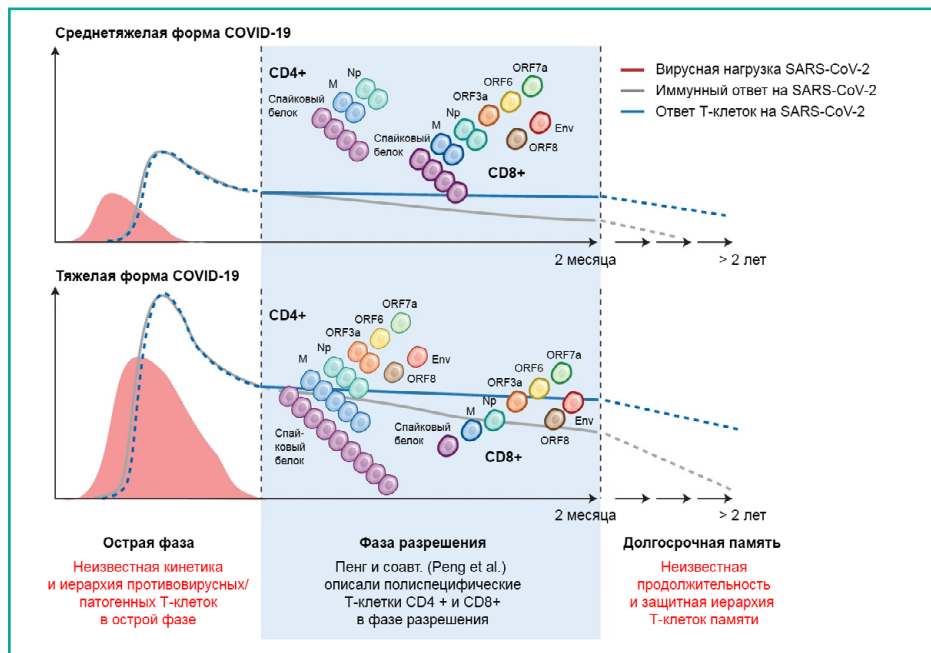


Рисунок 5. Частота и специфичность Т-клеток в фазе разрешения легкой или тяжелой формы COVID-19 [127]

Источник: Leo Swadling and Mala K. Maini. T cells in COVID-19 – united in diversity *Nature Immunology* | VOL 21 | November 2020 | 1307–1318 | www.nature.com/natureimmunology

Фаза разрешения COVID-19 (синий прямоугольник), показан широконаправленный ответ Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ (цвета и числа клеток представляют собой относительные частоты указанных специфичных белков). Общий ответ Т-клеток (сплошная синяя линия) сильнее и шире в тяжелых случаях (вирусная нагрузка выше, красный треугольник), что коррелирует с более сильными ответами антител (сплошная серая линия). Однако при легкой форме заболевания пропорционально больше CD8+ Т-клеток. До конца не изучены: кинетика и иерархия противовирусных/патогенных Т-клеток в острой фазе (слева выделено красным), а также длительность и иерархия защитных Т-клеток памяти (справа выделено

красным). Неизвестны иерархия и кинетика Т-клеток (пунктирные синие линии) и антител (пунктирные серые линии) в острой фазе и фазе памяти.

После тяжелого COVID-19 в Т-клеточных ответах, специфичных для SARS-CoV-2, преобладают CD4+ Т-клетки, причем ответы против спайков особенно многочисленны. Корреляция, наблюдаемая между спайк-специфическими Т-клетками и антителами к спайку (и рецептор-связывающим доменом в нем), вероятно, связана с CD4+ Т-клетками [128]. CD4+ Т-клетки с фолликулярным помощником Т (Т_{ФН}) играют решающую роль в успешном ответе зародышевого центра, генерируя долгоживущие плазматические клетки и нейтрализующие ответы высокоаффинных антител.

Показано, что в более тяжелых случаях COVID-19 наблюдают увеличение вирусной нагрузки и, соответственно, количества CD4+ Т-лимфоцитов и антител, из-за повышенного содержания антигена, вызывающего более сильные иммунные ответы. Поэтому более сильные ответы CD4+ Т-клеток и/или антител способствуют тяжести заболевания.

Несмотря участие Т-клеток в координации противовирусных иммунных ответов, в поддержании гуморального ответа, в ограничении репликации вирусов и удалении инфицированных клеток, они прямо или косвенно могут способствовать иммунопатологии. Временная эволюция начальных иммунных ответов и то, как они совпадают с экспоненциальной фазой вирусного роста, могут быть критическими детерминантами их эффективности. Отсроченный или недостаточный Т-клеточный ответ может позволить неконтролируемой виремии вызвать последующие более сильные Т-клеточные ответы, способные усугубить повреждение ткани. С другой стороны, большая вирусная нагрузка, запускающая сильные ответы антител и CD4+ ответы Т-клеток у людей с более тяжелым COVID-19, может быть результатом более высокой вирусной нагрузки или недостаточного ослабления ранней виремии из-за безуспешного ответа врожденного иммунитета.

В отличие от антител, Т-клетки не могут блокировать инфекцию *de novo*. Они распознают вирус после представления вирусных пептидов инфицированными клетками и вряд ли обеспечат стерилизующий иммунитет. Однако Т-клетки памяти могут уничтожить любые инфицированные клетки, проскользнувшие через первый слой защиты, обеспечиваемый антителами. Таким образом, память Т-клеток во время повторного воздействия может остановить развитие тяжелого заболевания или даже привести к прерванной субклинической инфекции, в том числе благодаря тому, что уровни В-клеток памяти, специфичных для выработки антител против белка-шипа SARS-CoV-2, потенциально обеспечивают постоянный источник стимуляции иммунной системы.

1.7.3.1. Т-клеточный иммунитет

Существенной корреляции между гуморальным и Т-клеточным иммунными ответами у больных COVID-19 не выявлено. Воздействие коронавируса может индуцировать вирус-специфические Т-клеточные ответы без выработки антител,

вследствие чего они могут быть более чувствительными индикаторами воздействия SARS-CoV-2, чем антитела.

В отличие от В-клеток, Т-клетки не распознают эпитопы, которые они запрограммированы атаковать, пока те являются частью цельного белка-антигена. Для распознавания Т-клетками таких эпитопов (Т-эпитопы) белок должен быть нарезан на небольшие пептиды, которые должны встроиться в особые белки поверхности клеток. Эта шинковка антигенов осуществляется особыми «антиген-презентирующими» клетками.

Важнейшими элементами системы распознавания Т-эпитопов являются МНС-молекулы (major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости). Существует два типа МНС – I и II, – принципиально отличающихся в контексте распознавания антигенов: МНС I презентует эпитопы клеткам CD8+, а МНС II – клеткам CD4+. Распознав Т-эпитоп, клетки CD4+ начинают продуцировать многочисленные интерлейкины, которые «координируют» иммунный ответ как В-клеток, так и клеток CD8+. Последние, распознав цель (Т-эпитоп, на который они запрограммированы) и получив активирующие сигналы от клеток CD4+, атакуют клетки, в которых замечен этот эпитоп (т. е. практически все вирус-положительные клетки), и убивают их. Активированные цитотоксические лимфоциты CD8+ Т-клетки могут проникнуть в такие места организма, куда антителам попасть трудно. У этих множественных и сложных взаимодействий существует большое количество других важных деталей, что создает огромные трудности для адекватного исследования этой системы в лабораторных условиях. В свою очередь, CD4+ Т-клетки (Т-хелперы) активируют не только CD8+ Т-клетки, но и В-клетки, стимулирующие процесс секреции антител В-лимфоцитами. Кроме того, они ответственны за выработку цитокинов и управление рекрутментом иммунных клеток. Т-клетки привлекаются из кровотока в очаг воспаления для контроля вирусной инфекции. У пациентов с COVID-19 интенсивное истощение Т-клеток и снижение функционального разнообразия указывают на развитие тяжелого течения болезни. Т-клеточный ответ на вирус играет не меньшую роль, чем образование специфических антител [129].

Результаты исследований демонстрируют, что у большинства людей развивается сильный и объемный Т-клеточный ответ как CD4+, так и CD8+ Т-клеток, а у некоторых есть фенотип памяти. У большинства индивидуумов, выздоровевших от COVID-19, выявляли индуцированные SARS-CoV-2 CD4+ и CD8+ Т-клетки с широкой и сильной памятью, обеспечивающей долгосрочную защиту [130]. Отмечено, что Т-фолликулярные хелперы (Т-FH) указывают на созревание гуморального иммунного ответа и создание пула специфических В-клеток памяти, готовых быстро реагировать на возможную реинфекцию. SARS-CoV-2-специфические Т-клетки выбираются из предварительно сформированного случайным образом пула Т-клеток, способных распознавать специфические вирусные эпитопы. Специфические CD4+ Т-клетки важны для индукции мощных В-клеточных ответов, которые приводят к созреванию аффинности антител, а уровни спайк-специфичных Т-клеток коррелируют с сывороточными титрами IgG и IgA

[131]. У выздоровевших от COVID-19 пациентов были обнаружены прочные ответные иммунные спайк-специфические нейтрализующие антитела, В-клетки памяти и циркулирующие TFH клетки [132]. Однако спайк-специфические CD4+ Т-клетки обнаруживали не только у пациентов с COVID-19, но и в 30-50 % случаев здоровых людей без COVID-19, из которых у 20 % определили CD8+ цитотоксические Т-клетки. Предполагают, что Т-клетки, вероятно, обладают перекрестной реактивностью с другими HCoV. Их способность в обеспечении защиты от COVID-19 находится в стадии изучения. CD4+ и CD8+ Т-клетки, специфичные для SARS-CoV-2, были обнаружены в фазе выздоровления после легкого COVID-19, и доказано, что они распознают пептиды, полученные из основных белков SARS-CoV-2.

1.7.3.2. Гуморальный иммунитет

Гуморальный ответ на вирусную инфекцию – форма иммунитета, направленная на синтез антител В-лимфоцитами в плазме крови в ответ на появление чужеродных антигенов [133, 134]. Антитела с противовирусной активностью связываются с патогенами, нейтрализуют их, помогая в поглощении фагоцитами (опсонизация) или через активацию комплементарной системы, а их распределение по различным жидкостям организма, включая кровь, выделяемую слизь и межклеточную жидкость, обеспечивает полноту защиты [135]. Противовирусной активностью обладают антитела IgG, IgM и IgA, при этом IgG отвечают за противовирусную активность в сыворотке крови, а IgA являются важным компонентом защиты слизистых оболочек. При инфицировании для большинства антигенов первыми начинают вырабатываться антитела IgM, через несколько дней после которых появляются IgG и IgA. При реинфекции в основном вырабатываются IgG с небольшим количеством IgM и IgA. При локализованных инфекциях дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта сопротивление обеспечивается антителами IgA и IgM, которые секретируются на слизистых оболочках и играют важную роль в защите от вирусных инфекций. Антитела IgG помогают в предотвращении распространения инфекции гематогенным путем (через кровь) [136].

У хозяина вырабатывается устойчивый гуморальный ответ против SARS-CoV-2, который опосредуется антителами против широкого спектра антигенов, присутствующих в вирусной структуре. Основные четыре специфических белка SARS-CoV-2: шиповый/спайковый (S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (N). Белки S и N являются двумя основными антигенами коронавируса, индуцирующими выработку иммуноглобулинов (Ig) [137]. Антитела против белка N часто синтезируются в относительно более высоком количестве, чем антитела против белка S (основная мишень для серологической диагностики) [138].

S-белок SARS-CoV-2 является молекулярным детерминантом прикрепления, слияния и проникновения вируса в клетки-хозяева [139]. Белок S состоит из N-концевой субъединицы (S1), которая опосредует связывание рецептора и С-концевой субъединицы (S2), которая, в свою очередь, опосредует слияние вируса с мембраной клетки-хозяина. Субъединица S1 содержит N-концевой домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD), взаимодействующий с клетками человека, экспрессирующими ACE2, и индуцирующий проникновение вируса [140]. RBD – ос-

новная мишень не только для нейтрализующих антител (NAb), но и для разработки вакцины [141]. Нейтрализующие антитела нацелены на RBD белка S, чтобы блокировать взаимодействие между вирусом и рецептором хозяина [142]. Несколько исследований продемонстрировали, что RBD-специфический титр IgG и титр вирусной нейтрализации положительно коррелируют [143, 144, 145]. Другое исследование показало, что RBD-специфические антитела способны блокировать связывание ACE2 с RBD и нейтрализовать живой SARS-CoV-2. RBD-IgA продемонстрировал нейтрализующую способность, в 10 раз более впечатляющую, чем у RBD-IgG. В ходе исследования представлены доказательства сильной противовирусной активности сывороточного RBD-IgA и выявлено, что пул сыворотки выздоравливающих пациентов с COVID-19 более эффективен, чем отдельные очищенные антитела к RBD, с точки зрения противовирусной активности [146]. Наличие NAb является одним из наиболее важных показателей клинического исхода и эффективности вакцинации при респираторных вирусных инфекциях [147, 148].

На текущий период времени в литературе нет системного описания прогностического значения гуморальных ответов в отношении различных вирусных белков SARS-CoV-2. Показатели раннего гуморального ответа могут обеспечить лучшую диагностическую ценность, если их определять не раньше чем через 6 дней после появления симптомов [149]. Уровни антител, особенно IgG, увеличиваются с течением болезни, а титры IgA и IgM имеют тенденцию к ограниченному увеличению при более тяжелых состояниях. При этом титры антител при тяжелой и при легкой/средней степенях тяжести COVID-19 аналогичны. Это указывает на то, что отсроченное появление антител может способствовать тяжести заболевания [150].

Анализ лабораторных данных пациентов показал динамические изменения общего количества антител, специфических иммуноглобулинов M (IgM) и G (IgG) к спайковому белку (S), к рецептор-связывающему домену (RBD) и нуклеопротеину (N) во время инфицирования и выздоровления от SARS-CoV-2. Генерация S-, RBD- и N-специфических IgG происходит через неделю у пациентов с тяжелым/критическим COVID-19 по сравнению с пациентами с легким/умеренным заболеванием, тогда как уровни S- и RBD-специфических IgG в 1,5 раза выше у тяжелых/критических пациентов. Уровни RBD-специфических IgG у пожилых пациентов в 4 раза выше, чем у более молодых пациентов в момент госпитализации. К тому же уровни S- и RBD-специфических IgG у выздоровевших пациентов с РНК-отрицательной реакцией на SARS-CoV-2 в 2 раза выше, чем у тех, кто является РНК-положительным. Более низкие уровни S-, RBD- и N-специфических IgG связаны с более низким процентом лимфоцитов, более высоким процентом нейтрофилов и большей продолжительностью выделения вируса. Таким образом, пациенты с низким уровнем антител при выписке из стационара имеют высокий шанс получить положительный результат теста на РНК SARS-CoV-2 после выздоровления [151]. Следует отметить, что специфические антительные ответы на S-, RBD-, N- и др. специфические белки SARS-CoV-2 не до конца изучены. По мере изучения многогранного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 станут больше понятны корреляты защиты и то, как ранее существовавший иммунитет к HCoV может повлиять на исход инфекции.

1.8. Иммунопатогенез COVID-19

Иммунный ответ хозяина на SARS-CoV-2 играет решающую роль в патогенезе и клинических проявлениях COVID-19. SARS-CoV-2 не только активирует противовирусные иммунные ответы, но и способствует возникновению неконтролируемых воспалительных реакций, характеризующихся выраженным выбросом провоспалительных цитокинов у пациентов с тяжелой формой COVID-19, что приводит к лимфопении, дисфункции лимфоцитов и аномалиям гранулоцитов и моноцитов. Эти иммунные нарушения могут привести к вторичным микробным инфекциям, септическому шоку и тяжелой полиорганной недостаточности. Изучение и понимание механизмов, лежащих в основе иммунных нарушений у пациентов с COVID-19 и их клинических последствий, позволит рационально управлять иммунными ответами на SARS-CoV-2. Усиление противовирусного иммунитета при одновременном подавлении системного воспаления – ключ к разработке успешных терапевтических стратегий против COVID-19.

1.8.1. Иммунопатология COVID-19

Воздействие SARS-CoV-2 на иммунную систему хозяина приводит к нарушению нормальных иммунных ответов и неконтролируемым воспалительным ответам в тяжелых и крайне тяжелых случаях, которые сопровождаются эндотелиальной дисфункцией, лимфопенией, активацией и дисфункцией лимфоцитов, аномалией гранулоцитов и моноцитов, высоким уровнем цитокинов, повышением уровня общих антител и иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG.

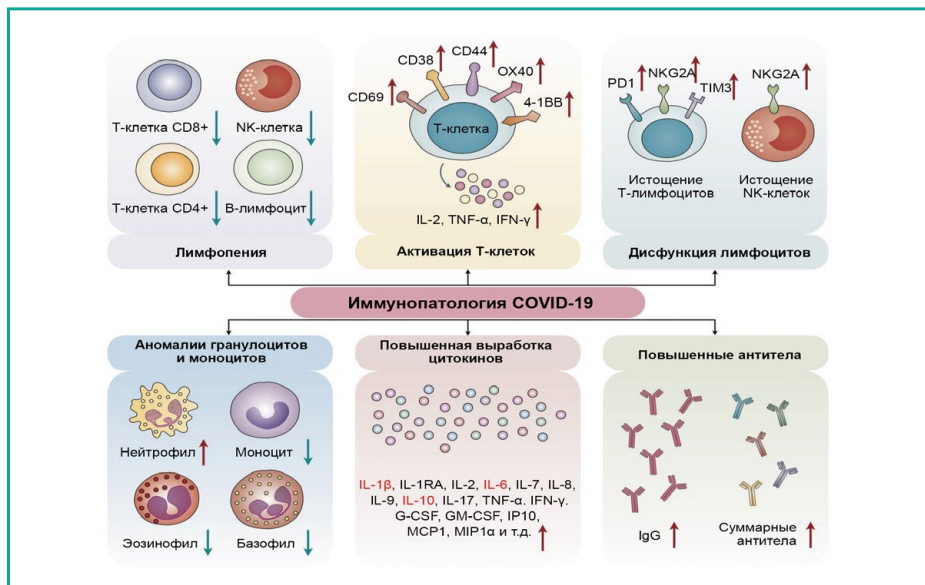


Рисунок 6. Иммунопатология COVID-19

Источник: *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2020) 5:128; <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>

Лимфопения – основной прогностический маркер тяжести пациентов с COVID-19 [152, 153]. В тяжелых случаях процент лимфоцитов бывает ниже 20 % [154]. Следует учесть, что лимфопения может наблюдаться в некоторых нетяжелых случаях и у беременных [155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164]. Однако процент нетяжелых пациентов с лимфопенией значительно ниже, чем процент тяжелых пациентов [165, 166].

У пациентов с COVID-19 также наблюдается заметное снижение количества CD4+ T, CD8+ T, NK и В-клеток [167, 168, 169, 170], особенно CD8+ T-клеток в тяжелых случаях COVID-19 по сравнению с легкими [171]. Подобным образом снижается процент Т-хелперов памяти (CD3+ CD4+ CD45RO+) [169].

Активация и дисфункция лимфоцитов

Проведено исследование процесса активации Т-клеток в случаях разной степени тяжести COVID-19 [172]. Исследование образцов крови выздоравливающих от COVID-19 показало, что ответ CD8+ Т-клеток возникал чаще, чем ответ CD4 + Т-клеток. В тяжелых случаях вирус-специфические Т-клетки представлены фенотипом Т-лимфоцитов центральной памяти T_{cm} и высокими уровнями интерферона IFN- γ , фактора некроза опухоли TNF- α и интерлейкина IL-2 по сравнению с легкими случаями [173]. Причем CD69, CD38 и CD44 высоко экспрессируются на CD4+ и CD8+ Т-клетках пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [174]. Более того, экспрессия ключевых молекул, способствующих клональной экспансии CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB) [175], и прайминга иммунных ответов [176] заметно увеличивается у тяжелых пациентов, что указывает на активацию Т-клеток у пациентов с COVID-19. Другое исследование продемонстрировало, что активированные CD4 + и CD8 + Т-клетки присутствуют в крови до облегчения симптомов [177]. Кроме того, Т-клетки у пациентов с COVID-19 демонстрируют истощенный фенотип. Уровни белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1) и Т-клеточного домена иммуноглобулина и муцинового домена-3 (TIM-3) на CD8 + Т-клетках увеличиваются на симптоматических стадиях по сравнению с продромальной стадией и достигают пиковых значений в тяжелых случаях [178]. Таким образом, повышенный уровень истощения и снижение функционального разнообразия Т-клеток могут прогнозировать тяжелое состояние у пациентов с COVID-19 [179].

Аномалии гранулоцитов и моноцитов

У пациентов с COVID-19 количество гранулоцитов и моноцитов отличается от нормальных значений. Важными показателями для тяжелых случаев и плохого клинического исхода являются показатель количества нейтрофилов и показатель отношения нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) [180], которые значительно выше у тяжелых пациентов, чем у нетяжелых [169, 181, 182, 183]. Показатель NLR отражает соотношение иммунных клеток при болезненных состояниях (баланс между врожденным и адаптивным иммунитетом) и используется в качестве маркера системного воспаления. Соотношение NLR положительно коррелирует с возрастом [184] и степенью ожирения, особенно в контексте метаболических

синдромов и диабета 2-го типа [185]. Таким образом, отношение NLR является прогностическим фактором в COVID-19 и указывает на то, что у людей с такими основными состояниями иммунной системы либо не развиваются продуктивные противовирусные иммунные ответы, либо они более склонны к развитию неконтролируемых, бурных реакций на инфекцию, что приводит к гипервоспалению и ОРДС, характерному для тяжелой формы COVID-19.

Между тем у тяжелых пациентов наблюдали снижение процента эозинофилов, базофилов и моноцитов [169, 186]. Следует отметить непосредственную роль эозинофилов в борьбе с РНК-вирусами, их способность выделять большое количество цитокинов, среди которых IL-6 является ключевым медиатором развития цитокинового шторма в случаях COVID-19 [187].

Цитокиновый шторм

У пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюдают высокую выработку цитокинов, вызывающую цитокиновый шторм: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов (G-CSF), гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон-индуцируемый белок-10 (IP10), хемотаксический белок моноцитов 1 (MCP1), белок воспаления макрофагов-1 α , IFN- γ и TNF- α .

При заражении SARS-CoV-2, CD4+ Т-клетки могут быстро активироваться в патогенные Т-хелперные Th 1-клетки, секретирующие GM-CSF, что дополнительно индуцирует CD14+ CD16+ моноциты с высокими уровнями IL-6 и ускоряет воспаление. Взаимодействие иммунных клеток характеризуется увеличением субпопуляции моноцитов CD14+ IL-1 β + , что может способствовать увеличению выработки IL-1 β [188]. Клетки Th17, продуцирующие воспалительный цитокин IL-17, дополнительно привлекают моноциты/макрофаги и нейтрофилы к месту инфекции и стимулируют другие каскады цитокинов, такие как IL-1 β и IL-6 [189, 190].

При тяжелых и крайне тяжелых случаях COVID-19 наблюдают экстремальное увеличение уровня всех вышеперечисленных воспалительных цитокинов [191, 192, 193, 194]. Данная ситуация характеризует цитокиновый шторм (самые высокие уровни активации IL-1 β , IL-6 и IL-10) [195, 196, 197]. И, наоборот, при легких/средней тяжести случаях COVID-19 наблюдают значительно меньшее их количество [198, 169, 199].

Повышение титров антител

Обнаружение антител, специфичных к SARS-CoV-2 (IgM, IgG, IgA), в сочетании с определением нуклеиновых кислот составляет основу диагностики COVID-19. В ходе исследований [200] обнаружено, что повышенный титр IgG в ответ на инфекцию тесно связан с тяжестью заболевания и его можно рассматривать в качестве дополнительного индикатора для дифференцировки тяжелых пациентов от нетяжелых. В другом наблюдении выявлено присутствие антител уже в первые 7 дней болезни у <40 % пациентов, а к 15-му дню после начала заболевания – у 100 %. Причем более высокий титр общих антител был независимо связан

с худшим клиническим исходом у пациентов с COVID-19 и вырабатывался значительно быстрее, чем титр IgM и IgG [201]. В течение 19 дней после появления симптомов 100 % пациентов дали положительный результат на противовирусный IgG [202]. Причем через >14 дней после появления симптомов чувствительность определения IgG составляет 100 %, а показатель специфичности определения IgG выше, чем IgM (95,8 %) и IgA (78,9 %) [203].

Очевидно, что активация и пролиферация В-клеток у пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях, коррелирует с плохим результатом, т. е. пациенты с относительно высоким уровнем В-клеток имеют низкую выживаемость [204, 205].

1.8.2. Механизмы иммунопатологии, вызванной SARS-CoV-2

1.8.2.1. Механизм эндотелиальной дисфункции. Иммунотромбоз

Инфекция SARS-CoV-2 вызывает микротромбоз [206, 207], наблюдаемый у пациентов с COVID-19 и в патологоанатомических образцах умерших после заражения SARS-CoV-2 [208, 209, 210, 211, 212]. Такое тромботическое состояние, при котором взаимодействуют иммунная и коагуляционная системы, называют иммунотромбоз. В результате такого взаимодействия происходит блокировка патогенов и ограничение их распространения [213]. Иммунотромбоз важен для укрепления иммунной защиты.

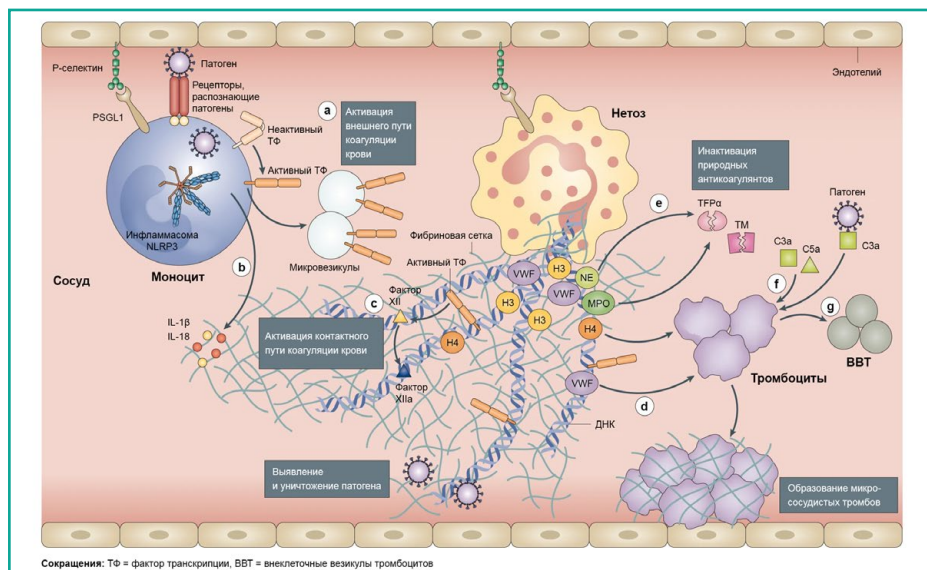


Рисунок 7. Важная роль иммунотромбоза в укреплении иммунной защиты

Источник: Bonaventura, A., Vecchié, A., Dagna, L. et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. Nat Rev Immunol 21, 319–329 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9>

Путь а: после распознавания патогена через рецепторы распознавания образов (PRR) моноциты и микровезикулы представляют активированный тканевый фактор (TF) на своей поверхности и высвобождают его в местах локализации патогена, тем самым активируя внешний путь коагуляции.

Путь b: патогены также стимулируют инфламмасому NLRP3 в моноцитах и/или макрофагах, что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18.

Путь с: привлечение нейтрофилов вносит свой вклад в этот процесс за счет высвобождения внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET), непосредственно активирующих фактор XII и контактно-зависимый путь коагуляции.

Путь d: NET также связывают фактор фон Виллебранда (VWF) и помогают рекрутировать тромбоциты.

Путь e: гистоны, в частности H3 и H4, запускают активацию тромбоцитов, эластазы нейтрофилов (NE) и миелопероксидаза (MPO) в NET расщепляют и инактивируют природные антикоагулянты (ингибитор пути тканевого фактора (TFPA) и тромбомодулин (TM)).

Путь f: NET могут экстернализовать и связывать TF, способствуя активации внешнего пути коагуляции. Тромбоциты поддерживают иммунотромботический процесс, активируя контактно-зависимый путь коагуляции за счет высвобождения полифосфатов, и вместе с эндотелиальными клетками способствуют образованию фибрина. Тромбоциты также могут активироваться C3a и C5a.

Путь g: активированные тромбоциты высвобождают большое количество провоспалительных цитокинов во внеклеточные везикулы тромбоцитов (PEV).

Благодаря этому механизму SARS-CoV-2 попадает в ловушку сетей на основе фибрина и погибает. Иммунотромботический процесс позволяет ограничить уничтожение патогенов внутрисосудистым компартментом, ограничивая повреждение органов.

На текущий период времени определена роль иммунотромбоза в патогенезе SARS-CoV-2. Механизмы иммунотромбоза включают: прямое повреждение эндотелиальных клеток вирусом и последующую активацию каскада свертывания; инфильтрацию нейтрофилами, приводящую к образованию NET; индукцию гипоксемии, вызывающую усиление экспрессии TF с помощью индуцируемых гипоксией факторов транскрипции и образование сгустков; активацию компонента, способствующую коагуляции, рекрутированию и активации тромбоцитов, моноцитов и нейтрофилов, запускающих экспрессию TF; аномальное повышение уровней провоспалительных цитокинов, вызывающее прямое повреждение клеток.

Стадия COVID-19, развивающаяся в сторону ОРДС (ARDS) [214], характеризуется высоким уровнем провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-1 β , IL-18 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [215, 216, 217]. Это событие названо цитокиновым штормом [218, 219]. Следует

отметить, что уровни цитокинов у пациентов с COVID-19 ниже, чем у пациентов с ОРДС без COVID-19, сепсисом, инфекцией вируса гриппа и химерным антигеном [220,221]. SARS-CoV-2 запускает путь IL-1/IL-6 в большей степени, чем другие коронавирусы [222]. Исследования *in vitro* подтвердили активацию инфлам-масы NLRP3 в результате инфицирования SARS-CoV-2 первичных моноцитов человека. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 продукты инфлам-масы NLRP3(IL-1 β и IL-18) увеличиваются и положительно коррелируют с неблагоприятными клиническими исходами [223], что подтверждает связь между инфекцией SARS-CoV-2 и дисрегулируемым цитокиновым ответом.

В альвеолах пациентов, умерших от пневмонии, связанной с COVID-19, наблюдали большое количество макрофагов CD68+, в которых были обнаружены белки SARS-CoV-2 [224, 225]. Анализ бронхоальвеолярной жидкости пациентов с тяжелым или критическим COVID-19 показал более высокий процент макрофагов и нейтрофилов и более низкую долю миелоидных дендритных клеток, плазмочи-тоидных дендритных клеток и Т-клеток, чем у пациентов с умеренным заболева-нием [226], а также более высокие уровни провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и IL-1 β) и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL4 и CCL7) [226]. Таким образом, макро-фаги легких способствуют воспалительной реакции при инфекции SARS-CoV-2 и усиливают чрезмерное воспаление при тяжелой пневмонии. Подобно другим респираторным инфекциям, рекрутирование лейкоцитов в легкие регулируется специфическими молекулами [227], неконтролируемая активность которых может привести к осложнениям, наблюдаемым у пациентов с COVID-19 как в лег-ких, так и в других органах [228].

Коагулопатия, связанная с COVID-19

Развитие протромботического состояния – важный патофизиологический при-знак COVID-19. О возникновении коагулопатии, специфичной для COVID-19, сви-детельствуют повышенные в крови уровни фибриногена, фактора фон Вилле-бранда (VWF) и D-димера [229, 230, 231]. Эти особенности больше соответствуют состоянию гиперкоагуляции в сочетании с тяжелым воспалительным состоянием, а не классическому состоянию диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) [232]. Наблюдения показали, что низкий уровень антитромбина был связан с плохими исходами при COVID-19, особенно среди пациентов с ожире-нием [233]. Активность антитромбина снижалась по мере обострения инфекции SARS-CoV-2, что обусловлено дисбалансом уровней эндогенных антикоагулян-тов, вызванным цитокинами [234]. При синдроме активации макрофагов нару-шение функции печени является типичным признаком и может способствовать коагулопатии, однако нарушение функции печени при COVID-19 обычно бывает легким и преходящим, без явного острого повреждения печени [235, 236].

Помимо состояния гиперкоагуляции в легких у пациентов с ОРДС, связанным с COVID-19, наблюдалось гипофибринолитическое состояние в альвеолярном пространстве из-за высоких уровней фибринолитических ингибиторов [237] ак-тиватора плазминогена 1 (PAI1).

Для правильного определения коагулопатии, связанной с COVID-19, предложено оценить наличие двух или более из четырех критериев [238] в случаях подтвержденного COVID-19:

- снижение количества тромбоцитов ($<150 \times 10^9$ л);
- увеличение уровня D-димера (более чем в два раза выше верхней границы нормы);
- протромбиновое время >1 с или международное нормализованное отношение (МНО) $>1,2$;
- наличие тромбоза (макротромбоз и/или микротромбоз).

Риск коагулопатии, связанной с COVID-19, определяется одним из четырех вышеупомянутых критериев и одним из нижеследующих:

- повышенный уровень фибриногена;
- повышенный уровень VWF (более чем в два раза выше верхней границы нормы);
- наличие волчаночного антикоагулянта и/или антифосфолипидных антител с высоким титром.

Важно отметить, что коагулопатия, связанная с COVID-19, и риск ее возникновения могут еще больше прогрессировать и/или предрасполагать к ДВС-синдрому по мере увеличения тяжести COVID-19.

COVID-19-связанная эндотелиальная дисфункция

Хотя COVID-19 рассматривают как системное заболевание, он вызывает острую травму легких, в первую очередь затрагивающую эндотелий сосудов. Пневмония, связанная с COVID-19, характеризуется инфильтрацией легких макрофагами и нейтрофилами, которые вызывают диффузное альвеолярное повреждение легких [239, 240, 241]. Поражительным открытием при COVID-19 является более обширная вирусная инфекция в легких, что приводит к более диффузному воспалению, затрагивающему легочные сосуды [242]. Этот обширный процесс отражает особый тропизм SARS-CoV-2 к ACE2 – клеточному рецептору SARS-CoV-2, экспрессируемому пневмоцитами типа II [243], которые анатомически близки к сосудистой сети легких и обычно описываются как гиперпластические в образцах от пациентов с COVID-19 [244, 245, 246]. Эта гиперплазия эндотелиальных клеток может быть вызвана ишемией легочной ткани из-за закупорки мелких сосудов воспалительными клетками (иммунотромбозом) и тромбозом крупных сосудов [247]. Было высказано предположение, что эндотелиальная дисфункция является важным патофизиологическим событием при COVID-19, т. к. SARS-CoV-2 непосредственно заражает эндотелиальные клетки сосудов и приводит к повреждению клеток и апоптозу, тем самым уменьшая антитромботическую активность нормального эндотелия [248]. Поражение альвеол, отек сосудистой стенки, гиалиновые тромбы, микрокровоизлияния и диффузный тромбоз периферических мелких сосудов стали ключевыми признаками COVID-19, способствующими дыхательной недостаточности [249, 250, 251].

Эндотелиальные клетки кровеносных сосудов легких могут активироваться высокими уровнями провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF) и ферритина при тяжелой форме COVID-19 [252]. Более того, повышенные уровни белка адгезии эндотелия VWF регистрировались как у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии, так и у пациентов не в критическом состоянии [253, 254, 255, 256]. Нарушение эндотелиальных клеток с высвобождением больших мультимеров VWF и относительно недостаточное расщепление VWF объясняет усиление взаимодействий тромбоцитов со стенкой сосудов, вызывающих тромботическую микроангиопатию.

Другие маркеры повреждения эндотелиальных клеток:

- более высокие уровни растворимого P-селектина (маркера активации эндотелия и тромбоцитов) у пациентов ОИТ;
- повышенные уровни тромбомодулина (специфический маркер активации эндотелия, высвобождается при повреждении эндотелиальных клеток) связаны с повышенным риском смертности [257];
- более высокое количество циркулирующих эндотелиальных клеток (описано у пациентов с COVID-19, особенно госпитализированных в ОИТ), положительно коррелирует с количеством тромбоцитов и лимфоцитов [258].

Учитывая важную роль эндотелия в регулировании гемостаза, фибринолиза и проницаемости стенок сосудов, эндотелиальная дисфункция в легочных микрососудах действует как пусковой механизм для иммунотромбоза и приводит к коагулопатии у пациентов с COVID-19 [259, 260, 261, 262]. Эндотелиальная дисфункция признана фактором риска дисфункции микрососудов из-за сдвига в сторону их сужения, способствующим ишемии, воспалению и прокоагулянтному состоянию [263]. Кроме того, воспалительная среда запускает экспрессию активированного тканевого фактора на эндотелиальных клетках, макрофагах и нейтрофилах, что усиливает активацию каскада коагуляции в легких [264]. Эти события подпитывают положительную иммунотромботическую петлю обратной связи, в которой гипервоспаление запускает состояние гиперкоагулянта с тромбозом в легочных микрососудах. Наконец, активация тромбоцитов в микроциркуляторном русле увеличивается у пациентов с тяжелой формой COVID-19 и связана с плохими прогнозами [265, 266]. Взаимодействия тромбоцитов со стенкой сосудов, опосредованные поверхностными рецепторами (интегринами и селектинами) и адгезивными белками (VWF и фибриноген), нарушают целостность стенки сосудов или усиливают повреждение эндотелия, что приводит к обструкции микрососудов [267]. Было обнаружено, что тромбоциты гиперактивированы у пациентов с COVID-19 и являются источником прокоагулянтных внеклеточных везикул [268] и полифосфатов, усугубляющих тромбовоспалительный каскад через нейтрофилы [269]. Активированные тромбоциты вовлечены в образование внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET) – важного элемента иммунотромбоза [270]. Все вышеперечисленное свидетельствует, что эндотелиальная дисфункция/эндотелиопатия и активация тромбоцитов являются ключевыми

особенностями коагулопатии, связанной с COVID-19, и могут опосредовать повреждение, ведущее к тяжелому заболеванию [271, 272].

ОРДС, ассоциированный с COVID-19, является результатом гипериммунной реакции хозяина на SARS-CoV-2, которая напрямую опосредуется вирусом через клеточное повреждение и высвобождение провоспалительных сигналов и косвенно опосредуется активацией комплемента. Система комплемента – неотъемлемый компонент врожденного иммунного ответа (включает более 30 различных белков).

Активация системы комплемента осуществляется тремя разными путями: классическим, лектиновым и альтернативным. Все эти пути сходятся в формировании конвертаз C3, расщепляющих C3, для генерации провоспалительного пептида C3a и большого количества C3b (опсонизирующих патогены), образующих C5-конвертазу, индуцирующую высвобождение мощного анафилатоксина C5a и фрагмента C5b, отвечающего за образование мембранного атакующего комплекса C5b-9 на клетки-мишени (конечное событие активации комплемента). К тому же провоспалительные цитокины и хемокины, высвобождаемые активированными макрофагами, усиливают порочный круг нарушения целостности сосудов, коагуляции сосудов и тромбоза за счет разрушения эндотелиального гликокаликса, активации системы свертывания и ослабления антикоагулянтных механизмов. Адгезивный фенотип эндотелиальных клеток, индуцированный воспалительными цитокинами и хемокинами, способствует инфильтрации нейтрофилами, продуцирующими большие количества гистотоксических медиаторов, включая активные формы кислорода (ROS) и внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET).

Эти события приводят к тяжелому повреждению ткани с сосудистой эндотелиальной дисфункцией и повреждением альвеолярных клеток, что объясняет прогрессирующее ухудшение несоответствия вентиляции и перфузии и микротромбоза легких [273]. Возникновение острой дыхательной недостаточности и ОРДС объясняется дезрегулированием процесса иммунотромбоза, затрагивающего легочную микроциркуляцию. Все больше доказательств, что COVID-19 – заболевание эндотелия [274], сопровождающееся повышенными уровнями PAI1 и VWF, повышенной активацией тромбоцитов и состоянием гиперкоагуляции с последующим венозным, артериальным и микрососудистым тромбозом. Одни из факторов, запускающих эндотелиопатию:

- сам вирус (вызывающий повреждение эндотелиальных клеток, запускающий каскад коагуляции с участием фибрина и тромбоцитов [275, 276]);
- иммунные клетки (нейтрофилы и/или макрофаги и тромбоциты) [277, 278, 279], инфильтрация;
- гипоксемия, индуцирующая факторы транскрипции, повышающие экспрессию тканевого фактора [280] и приводящие к образованию тромба на основе фибрина, т. о. поддерживающие тромбовоспалительную петлю обратной связи;

- опосредованное комплементом повреждение или всплеск высвобождения провоспалительных цитокинов (таких как IL-1 β и IL-6) с прямым повреждением клеток.

1.8.2.2. Механизм повышенного истощения уровня и дисфункции лимфоцитов

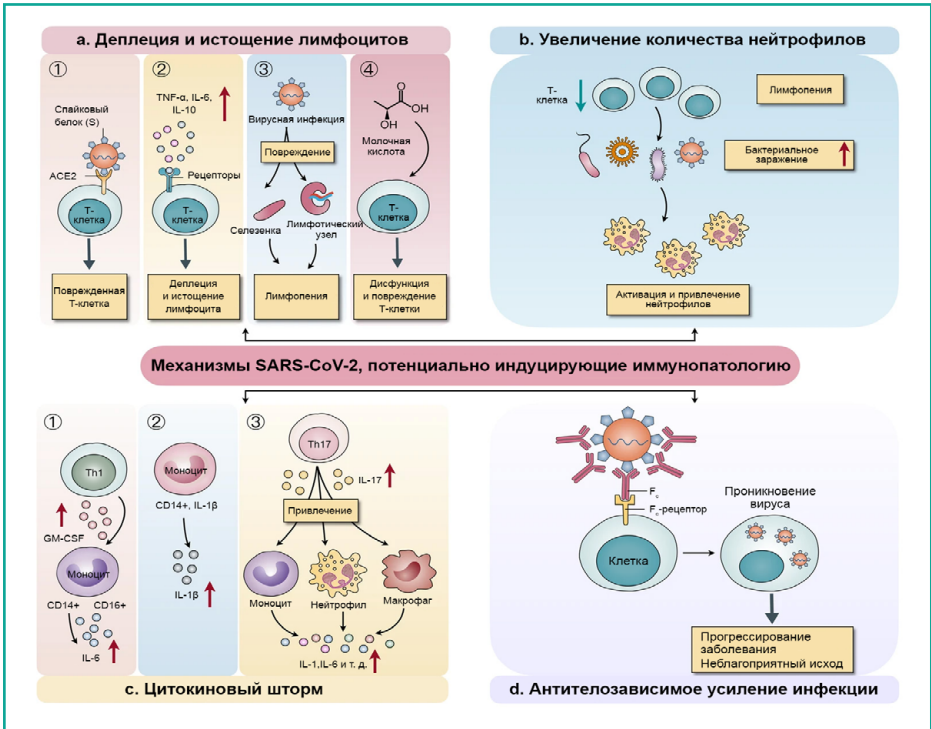


Рисунок 8. Механизмы SARS-CoV-2, потенциально индуцирующие иммунопатологию

Источник: *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2020) 5:128; <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>

Путь а: экспрессия рецептора ACE2 на Т-клетках/лимфоцитах способствует проникновению SARS-CoV-2 в лимфоциты. SARS-CoV-2 инфицирует клетки респираторного эпителия человека через взаимодействия вирусных S-белков (гликопротеин Spike) с рецепторами ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) [281]. SARS-CoV-2 способен напрямую инфицировать Т-клетки и макрофаги, что является ключевой особенностью патогенеза [282].

Сопутствующее повышение уровня воспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-10 и др. способствует повышенному истощению популяций Т-лимфоцитов, одновременно с прогрессированием заболевания [283]. SARS-CoV-2 напрямую повреждает лимфатические органы, может вызывать атрофию селезенки и некроз лимфатических узлов, что еще больше способствует лимфопении [284, 285, 286].

Повышенный уровень молочной кислоты подавляет пролиферацию лимфоцитов, поэтому его обнаруживают в крови пациентов с тяжелой формой COVID-19 [287].

Путь b: лимфопения может способствовать вторичному инфицированию микробом, что еще больше активизирует привлечение нейтрофилов в кровь. Активация нейтрофилов у пациентов с COVID-19 тесно связана с лимфопенией. Вторичное микробное инфицирование способно напрямую вызывать рекрутирование нейтрофилов в участки ткани [288, 289].

Путь c: возможные механизмы индукции цитокинового шторма:

1) CD4+ Т-клетки могут быстро активироваться в клетки Th1, секретирующие GM-CSF, и дополнительно индуцируют моноциты CD14+ CD16+ с высокими уровнями IL-6;

2) увеличение субпопуляции моноцитов CD14+ IL-1β+ приводит к увеличению продукции IL-1β;

3) клетки Th17 продуцируют IL-17 для дальнейшего рекрутирования моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и стимуляции других цитокиновых каскадов (IL-1β и IL-6 и др.).

Путь d: нейтрализующее моноклональное антитело, нацеленное на вирус, может усиливать проникновение вируса в клетки через область Fc-антитела, связанного с рецептором Fc (FcR) на клетках, что коррелирует с прогрессированием заболевания и плохими исходами пациентов с COVID-19.

1.8.2.3. Механизм антителозависимого усиления (ADE)

Антителозависимое усиление вирусной инфекции – это явление, при котором уже существующие, но в сниженных концентрациях антитела усиливают проникновение и репликацию вируса, что наблюдали у различных вирусов (Эбола и Денге) [290, 291]. При определенных заболеваниях пациенты, которые ранее были инфицированы одним штаммом вируса, а затем инфицированы другим штаммом, могут иметь худшие исходы, чем пациенты, инфицированные только один раз. Одно из объяснений этого явления кроется в различиях между двумя вирусными серотипами, которые могут поставить под угрозу способность антител, индуцированных первой инфекцией, нейтрализовать вторую. Вместо этого антитела, вызванные первой инфекцией, связывают второй штамм вируса с рецепторами константной области (Fc) антител иммуноглобулина G (IgG) на макрофагах. Этот мостик, как полагают, обеспечивает проникновение вируса в иммунные клетки, изменяя тропизм вируса [292]. В результате происходит антителозависимое усиление инфекции (ADE), что потенциально приводит к более серьезному рецидиву заболевания. Это явление часто наблюдают при снижении концентрации антител в результате ослабления иммунитета. Антитело может эффективно нейтрализовать вирус при высоких концентрациях, но вызывать усиление инфекции при сниженных концентрациях.

Эффекторные функции Fc-фрагмента IgG опосредуются связыванием Fc-домена IgG с FcγR или с компонентами системы комплемента на миелоидных клет-

ках. Такая активация происходит либо на вирионах, либо на инфицированных клетках, когда антитело связывает целевой вирусный белок.

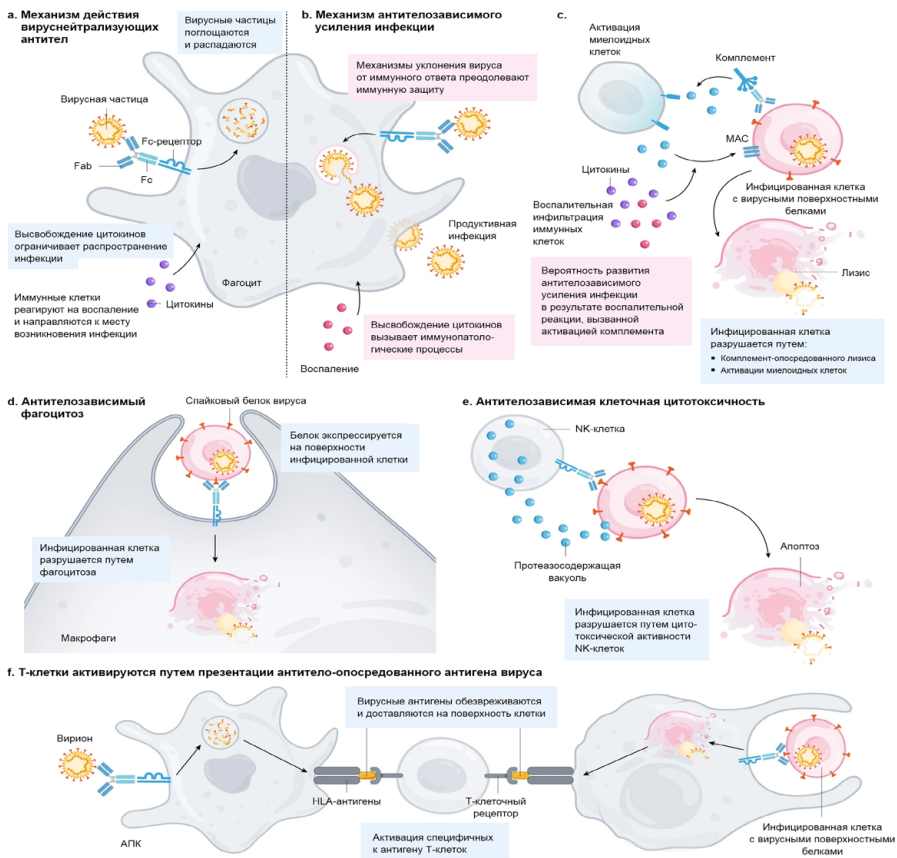


Рисунок 9. Механизм антителозависимого усиления (ADE)

Источник: Arvin, A.M., Fink, K., Schmid, M.A. et al. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature* 584, 353–363 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2538-8>

Путь а: разложение вирусных частиц и местное высвобождение цитокинов привлекают иммунные клетки.

Путь б: клетки продуцируют новые вирионы, если являются перmissive. При захвате клеткой комплексов вирус – антитело, возможен патологический цитокиновый ответ.

Путь с: связывание Fc-фрагмента IgG с C1q приводит к активации компонентов комплемента C3, C3a и C5a и комплекса атаки комплемента на мембрану (MAC),

который разрушает мембраны. Анафилатоксины C3 и C5a способствуют фагоцитозу миелоидных клеток путем привлечения воспалительных клеток, секретирующих цитокины, повышающих противовирусный иммунитет, но причиняющих вред, если производятся в избытке. Fc-домен IgG связывается с множеством типов FcγR на миелоидных клетках для запуска эффекторных функций. Последствия этого взаимодействия зависят от вовлеченного FcγR.

Путь d: антителозависимый фагоцитоз макрофагами и дендритными клетками.

Путь e: зависимая от антител цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами (NK).

Путь f: опосредованная антителами презентация антигена после поглощения вируса или им инфицированных клеток фагоцитарными клетками, активирует противовирусные Т-клетки.

Заражение SARS-CoV-2 инициируется связыванием его белка Spike (S) с рецептором входа ACE2 [293, 294]. Сообщалось также о других рецепторах SARS-CoV-2, таких как CD147 [295]. ACE2 экспрессируется на пневмоцитах альвеолярного типа II, эпителиальных клетках дыхательных путей, бокаловидных клетках носового тракта и реснитчатых эпителиальных клетках, а также на клетках кишечника и др. [296]. В большинстве таких клеток ACE2 экспрессируется в небольших количествах, но процесс экспрессии может быть активирован интерферонами [297], что теоретически будет способствовать заражению, если вирус начнет преодолевать барьеры, вызванные интерфероном.

Вопрос об эффектах ADE при SARS-CoV-2 находится в стадии изучения экспериментальными иммунологами. ADE наблюдалось при SARS, MERS и других респираторных вирусных инфекциях человека, включая респираторно-синцициальный вирус (RSV) и корь (Morbillivirus), что предполагает реальный риск ADE для вакцин против SARS-CoV-2 и вмешательств на основе антител. Однако клинические данные еще не полностью установили роль ADE в патологии COVID-19 у человека. Шаги по снижению рисков ADE от иммунотерапии включают индукцию или доставку высоких доз мощных нейтрализующих антител, а не более низкие концентрации, которые с большей вероятностью могут вызвать ADE.

1.8.3. Клинические последствия иммунопатологии, вызванной SARS-CoV-2

Лимфопения – обычное явление у пациентов с COVID-19 и критический фактор, связанный с тяжестью заболевания и смертностью [298]. Существует перекрестное взаимодействие между иммунным гомеостазом и микробами при некоторых заболеваниях [299]. У большинства пациентов, с присоединившейся микробной инфекцией отмечен низкий уровень лимфоцитов что подтверждает большую склонность пациентов с лимфопенией к микробной инфекции [300]. От одного пациента с COVID-19 можно культивировать несколько микробов [301]. В целом результаты показывают, что микробная инфекция у пациентов с COVID-19 способствует прогрессированию и тяжести заболевания.

Ретроспективные исследования пациентов продолжают демонстрировать, что почти половина умерших пациентов перенесла вторичные инфекции [302]. Среди коинфекции SARS-CoV-2:

- другие респираторные вирусы: риновирус и ортопневмовирус [303];
- бактериальные агенты: в тяжелых случаях – *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae* или *Escherichia coli* – вызывают у пациентов с SARS бактериэмию, сепсис и нозокомиальную пневмонию [304], *Burkholderia cepacia* complex (BCC) [305, 306], *Staphylococcus epidermidis* [307, 308] или *Mycoplasma spp.* (включая *M. hominis* и *M. Orale*) широко распространены в стационарах и действуют как резервуары для генов устойчивости к антибиотикам (ARG) [309, 310, 311], хотя обычно вызывают легкие симптомы; в легких случаях – *Veillonella*, *Neisseria*, *Streptococcus* и *Prevotella* [312];
- грибковые агенты: (1-3) - β -D-глюкан (общий компонент клеточной стенки грибов) в образцах крови больных COVID-19.

Влияние повышенной продукции цитокинов на клинические проявления

Несбалансированный и неограниченный врожденный иммунный ответ, реализующийся за счет эффективного адаптивного иммунитета, лежит в основе прогрессирования COVID-19.

В тяжелых случаях COVID-19 наблюдают:

- массивную эндотелиальную дисфункцию, широко распространенную коагулопатию и тромбоз, вызванные активацией каскада комплемента, способные привести к развитию системной микроангиопатии, тромбозомболии и к полиорганной недостаточности;
- цитокиновый шторм, способный привести к вирусному сепсису и повреждению легких, с клиническими проявлениями ОРДС, дыхательной недостаточности, шока, органной недостаточности и, возможно, летального исхода [313];
- полиорганную недостаточность в результате иммунных реакций, опосредованных SARS-CoV-2 [314, 315, 316, 317];
- высокие уровни (\uparrow) провоспалительных цитокинов, в ряде случаев приводящих к повреждению тканей [318]: CXCL10, CCL7 и IL-1RA – связаны с дисфункцией, повреждением легких и с летальным исходом [319];
- повышение уровня (\uparrow) IL-6 – соотносится с биомаркерами дисфункции печени, почек и сердца [320];
- повышение уровня (\uparrow) IL-10 – соотносится с уровнем γ -глутаминтрансферазы;
- нарушения функции печени и повышение (\uparrow) уровней АЛТ и/или АСТ;
- отклонения в электрокардиограммах, свидетельствующие о нарушениях деятельности сердечно-сосудистой системы;

- нарушения функции почек с повышенным уровнем: (↑) азота мочевины и/или креатинина, креатинкиназы и лактатдегидрогеназы [321].

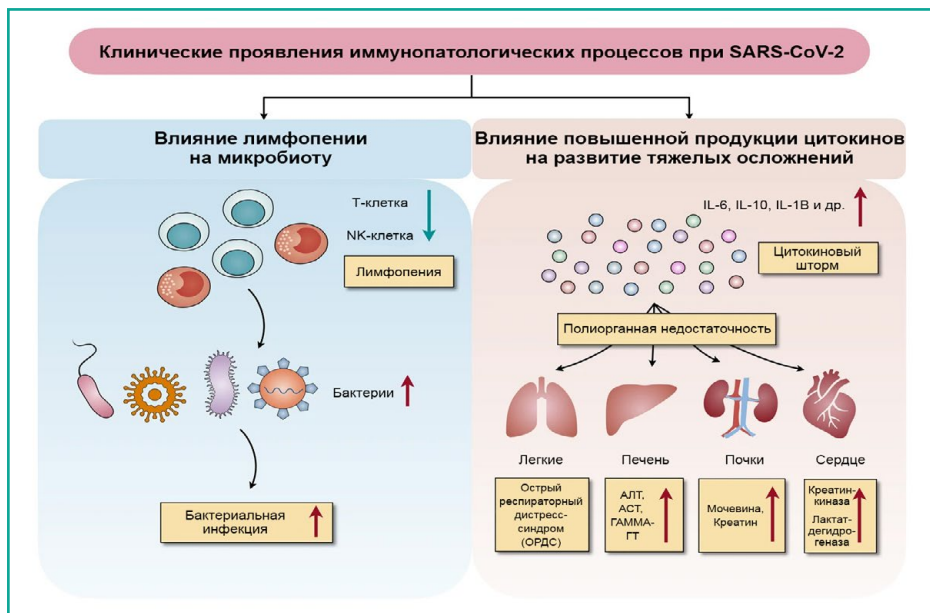


Рисунок 10. Влияние лимфопении на микробную инфекцию и эффект увеличения выработки цитокинов в возникновении иммунопатологических синдромов SARS-CoV-2

Источник: *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2020) 5:128; <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>

1.9. Поствакцинальный протективный иммунитет

Исследователи работают над устранением возникающих пандемий. В случае новых патогенов, таких как SARS-CoV-2, который вызвал недавнюю глобальную вспышку, срочно требуются эффективные вакцины [322]. Сотни вакцин против SARS-CoV-2 с использованием различных стратегий, таких как живые аттенуированные или инактивированные патогены, вирусные векторы, вирусные РНК, ДНК, рекомбинантные белки, пептиды и т. д., сейчас находятся в стадии разработки, а некоторые проходят клинические испытания [323].

Стратегии вакцинации должны разрабатываться с учетом ряда сложностей, связанных с приоритетом доступа к вакцинам COVID-19 в различных группах населения, надежной оценкой риска побочных эффектов вакцинации в группах населения с повышенным риском тяжелой формы COVID-19 (пожилые люди и лица с сопутствующими заболеваниями), материально-техническим обеспечением вакцины (поставка холодной цепи), достаточным охватом иммунизацией

и продолжительностью защитного иммунного ответа. Согласно профилям целевых продуктов ВОЗ для вакцин COVID-19 [324], характеристики, необходимые для экстренного использования во время вспышки, включают: эффективность не менее 50 %, пригодность для использования у пожилых людей, максимум двухдозовый режим и защиту не менее 6 месяцев. Для получения информации о продолжительности защитного иммунного ответа после вакцинации необходимы дальнейшие исследования вакцин-кандидатов.

Согласно проекту ландшафта ВОЗ вакцин-кандидатов от COVID-19, на текущий период времени 164 кандидата проходят клиническую оценку (в том числе 13 на фазе 3). Вакцины-кандидаты фазы 3 включают различные платформы для вакцин: векторные вакцины (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи (Gam-COVID-Vac (Sputnik V)), Оксфордский университет/«АстраЗенека», CanSino Biological Inc/Пекинский институт биотехнологии и Janssen Pharmaceutical Companies), вакцины на основе мРНК (Moderna/Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний и BioNTech/Fosun Pharma/Pfizer), инактивированные вакцины (SinoVac, Уханьский институт биологических продуктов/Sinopharm, Пекинский институт биологических продуктов/Sinopharm и Bharat Biotech), наночастицы рекомбинантного белка с адьювантами (Novavax) и одна цельноклеточная инактивированная вирусная вакцина (BBV152; Bharat Biotech). Эти плюс еще три вакцины без общедоступных данных об эффективности – пептидная вакцина EpiVacCorona (Центр вирусологии VECTOR, Россия), инактивированная вакцина CoviVac (Центр Чумакова, Россия) и рекомбинантная вакцина ZF2001 (Anhui Zhifei Longcom/ Китайская академия Наук) – получили разрешения для применения в чрезвычайных ситуациях в некоторых странах [499]. Однако необходимость разработки новой вакцины за короткий период времени не должна сводить на нет такие основные принципы вакцинации, как безопасность и иммунная защита.

Иммунное решение генерировать устойчивый или слабый гуморальный иммунный ответ возникает во время взаимодействия хозяин – патоген и зависит от уровня вирусной нагрузки или воспалительных сигналов. Низкоуровневое заражение может вызывать только слабые, плохо функционирующие антитела. И наоборот, заражение с высокой нагрузкой может привести к генерации мощного и функционально устойчивого гуморального иммунного ответа, запрограммированного на агрессивный ответ при повторном контакте с патогеном. Иммунный ответ также может зависеть от генетики или пола хозяина, где аллели лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и пол четко связаны с дифференциальным ответом на вакцинацию [235, 326]. Наличие перекрестно-реактивного Т-клеточного иммунитета у индивидуумов до пандемии или здоровых людей повышает способность антител, выработанных против эндемичных распространенных коронавирусов, обеспечивать дополнительный или компенсаторный иммунитет при бессимптомной или легкой форме COVID-19 [327]. Специфические для SARS-CoV-2 устойчивые Т-клеточные ответы наблюдались только у людей, которые вызвали широкие функциональные гуморальные иммунные ответы, т. е. у выздоравливающих субъектов с симптоматической инфекцией. Эти данные позволяют предполо-

жить, что Т- и В-клеточные ответы, вероятно, развиваются синхронно. Остается неясным, могут ли дополнительные тканевые резидентные клетки существовать и сохраняться в дыхательных путях бессимптомных индивидуумов, которые вызывают более низкие ответы антител.

В отличие от естественной бессимптомной/легкой инфекции, вакцины против SARS-CoV-2 вызывают устойчивые гуморальные иммунные ответы, вызывающие нейтрализацию почти на всех уровнях, которые наблюдали у выздоравливающих индивидуумов с симптомами, после двух раундов иммунизации [328, 329, 330, 331]. Необходимость в нескольких раундах иммунизации предполагает, что может потребоваться больше антигена или бустерная иммунизация, чтобы подтолкнуть иммунную систему к выработке функционального иммунитета, требующегося для защиты. Таким образом, бустерная вакцинация, в отличие от легкой/бессимптомной естественной инфекции, вероятно, приведет к индукции широкого устойчивого защитного иммунитета. Более того, несколько вакцинных платформ индуцируют Т-клеточный иммунитет, который может быть необязательным для стерилизующей защиты, но стимулирует выработку антител для инактивации и выведения вируса в случае инфицирования.

На базе Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи (Москва, Россия) разработана гетерологичная вакцина Gam-COVID-Vac (Sputnik V) на основе рекомбинантного аденовируса (rAd) с использованием аденовируса 26 (Ad26) и аденовируса 5 (Ad5) в качестве векторов для экспрессии спайкового белка (S) SARS-CoV-2. Рекомбинантный аденовирусный путь к защите аналогичен вакцине Oxford – Astra Zeneca, в которой используется аденовирус шимпанзе (ChAdOx) [332], вакцина Johnson & Johnson, в которой используется только Ad26 [333], чьи подробные результаты ожидаются в ближайшее время, а также вакцина на основе Ad5 от CanSinoBIO–Пекинского института биотехнологии, чьи испытания фазы 3 начались в сентябре 2020 года [334]. Вирусы-носители модифицированы и не могут инициировать продуктивное заражение. Проникая в клетки, они экспрессируют спайковый белок (S), а затем приостанавливают свои функции, поскольку не могут продолжать нормальный жизненный цикл вируса. Тем не менее высокочувствительный анализ показал, что несколько генов Ad были экспрессированы, хотя и на низком уровне [335]. Клетки, инфицированные в результате вакцинации, в конечном итоге уничтожаются самим иммунным ответом, который они призваны вызывать. Рекомбинантные аденовирусы широко используются в качестве векторов для вакцин, т. к. могут вмещать большие генетические нагрузки и, хотя не способны реплицироваться, запускают сенсоры врожденного иммунитета, в достаточной степени обеспечивающие надежный ответ иммунной системы [336]. Следовательно, им не требуется адьювант и они могут обеспечить иммунитет уже после однократной дозы [337]. Считается, что их физическая прочность позволяет хранить их при температуре около -18°C , что приемлемо для многих цепочек поставок. Первоначально отечественная вакцина Gam-COVID-Vac (Sputnik V) была разработана в двух формах: жидкой (которая хранится при -18°C) и лиофилизированной (которая хранится при $2-8^{\circ}\text{C}$). В ходе 1/2 фаз испытаний изучалась жидкая форма

вакцины, которая требует хранения при -18°C . Хранение лиофилизированной формы вакцины при $2-8^{\circ}\text{C}$ – благоприятном температурном режиме для глобального распространения – одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации. В ходе вакцинации использование двух различных серотипов, которые назначаются с интервалом в 21 день, предназначено для преодоления любого ранее существовавшего аденовирусного иммунитета в популяции [332]. Среди основных вакцин против COVID, разрабатываемых на сегодняшний день, только Gam-COVID-Vac использует этот подход. В других, таких как вакцина Oxford/AstraZeneca, для обеих доз используется один и тот же материал.

Отечественная вакцина Gam-COVID-Vac (Sputnik V) показала хороший профиль безопасности и вызвала сильные гуморальные и клеточные иммунные ответы у участников фазы 1/2 клинических испытаний. В открытом доступе находятся предварительные результаты по ее эффективности и безопасности из промежуточного анализа исследования фазы 3. Результаты испытаний показали устойчивый сильный защитный эффект во всех возрастных группах участников. Реципиенты генерировали устойчивые ответы антител, в том числе нейтрализующих, на спайковый белок (S), часть общего иммуноглобулина, которая ингибирует связывание вируса с его рецептором. Они также продемонстрировали свидетельства Т-клеточного ответа, соответствующего иммунному ответу, который не должен быстро ослабевать [338].

Российское исследование III фазы также показало, что даже одна доза на 73,6 % эффективна в предотвращении умеренных и тяжелых заболеваний. Это привело к тому, что российские органы здравоохранения одобрили однократную дозу Sputnik Light, в которой используется вектор rAd26. В мае 2021 года на основе данных собственной программы вакцинации страны [500, 501, 502] показано, что Sputnik Light эффективен на 79,4 % в предотвращении симптоматических заболеваний.

С тех пор еще не опубликованное исследование Министерства здравоохранения Буэнос-Айреса в Аргентине с участием 40 387 вакцинированных и 146 194 невакцинированных людей в возрасте 60-79 лет показало, что однократная доза Sputnik Light снизила симптоматические инфекции на 78,6 %, количество госпитализаций – на 87,6 % и смертей – на 84,7 % [503].

Вакцины имеют значительно большее влияние на сокращение циркуляции вирусов, чем естественный иммунитет, т. к. выясняется, что приобретенный естественным образом защитный иммунитет требует повышения за счет повторных встреч с инфекцией (при необходимости вакцины можно регулярно усиливать). Кроме того, учитывая, что появляется все больше сообщений о долгосрочных осложнениях даже после COVID-19 в легкой форме, вакцины, вероятно, станут более безопасным вариантом для людей, не относящихся к группе риска.

По мере появления новых вариантов SARS-CoV-2, быстрее распространяющихся или ускользающих от защитных реакций иммунитета, на текущий период времени не изучено, какая из существующих вакцин будет наиболее эффектив-

на в отношении них. Не исключено, что могут потребоваться дополнительные «бустерные дозы» для продления иммунитета или укрепления его против появляющихся разновидностей SARS-CoV-2. Одна из возможностей обновления вакцин заключается в замене старых версий спайк-белка в вакцинах, основанных на вирусе, который был впервые идентифицирован в Ухане, на обновленную молекулу, имеющую определенные аминокислотные изменения, препятствующие ответу антител. Но сначала исследователям необходимо определить возможные побочные эффекты, которые изменяют реакцию иммунной системы на обновленную вакцину. Другая возможность – включить в один укол как новые, так и старые формы белка-шипа – ученые называют это мультивалентной вакциной. Тем не менее на текущий период времени не известно, как человек, вакцинированный вакциной от COVID-19 первого поколения, отреагирует на новую вакцину против нового варианта. Иммунологи давно заметили, что люди склонны вызывать более устойчивые иммунные ответы на первый вариант патогена, с которым они сталкиваются, чем на последующие варианты. Это явление может означать, что обновленные вакцины могут вызывать более приглушенный иммунный ответ, чем реакция на первую вакцину. Есть опасения, что усиление одним из вариантов не приведет к новому ответу на этот вариант, а только усилит старый отклик. Некоторые исследователи ожидают, что периодические обновления вакцин против коронавируса, как и в случае с гриппом, станут образом жизни [339].

1.10. Новые варианты SARS-CoV-2

Все вирусы, в том числе SARS-CoV-2, со временем мутируют. По состоянию на 8 января 2021 года Британский консорциум геномики COVID-19 (COG-UK) секвенировал свыше 170 000 вариантов вируса.

Наиболее известные варианты SARS-CoV-2

VOC 202012/01 (линия B.1.1.7/ Alpha). Происхождение неизвестно. Этот вариант зарегистрирован не менее чем в 32 странах. Первоначальный анализ показал, что этот вариант может быть более трансмиссивным. Его влияние на тяжесть заболевания, смертность или повторное заражение находятся в стадии изучения [340, 341, 342]. Сообщают, что частота повторного инфицирования будет выше, если у пациента впервые обнаружен именно этот вариант. Сообщаемый уровень повторного инфицирования составляет 11 % у людей, не имеющих варианта, и 14,7 % у людей с вариантом, во всех регионах и возрастных группах (по данным с 30 ноября по 20 декабря 2020 года). Расчетная частота повторного инфицирования на 10-70 % выше, чем у вирусов дикого типа для некоторых регионов и возрастных групп [343]. Однако известно, что частота повторного инфицирования для невариантных форм колеблется в широких пределах. Представлены убедительные доказательства перекрестной нейтрализующей активности сывороток реконвалесцентов. Сыворотка людей, инфицированных B.1.1.7, проявляет нейтрализующую активность против вирусов других линий и наоборот [344].

V.1.351 lineage (20H/501Y.V2). Впервые обнаружен в Южной Африке в октябре 2020 года. Зафиксирован на текущий период в 5 странах. Мутации его шиповидного белка аналогичны VOC 202012/01. Этот вариант является самым тревожным, т. к. лабораторно доказано, что он несет мутации, подрывающие эффективность инактивирующих вирус нейтрализующих антител у вакцинированных вакцинами Pfizer/Moderna. Секвенирование показало, что мутация N501Y имеет независимое происхождение. В настоящее время в стадии изучения ее влияние на контактиозность заболевания, тяжесть течения и смертность [345].

VOC 202101/02 или линия P.1 (20J/501Y.V3). Впервые обнаружен в Японии у бразильских путешественников. Вариант содержит три мутации в домене рецептора шиповидного белка, которые могут влиять на его контактиозность и антигенный профиль [346]. Для более полного понимания эффекта этой мутации продолжаются дальнейшие исследования.

Линия V.1.1.207. Две мутации впервые обнаружены в Нигерии. Эти две последовательности не тождественны между собой, каждая из них имеет одну, общую с линией V.1.1.7 последовательность спайкового белка. В настоящее время в стадии изучения их влияние на контактиозность заболевания, тяжесть течения и смертность [347].

Вариант кластера 5. Обнаружен в Дании, ассоциируется с передачей заболевания от выращиваемых норок. Обусловленные им клинические последствия не изучены. В этом варианте отмечены мутации спайкового белка. После того, как все норки на норковых фермах, где было зафиксировано заражение, были забиты, новых случаев заражения людей не зарегистрировано. Случаи данного варианта среди выращиваемых норок зафиксированы в 8 странах [348, 349].

Вариант V.1.617 (Delta). Впервые был зарегистрирован в Индии в конце прошлого года, распространился на десятки других стран, включая США, Сингапур и Соединенное Королевство, где стал доминирующим. Выделено три подтипа, известные как V.1.617.1, V.1.617.2 и V.1.617.3, каждый из которых имеет немного различающийся генетический состав. Подтип V.1.617.1 несет мутацию, называемую 484Q, которая более тесно связана с ускользанием от действия вакцины [461]. Эта мутация отсутствует в подтипе V.1.617.2, который является более трансмиссивным. V.1.617.2 имеет свои мутации 452R и 478K, которые определяют его повышенную способность к передаче. Обе мутации изменяют белок-спайк, который вирус использует для проникновения в клетки человека. Число инфекций, опосредованных V.1.617.2, может расти ежедневно на 13 % быстрее, т. к. этот подтип более чем на 50 % трансмиссивен, чем V.1.1.7. Обнадуживает то, что никакие мутации ни в одном из подтипов вариантов V.1.617 не связаны с усилением тяжести заболевания.

1.11. Коллективный иммунитет

Коллективный иммунитет – ключевая концепция борьбы с эпидемиями. Его суть в том, что только часть населения должна быть невосприимчивой (за счет преодоления естественной инфекции или путем вакцинации) к инфекционному агенту, чтобы прекратить крупные вспышки.

Коллективный иммунитет достигается, когда один инфицированный человек в популяции вызывает в среднем менее одного вторичного случая, что соответствует эффективному репродуктивному числу R – среднему числу людей, инфицированных этим случаем, опускающемуся ниже 1 при отсутствии вмешательств.

В популяции, в которой люди смешиваются однородно и одинаково восприимчивы и заразны:

$$\text{Уравнение 1: } R = (1 - p_c) (1 - p_i) R_o,$$

p_c – относительное снижение скорости передачи из-за отсутствия инфекции или при наличии фармацевтических вмешательств;

p_i – доля иммунных особей;

R_o – репродуктивная численность при отсутствии мер борьбы в полностью восприимчивой популяции.

R_o – может варьироваться в зависимости от популяции и с течением времени, в зависимости от характера и количества контактов между людьми и потенциально факторов окружающей среды.

При отсутствии мер контроля ($p_c = 0$) условие коллективного иммунитета ($R < 1$, где $R = (1 - p_i) R_o$) достигается, когда доля иммунных особей достигает $p_i = 1 - 1 / R_o$.

Для SARS-CoV-2 большинство оценок R_o находятся в диапазоне 2,5-4 без четкой географической картины.

Для $R_o = 3$, по оценке для Франции [350], ожидается, что порог коллективного иммунитета для SARS-CoV-2 потребует 67 % иммунитета населения.

Из Уравнения 1 также следует, что в отсутствие коллективного иммунитета интенсивность мер социального дистанцирования, необходимых для контроля передачи, снижается по мере роста популяционного иммунитета. Например, для сдерживания распространения при $R_o = 3$ необходимо снизить уровень передачи на 67 %, если население полностью восприимчиво, и только на 50 %, если треть населения уже имеет иммунитет.

Бывают ситуации, когда коллективный иммунитет может быть достигнут до того, как популяционный иммунитет достигнет $p_i = 1 - 1 / R_o$.

Например, некоторые люди имеют больше шансов заразиться и передать инфекцию по причине того, что у них больше контактов, эти суперраспространители заразятся первыми. В результате популяция восприимчивых людей быстро истощается от этих суперраспространителей и скорость передачи замедляется. Однако количественно оценить влияние этого явления в контексте COVID-19 по-прежнему сложно. Для $R_o = 3$ показано [351], что если учитывать возрастные особенности контактов (например, люди в возрасте >80 лет имеют значительно меньше контактов, чем люди в возрасте 20-40 лет), то порог коллективного иммунитета снижается с 66,7 до 62,5 %. Если далее предположить, что коли-

чество контактов существенно различается между людьми в одной возрастной группе, коллективный иммунитет может быть достигнут только с 50 %-ным популяционным иммунитетом. Однако в этом сценарии отклонение от формулы $p_i = 1 - 1/R_0$ ожидается только в том случае, если это всегда одна и та же группа людей, которые являются потенциальными суперраспространителями. Если сверхраспространение обусловлено событиями, а не отдельными людьми, или если меры контроля сокращают или изменяют набор потенциальных суперраспространителей, это может оказывать ограниченное влияние на коллективный иммунитет. Еще один фактор, который может способствовать снижению порога коллективного иммунитета для COVID-19, – это роль детей в передаче вируса. Предварительные отчеты показывают, что дети, особенно младше 10 лет, могут быть менее восприимчивыми и заразными, чем взрослые. В таком случае их можно частично исключить из расчета коллективного иммунитета [352].

Иммунитет населения обычно оценивают посредством исследований репрезентативных выборок с использованием серологических тестов, измеряющих гуморальный иммунитет. Обследования, проведенные в странах, затронутых эпидемией COVID-19 на раннем этапе, таких как Испания и Италия, показывают, что общенациональная распространенность антител колеблется от 1 до 10 % с пиками около 10-15 % в сильно пострадавших городских районах [353]. Это согласуется с более ранними прогнозами, сделанными на основе математических моделей с использованием статистических данных по количеству смертей и оценок коэффициента смертности от инфекций, то есть вероятности смерти с учетом инфекции [354, 355]. Были утверждения, что гуморальный иммунитет не охватывает весь спектр защитного иммунитета от SARS-CoV-2, что первая волна эпидемии привела к более высокому уровню иммунитета среди населения, что подтверждено исследованиями уровня антител. Действительно, Т-клеточная реактивность была документально подтверждена при отсутствии детектируемого гуморального иммунитета среди контактировавших с пациентами [356], хотя уровень такой иммунной защиты и продолжительность наблюдаемого ответа неизвестны. Неизвестно, может ли ранее существовавший иммунитет к коронавирусам простуды обеспечить некоторый уровень перекрестной защиты. В нескольких исследованиях сообщалось о перекрестно-реактивных Т-клетках у 20-50 % лиц, ранее не инфицированных SARS-CoV-2 [357]. Однако еще предстоит определить способность этих Т-клеток предотвращать заражение SARS-CoV-2 или защищать от тяжелой формы заболевания [357]. Предварительные отчеты об исследованиях среди детей не показали корреляции между прошлыми инфекциями сезонных коронавирусов и восприимчивостью к SARS-CoV-2 [358].

Мало доказательств того, что распространение SARS-CoV-2 может прекратиться естественным путем до того, как по крайней мере 50 % населения станет иммунным. Что потребуется для достижения 50 % иммунитета у населения? В настоящее время неизвестна долгосрочность естественного иммунитета к SARS-CoV-2 (иммунитет к сезонным коронавирусам обычно относительно недолговечен), особенно среди перенесших легкие формы болезни. Потребуется ли для них несколько раундов повторного заражения прежде, чем будет достигнут устойчивый

иммунитет? Случаи реинфекции задокументированы в очень ограниченном количестве, и неясно, это редкость или обычное явление, как предыдущая инфекция повлияет на течение COVID-19 при повторной инфекции?

При пандемиях гриппа коллективный иммунитет обычно достигается после двух-трех эпидемических волн, каждая из которых прерывается типичной сезонностью вируса гриппа и реже перекрестным иммунитетом к ранее встречавшимся вирусам гриппа и вакцинам [359]. Коэффициент летальности от COVID-19 составляет 0,3-1,3 %. Стоимость достижения коллективного иммунитета посредством естественной инфекции будет очень высокой, особенно в отсутствие возможности улучшенного ведения пациентов и защиты их от риска серьезных осложнений. Если предположить, что оптимистичный порог коллективного иммунитета составляет 50 %, то для таких стран, как Франция и США, это приведет к 100 000-450 000 и 500 000-2 100 000 смертей соответственно.

Эффективная вакцина – это самый безопасный способ добиться коллективного иммунитета. Распределение вакцин может быть специальным образом нацелено на группы населения, подверженные высокому риску, например, на медицинских работников или лиц, часто контактирующих с другими людьми по роду деятельности. Более того, количество летальных исходов можно предотвратить, нацелившись на очень уязвимые группы населения – на пожилых людей.

1.12. Возраст как фактор риска тяжелого COVID-19

Риск развития тяжелой формы COVID-19 резко возрастает после 70 лет и при наличии признаков ожирения и других факторов. У пожилых людей обычно более слабый ответ на IFN типа I при вирусной инфекции, что еще больше ухудшает ситуацию [360]. Было показано, что дополнительные маркеры воспаления, такие как активация NLRP3 [361], секреция IL-6, IL-12 и IL-1 β [362] и др., позволяют прогнозировать тяжелое течение COVID-19. С учетом того, что тимус снижает выработку наивных Т-клеток в результате инволюции (примерно на 3 % в год, быстрее у мальчиков, чем у девочек) [363], людей пожилого возраста больше защищают реакции памяти Т-клеток.

Новорожденные и маленькие дети вырабатывают меньшее количество IFN типа I при стимуляции различными вирусами [364]. Риск тяжелого заболевания SARS-CoV-2 у них ниже, чем риск других респираторных вирусных инфекций (например гриппа) [365]. Дети не склонны к развитию тяжелой формы COVID-19, хотя у них могут наблюдаться высокие вирусные титры [366], что, возможно, обусловлено наличием перекрестно-реактивных антител к простудным коронавирусам или существенными различиями в состояниях иммунной системы молодых и пожилых людей. Одним из примеров может быть перекося Т-клеток от Т-хелперов Th1 к большому количеству Th2 у маленьких детей [367]. Во всех возрастных группах моложе 18 лет более 50 % детей испытывали легкие симптомы или не имели симптомов вовсе, у менее чем 6 % детей развивались тяжелые симптомы [368].

1.13. Пол как фактор риска тяжелого COVID-19

Мужчины имеют гораздо больший риск тяжелого острого COVID-19, чем женщины. Как упоминалось выше, ответы на IFN типа I являются критическими детерминантами тяжести заболевания во время острой инфекции SARS-CoV-2, т. к. вирус способен их подавлять. Женщины вызывают более сильные ответы IFN типа I [369] и развивают более сильные ответы на вакцины [370], но у них больше побочных эффектов и лучшие показатели выживаемости при ряде острых инфекций, чем у мужчин [371]. При COVID-19 наблюдается разница в уровне летальности между мужчинами (2,8 %) и женщинами (1,7 %) [372]. Поскольку ACE 2 расположен на X-хромосоме, могут присутствовать аллели, которые придают устойчивость к COVID-19, что объясняет разницу в летальности. Эти половые различия наблюдаются даже у мальчиков и девочек до полового созревания, что указывает на генетические, а не на гормональные различия. Стоит отметить, что общий сенсор вирусов TLR7 экспрессируется на X-хромосоме, обеспечивая возможную разницу в эффекте дозирования генов между мужчинами и женщинами [373]. Кроме того, следует учитывать, что половые гормоны эстроген и тестостерон имеют различные иммунорегуляторные функции, которые могут влиять на иммунную защиту и, следовательно, тяжесть заболевания [374].

Интересно, что нейтрализующие аутоантитела к IFN типа I, обнаруженные у пациентов с тяжелой формой COVID-19, были намного больше у мужчин, чем у женщин, по неизвестным причинам [375]. В совокупности различия иммунного ответа между пациентами мужского и женского пола с COVID-19 могут объяснить общую восприимчивость пациентов мужского пола к развитию тяжелого острого COVID-19 [376]. Тем не менее, мультисистемный воспалительный синдром (MIS-C) довольно равномерно распределяется между мальчиками и девочками [377], тогда как длительный COVID чаще встречается у женщин [378, 379].

1.14. Группа крови как фактор риска тяжелого COVID-19

Полногеномные ассоциации и эпидемиологические исследования показали, что пациенты с группой крови А имеют более высокий риск, чем с группой крови О, и с позитивным резус-фактором (Rh+) – более высокий риск, чем с отрицательным резус-фактором (Rh-). Группа крови – потенциальный наследственный признак, предрасполагающий к инфекции SARS-CoV-2 и тяжелому течению болезни [462].

Обнаружена умеренно повышенная распространенность инфекции среди групп крови, отличных от О, и среди резус-положительных лиц. Риск интубации чаще всего повышен среди типов АВ и В и снижен среди А и резус-отрицательных типов. Риск смерти немного повышен среди людей с типом АВ и снижен среди типов А, В и резус-отрицательных типов [463].

Механизм потенциальной защиты, обеспечиваемый группой крови, идентифицированной в крупных популяционных исследованиях, требует дальнейшего изучения.

1.15. Сопутствующие заболевания как фактор риска тяжелого COVID-19

Нарушения обмена веществ, ожирение [464], диабет [465] и заболевание почек [466] усиливают тяжесть течения COVID-19. Хотя механизмы остаются неизвестными, ожирение как фактор риска может быть следствием ослабленного интерферонового ответа типа I, обнаруженного у людей с ожирением [467]. Исследование, которое не включало индекс массы тела (ИМТ) в качестве фактора, показало, что у лиц с тяжелым заболеванием, требующим искусственной вентиляции легких, более вероятно снижение уровня интерферона I типа в плазме [468].

Сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертонию, врожденные пороки сердца и ишемическую болезнь сердца [469], не только усиливают тяжесть заболевания, но и способствуют обострению ранее существовавших состояний после выздоровления [470].

1.16. Реинфекция (повторное заражение) SARS-CoV-2

Данные о случаях реинфицирования (повторного заражения) ограничены. Исследования показали, что частота повторного положительного результата в ОТ-ПЦР у пациентов через 1-60 дней после выздоровления составляет 7-23 % в исследованиях с расчетной совокупной частотой 12 % [490]. Пациенты в более молодом возрасте и с более длительным начальным заболеванием более склонны к повторному положительному результату в ОТ-ПЦР, тогда как пациенты с тяжелым заболеванием, диабетом и низким числом лимфоцитов имеют более низкую такую вероятность [491]. В настоящее время до конца не понятно, повторное ли это заражение, или это зависит от типа отбираемого образца, или от технологических ошибок при выполнении ОТ-ПЦР, или связано с инфицированием мутировавшим SARS-CoV-2, или из-за постоянного выделения вируса в результате персистенции, либо с ложноотрицательным результатом теста во время выписки [492].

В исследованиях неоднократно наблюдали положительные результаты ОТ-ПЦР в течение 90 дней после первоначального заражения. Следовательно, наиболее вероятно, что эти случаи на самом деле являются затяжными начальными инфекциями. Важно отметить, что несмотря на выявление стойкого вирусывыделения в течение 90 дней после начала развития инфекции, репликационно-компетентный вирус не был идентифицирован через 10-20 дней после появления симптомов (в зависимости от тяжести заболевания) [493]. Истинные случаи повторного заражения, определяемые как два эпизода заражения штаммами вирусов с разными геномными последовательностями с интервалом не менее 3 месяцев, были зарегистрированы в Гонконге, Индии, Эквадоре и Бельгии [494, 495, 496]. Два возможных случая повторного заражения также были зарегистрированы в США, однако, хотя разные геномные варианты были ответственны за два эпизода у обоих мужчин, инфекции возникли с интервалом менее 2 месяцев [497, 498].

2

ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА НАСЕЛЕНИЯ НА SARS-COV-2 В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

2.1. Общие нормативные требования

Целью применения настоящих рекомендаций является обеспечение безопасности пациента и медицинского персонала при проведении обследования на SARS-CoV-2 с выполнением лабораторных методов, получения достоверных результатов исследований, использования их для верификации диагноза, осуществления лечебных мер, мониторинга и прогнозирования состояния пациента и осуществления эпидемиологического мониторинга за COVID-19.

Деятельность лабораторий осуществляется на основании лицензии, предоставляемой в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, в соответствии с Положением о лицензировании медицинской деятельности Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» и санитарно-эпидемиологическим заключением о возможности проведения работ с возбудителями I-IV групп патогенности.

Лаборатории на территории РФ, выполняющие работы с биологическим материалом от больных и/или с подозрением на COVID-19, должны обязательно соблюдать требования нормативных правовых актов:

- СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами»;
- СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»;
- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2518-09. Дополнения и изменения №1 к СП 1.3.2322-08;
- СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности»;
- СП 2.1.3678-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации

помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг»;

- СП 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;
- Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 18.12.2020г. №928н «Об утверждении Правил по охране труда в медицинских организациях».

Несоблюдение требований вышеперечисленных нормативных документов приводит к возникновению угрозы жизни и здоровью человека, способствует распространению новых случаев COVID-19. За нарушение санитарного законодательства предусмотрена дисциплинарная, административная и уголовная ответственность (ст. №1, №39, №55 ФЗ России №52 от 30.03.1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»; ст. 248 УК РФ).

В лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III-IV групп патогенности, допускается проведение иммунологических (серологических) исследований по обнаружению в крови людей антигенов микроорганизмов II группы патогенности (без накопления возбудителя) и/или антител к ним [380].

Организацию комплекса мероприятий по биологической безопасности в медицинской организации в целом обеспечивает ее руководитель, а по подразделениям – их заведующие.

Территория должна иметь ограждение, препятствующее бесконтрольному проникновению посторонних лиц.

2.2. Общие требования к специалистам

Исследование материала, подозрительного и/или содержащего микроорганизмы I-IV групп патогенности, имеют право проводить специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием, окончившие соответствующие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА I-II групп и с микроорганизмами III-IV групп патогенности. Требования к знаниям и умениям специалистов должны соответствовать образовательным стандартам и другим нормативным документам, действующим на территории РФ.

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, име-

ющие санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности [380].

Специалисты с высшим профильным образованием осуществляют контроль всего технологического процесса, принимают решение о необходимости дополнительных исследований (повторное проведение исследования и т. п.). Врачи клинической лабораторной диагностики оказывают консультативную помощь врачам-инфекционистам в интерпретации результатов анализов, целесообразности проведения дополнительных исследований для верификации диагноза, в осуществлении лабораторного мониторинга в процессе лечения пациента.

Специалист со средним медицинским образованием и соответствующей квалификацией (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант), имеющий сертификат специалиста и прошедший периодическое повышение квалификации в установленном порядке, выполняет: прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов, регистрацию полученного биологического материала, проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации специалиста с высшим образованием, в том числе подготовку помещений, расходных материалов, утилизацию использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов.

Допуск специалистов к работе с ПБА оформляют приказом руководителя медицинской организации по результатам проверки знаний по биологической безопасности и профилактического медицинского осмотра с периодичностью 1 раз в 2 года.

Инструктаж по соблюдению требований биологической безопасности должен проводиться не менее 1 раза в год [381].

Инструктаж по биологической безопасности специалистов, выполняющих работы с микроорганизмами II группы патогенности, проводит заведующий, с отметкой в специальном журнале 1 раз в квартал.

Основные требования к медицинскому наблюдению за персоналом.

При приеме на работу, связанную с ПБА II группы патогенности, персонал проходит предварительный медицинский осмотр с целью выявления противопоказаний с учетом вакцинопрофилактики, лечения специфическими препаратами и применения средств индивидуальной защиты. Объем и порядок проведения медосмотра определяются нормативными документами.

Все сотрудники, выполняющие работы с ПБА II группы патогенности, подлежат диспансерному наблюдению. Периодические медицинские осмотры проводят в соответствии с нормативными документами.

Лиц, имеющих противопоказания к вакцинопрофилактике, при наличии средств эффективного специфического лечения допускают к работе отдельным приказом по организации в соответствии с их письменным заявлением.

Лиц с нарушениями иммунной системы к работе в максимально изолированных лабораториях не допускают.

Всем сотрудникам, работающим с ПБА I-II групп патогенности или по роду деятельности посещающим помещения «заразой зоны», проводятся ежедневная термометрия (в начале и в конце рабочего дня, с фиксацией результатов в журнале и заверением подписью ответственного за термометрию) и обсервация [382].

При появлении у сотрудника симптомов, характерных для инфекционного заболевания, вызываемого возбудителем, с которым он выполнял работу, сотрудник ставит в известность руководителя подразделения или дежурного по организации. Персонал лабораторий информирует своего заведующего во всех случаях возникновения недомогания. Дальнейшее решение принимает руководитель организации.

При авариях во время работы с ПБА пострадавшему своевременно должна быть оказана помощь в рамках специфических мероприятий, с применением средств аварийной аптечки и изоляции.

Обо всех случаях заболевания сотрудников в результате аварии или лабораторного заражения во время работы с ПБА руководитель организации обязан немедленно информировать территориальные органы Роспотребнадзора и здравоохранения. Обо всех случаях аварий во время работы с ПБА, требующих профилактического лечения пострадавшего, необходимо передавать информацию в ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора [380].

2.3. Общие санитарные требования к помещениям лабораторий

Лаборатории, где проводят работу с ПБА, размещают в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания, имеющей независимый вход. Клинико-диагностические, микробиологические и другие диагностические лаборатории должны размещаться в изолированных непроходных отсеках зданий. Помещение для забора материала располагают за пределами блока помещений для исследований. Размещение и состав помещений лабораторий, осуществляющих диагностику инфекционных болезней (микробиологические, иммунологические, серологические, молекулярно-генетические), определяются с учетом требований санитарных правил по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителей паразитарных болезней [383]. На входной двери лаборатории должны быть обозначены название (номер) лаборатории и знак «Биологическая опасность» (красного или красно-оранжевого цвета на желтом фоне). Входная дверь должна иметь запирающее устройство.

Предусмотрена площадь помещений диагностических лабораторий: лаборантская (в том числе гематологическая, биохимическая и т. д.) – 6 м² на каждое рабочее место, но не менее 12 м²; помещение приема и регистрации биоматериала для лабораторных исследований не нормируется; помещение для работы с документами не нормируется; лаборатория срочных анализов (экспресс- лабора-

тория) – 12 м²; помещение для обеззараживания (автоклавная) не нормируется; моечная не нормируется. Площадь остальных помещений определяется непосредственно хозяйствующим субъектом с учетом: габаритов и расстановки оборудования; числа лиц, которые одновременно могут находиться в помещении; последовательности технологических процессов; расстояний, обеспечивающих расстановку оборудования, а также передвижение работников. Допускается уменьшение площадей помещений лаборатории в пределах 15 % [384]. Лаборатории, проводящие диагностические исследования, оборудуют двумя входами – для сотрудников и для получения материала. Допускается получение материала через передаточное окно или передаточный шлюз.

Лаборатории должны быть обеспечены системами водоснабжения, специальной канализации, электроснабжения, отопления, приточно-вытяжной вентиляции с механическим и (или) естественным побуждением (один раз в год проводить проверку эффективности работы, очистку и дезинфекцию систем механической приточно-вытяжной вентиляции и кондиционирования) [384], телефонной связью, а также оснащены охранной и пожарной сигнализацией.

Все помещения лаборатории должны быть обеспечены естественным и (или) искусственным освещением, создающим уровень освещенности в зависимости от вида работ. Показатели естественного, искусственного и совмещенного освещения должны соответствовать гигиеническим нормативам. Помещения с постоянным пребыванием работников должны иметь естественное освещение.

Разрешена к использованию лабораторная мебель, выполненная из материалов, устойчивых к воздействию моющих и дезинфицирующих средств [384].

Помещения лаборатории подразделяются на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с ПБА и их хранение, и «чистую» зону, где не проводятся работы с ПБА.

Высокую биологическую опасность представляют не только МАНК, но и любые иные лабораторные исследования на материале от больных COVID-19 в других отделах лаборатории [385].

Планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать точность продвижения как ПБА, так и персонала.

На границе «чистой» и «заразной» зон необходимо располагать санитарный пропускник, состоящий из помещения для личной одежды, душевой и помещения для рабочей одежды. На границе зон на входе в помещение душевой необходимо устанавливать герметичную дверь, на которую должен быть нанесен знак «Биологическая опасность».

В помещениях «заразной» зоны, где не проводится непосредственная работа с ПБА, персонал работает в рабочей одежде. В помещениях, где проводится работа с ПБА, дополнительно надевается защитная одежда. Тип защитной одежды зависит от характера выполняемой работы.

Лаборатория обеспечивается средствами тушения пожара и оборудуется пожарной сигнализацией.

Помещения, где проводится работа с ПБА, оборудуются бактерицидными облучателями для обеззараживания воздуха и поверхностей в соответствии с руководством по использованию ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях.

Помещения клинико-диагностических и бактериологических лабораторий, а также санитарных пропускников, шлюзов-боксов, полубоксов должны быть оборудованы умывальниками с установкой смесителей с бесконтактным управлением и дозаторами с жидким (антисептическим) мылом, иными моющими средствами и растворами антисептиков [384].

В помещениях «заразной» зоны, где проводятся работы с ПБА, не допускается установка системы водоснабжения, не защищенной техническими средствами для предотвращения обратного тока воды.

Из помещений «заразной» зоны запрещается слив (сток) необеззараженных жидкостей и жидких отходов в канализационную сеть.

Для работы с ПБА могут применяться боксы МБ II и III классов. Допускается использование БМБ I класса для проведения подготовительных работ и работ с инактивированными возбудителями [382].

При комнатной температуре (20-25° С) SARS-CoV-2 способен сохранять жизнеспособность на различных объектах окружающей среды в высушенном виде до 3 суток, в жидкой среде – до 7 суток. Вирус остается стабильным в широком диапазоне значений pH (до 6 дней при значении pH от 5 до 9 и до 2 дней при pH4 и pH11). При температуре +4° С стабильность вируса сохраняется более 14 дней. При нагревании до 37° С полная инактивация вируса происходит в течение 1 дня, при 56° С – в течение 45 минут, при 70° С – в течение 5 минут. Вирус чувствителен к ультрафиолетовому облучению дозой не менее 25 мДж/см² и действию различных дезинфицирующих средств в рабочей концентрации [385].

Сбор, хранение и утилизация отходов проводятся в соответствии с требованиями СП 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (Х. Требования к обращению с отходами). Все медицинские отходы, в т. ч. биологические выделения пациентов с подозрением на /или с COVID-19, утилизируются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями, применяемыми к отходам класса «В». К ним относятся: отходы от деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний III-IV групп патогенности, а также в области использования генно-инженерно-модифицированных организмов в медицинских целях (эпидемиологически опасные отходы),

в том числе: отходы микробиологических, клинко-диагностических лабораторий; отходы, инфицированные и потенциально инфицированные микроорганизмами III-IV групп патогенности [384].

Использованные материалы утилизировать в установленном порядке, дезинфекцию рабочих поверхностей и биологических жидкостей больного проводить с использованием дезинфицирующих средств, содержащих хлор.

2.4. Общие требования к порядку использования средств индивидуальной защиты

Для работы с ПБА каждого сотрудника обеспечивают рабочей и защитной одеждой и обувью, а также средствами индивидуальной защиты органов дыхания и зрения в соответствии с утвержденными нормами.

Одежда и обувь должны быть индивидуальными, соответствовать размерам работников и храниться: рабочая одежда – в санитарном пропускнике отдельно от личной одежды, в индивидуальных шкафчиках сотрудников, защитная – в местах ее надевания.

Состав комплекта СИЗ для работы с ПБА II группы патогенности (вирусы): шапочка, хирургический халат + перчатки + респиратор типа FFP2 или маска + очки для защиты глаз или защитный экран [385].

Серологические исследования на обнаружение антигена или определение антител к вирусам II группы патогенности в связи с отсутствием регламентированных методов инаktivации вирусов проводятся в боксированном помещении, оборудованном системами приточной и вытяжной вентиляции в СИЗ или в боксе МБ II класса.

Надевание и снятие защитной одежды производят в предбоксе (шлюзе).

В предбоксах (шлюзах), а также в комнатах для снятия защитной одежды устанавливаются водопроводные краны (рукомойники) и емкости с дезинфицирующими растворами для текущей дезинфекции, связанной со снятием защитной одежды, и на случай аварии и хранится резерв запасной защитной одежды. На полу размещается коврик, смоченный дезинфицирующим раствором.

При работе в лабораториях защитная одежда меняется по мере загрязнения, но не реже одного раза в неделю [382].

СИЗ надевают до входа в помещение, где ведется работа с ПБА, в строго определенной последовательности [386].

Порядок надевания СИЗ:

1. надеть рабочую одежду и обувь;
2. вымыть руки;

3. надеть одноразовую медицинскую шапку так, чтобы закрыть лоб до бровей;
4. надеть одноразовую медицинскую маску (респиратор для твердых частиц N95 или с аналогичным, или более высоким уровнем защиты) на лицо так, чтобы верхний край ее доходил до нижней части орбит, а нижний – должен находиться под подбородком;
5. надеть нижние одноразовые латексные перчатки;
6. надеть СИЗ глаз (защитные очки должны быть пригнаны);
7. надеть халат с длинными рукавами;
8. надеть одноразовую защитную накидку (если это требуется в специальных рабочих зонах),
9. надеть защитный щиток для лица/автономный респиратор;
10. надеть верхние одноразовые латексные перчатки, предварительно проверив их на целостность;
11. перед входом в «заразную» зону обувают водонепроницаемые бахилы;
12. одевание завершено.

Снятие защитного костюма выполняют вне помещения, где работают с ПБА (комната для снятия защитной одежды, предбокс), медленно, в строго определенном порядке.

Порядок снятия СИЗ:

1. вымыть руки;
2. заменить верхние перчатки новыми или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
3. снять автономный респиратор для подачи очищенного воздуха или самовсасывающую полнолицевую маску фильтрующего типа/маску (если используется);
4. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
5. снять одноразовую накидку и верхние перчатки (если используются);
6. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
7. надеть верхние перчатки;
8. зайти в помещение для снятия СИЗ № 1;
9. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
10. снять защитную одежду, а также верхние перчатки (перчатки и защитную одежду следует вывернуть наизнанку и свернуть) (примечание: вместе с защитной одеждой следует снять также бахилы);
11. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;

12. зайти в помещение для снятия СИЗ № 2;
13. вымыть руки или руки в перчатках погружают в дезинфицирующий раствор;
14. снять защитные очки;
15. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
16. снять защитную маску;
17. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
18. снять защитную шапку;
19. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
20. снять нижние одноразовые латексные перчатки;
21. вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
22. зайти в помещение для снятия СИЗ №3 (душевая);
23. вымыть руки, принять душ, надеть чистую одежду и выйти в незараженное, чистое помещение.

2.5. Общие требования к биологическому материалу для серологических (иммунологических) исследований на SARS-CoV-2

Важными требованиями выполнения преаналитического этапа лабораторного исследования являются правильный выбор, отбор, хранение и использование биологического материала у категории пациентов, подлежащих обследованию на SARS-CoV-2.

Отбор проб биологического материала у лица, контактировавшего с больным COVID-19, для лабораторного исследования проводится при появлении клинических симптомов заболевания, сходного с COVID-19 [387]. При отсутствии клинических симптомов коронавирусной инфекции забор проб биологического материала у лиц, контактировавших с больным COVID-19, проводится на 8-10-й день медицинского наблюдения.

Виды биологического материала

Выделяют следующие виды образцов:

- цельная венозная кровь (сыворотка, плазма);
- капиллярная кровь.

В качестве материала для проведения лабораторных исследований на наличие IgA, IgM и/или IgG (в отдельных исследованиях или суммарно) к SARS-CoV-2 используется кровь или другие виды биоматериала в соответствии с инструкцией применяемого набора реагентов. Венозная кровь – лучший материал для определения иммунологических показателей COVID-19 [385].

Требования санитарного законодательства к биологическому материалу.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфекционными и работу с ними (взятие диагностического материала, его упаковку, маркировку и транспортировку) осуществлять в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации в отношении возбудителей инфекционных заболеваний человека I-II групп патогенности [382].

Медицинские работники, выполняющие сбор и упаковывание клинических образцов для транспортировки в действующую лабораторию, должны быть обучены требованиям и правилам биологической безопасности при сборе и работе с материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами II группы патогенности, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

Правила взятия образцов биоматериала [388]

Получение венозной крови

Взятие венозной крови для исследования на иммуноглобулины к COVID-19 можно проводить в любое время суток. За 12 часов до взятия пациенту желательно не употреблять жирную пищу.

Рекомендуется взятие крови в вакуумные пробирки с использованием антикоагулянтов К2 ЭДТА, К3 ЭДТА и гепарина.

Непосредственно перед взятием венозной крови производится дезинфекция кожи в месте венепункции циркулярными движениями от центра к периферии дважды салфеткой спиртовой одноразовой (стерильной марлевой салфеткой или ватным шариком, смоченным антисептическим раствором). Необходимо дождаться полного высыхания спирта (антисептического раствора) (30-60 с.) и провести манипуляцию. После венепункции аккуратно перемешать содержимое заполненной пробирки, переверачивая ее необходимое число раз. Перемешивание проводят осторожно во избежание гемолиза. Сразу после заполнения и извлечения вакуумной пробирки из держателя ее нужно аккуратно перевернуть несколько раз на 180° для перемешивания пробы.

Получение капиллярной крови

Вымыть руку пациента мылом и теплой водой или протереть спиртовым тампоном. Дать коже высохнуть. Помассировать руку, не касаясь места прокола, потерев ее по направлению к кончику среднего или безымянного пальца. Сделать прокол кожи стерильным ланцетом. Удалить первые признаки крови. Осторожно потереть руку от запястья к ладони и пальцу, чтобы образовалась округлая капля крови на месте прокола.

Добавить пробу крови из пальца в капиллярную трубку или пипетку для забора крови. Прикоснуться концом капиллярной трубки к крови до наполнения приблизительно до 20 мкл. Избегать образования пузырьков воздуха. Кровь, взятая из пальца, должна тестироваться немедленно.

В случае необходимости для сбора образца капиллярной крови пригодны пробирки, содержащие в качестве консерванта антикоагулянты К2 ЭДТА, гепарин, цитрат натрия и оксалат калия.

Правила оформления проб с биоматериалом и сопроводительных направлений

Требования к маркировке проб

Для серологического исследования на иммуноглобулины, медицинская сестра, проводящая взятие крови, должна: идентифицировать пациента (спросить фамилию, имя, отчество, дату рождения, сравнить ответы с имеющейся информацией в направлении), представиться, объяснить ход предстоящей процедуры, сверить данные пациента, указанные на бланке направления, наклеить один из парных штрихкодов на центральную часть пробирки, на бумажную этикетку таким образом, чтобы считывание было возможно, второй из парных штрихкодов наклеить на нижнюю часть бланка направления.

Требования к оформлению сопроводительного направления

Направление на лабораторное исследование оформляют в электронном виде через систему удаленной электронной регистрации после авторизации в системе и распечатывают на бумажном носителе. В направлении указывают:

- название МО;
- контактное лицо от МО, Ф. И. О., номер телефона;
- лаборатория, куда сдали образец;
- Ф. И. О. пациента, пол, дата рождения, контактный телефон;
- номер страхового полиса ОМС;
- адрес фактического проживания и адрес регистрации пациента;
- название организации-работодателя, Ф.И.О;
- контактное лицо от работодателя, Ф. И. О., телефон;
- адрес фактического места работы пациента, рабочий телефон;
- дата и время взятия образца;
- дата и время отправки образца в лабораторию;
- номер направления (заявки) на лабораторное исследование;
- лицо, отбравшее материал: должность, Ф. И. О., подпись;
- лицо, доставившее биоматериал: должность, Ф. И. О., подпись;
- лицо, принявшее биоматериал: должность, Ф. И. О., подпись;
- дата и время доставки биоматериала;
- общее количество заказанных анализов.

Правила подготовки проб для транспортировки

В сторонние медицинские организации:

- после взятия венозной крови пробирку перемешивают несколько раз и устанавливают вертикально в штатив;
- после истечения не менее 15-20 мин. после взятия кровь центрифугируют при 3 тыс. об./мин. в течение 15 мин.;
- после центрифугирования образцы крови устанавливают в штатив;
- штативы с образцами помещают в транспортный контейнер, транспортируют в вертикальном положении при температуре +2° С-+8° С;
- направления на каждый образец и реестр проб помещают отдельно в полиэтиленовый пакет или в специальный отдельный наружный карман транспортировочного контейнера, категорически запрещено заворачивать пробирки с кровью в направительные бланки;
- при доставке проб в лабораторию сотрудник лаборатории должен сверить количество направлений с количеством проб, зарегистрировать эти данные в журнале приема биоматериала, поставить свою подпись и получить подпись курьера.

Внутри одного здания

При необходимости транспортирования образцов с биологическим материалом внутри одного здания:

- пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски;
- транспортирование производится при комнатной температуре в течение не больше 3 часов;
- запрещена система пневматической передачи для транспортировки образцов [380].

Режимы хранения и транспортировки проб с биологическим материалом

Сыворотку крови в пробирке для отделения сыворотки (от взрослого: собрать 3-5 мл цельной крови). Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4° С, более долгое хранение допускается при -20° С или -70° С.

Цельную кровь транспортируют в пробирке для забора крови. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 ° С, более долгое хранение допускается при -20° С или -70° С [380].

Транспортировка проб с биологическим материалом

Взятые пробы с биоматериалом должны быть немедленно направлены на исследование в лабораторию или сохранены с соблюдением требований действующих санитарных правил по безопасности при работе с патогенами II группы опасности до прибытия специалиста.

Транспортировка образцов должна осуществляться с соблюдением требований СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Прием проб с биологическим материалом при доставке в лабораторию

Передачу образцов биологического материала от пациентов при подозрении на новую коронавирусную инфекцию COVID-19 в лаборатории медицинских организаций, имеющих эпидемиологическое заключение на работу с III и IV группами патогенности, выполнять с оформлением 2 актов приема-передачи.

Бракераж образцов с биоматериалом

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с образцами биологического материала, их целостность и зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. При регистрации нумерация образцов идентична нумерации в бланках направлений на серологическое исследование.

Критерии выбраковки проб на серологическое исследование:

- незаполненные обязательные поля в направлении на анализ;
- нечитабельность в направлении/реестре данных пациента, отсутствие названия медицинской организации, направившей пробы;
- отсутствие штрихкодов на направлении и/или пробирке;
- видимый хилез (мутная сыворотка);
- отсутствие направления к пробе с биоматериалом;
- неоформленный (пустой) бланк направления;
- биологический материал взят в несоответствующую емкость (не с тем консервантом, антикоагулянтом, в приспособленной посуде и др.);
- нарушены временные параметры доставки биоматериала после сбора или взятия;
- нарушены условия транспортировки (не в термоконтейнере, горизонтальная транспортировка проб, нарушена герметичность проб) [389].

3

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА COVID-19

3.1. Общие требования

При подозрении на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, независимо от вида оказания медицинской помощи пациентам проводится комплекс клинического обследования для определения степени тяжести состояния.

Классификация COVID-19 по степени тяжести:

- легкое течение;
- среднетяжелое течение;
- тяжелое течение;
- крайне тяжелое течение.

Диагноз устанавливают на основании клинического обследования, данных эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований.

Подтвержденным случаем COVID-19 считается случай с лабораторным подтверждением любым из методов, определяющих антиген возбудителя, с использованием диагностических препаратов и тест-систем, зарегистрированных в соответствии с законодательством Российской Федерации, т. е. имеющих регистрационное удостоверение Росздравнадзора.

Срок выполнения лабораторного исследования на COVID-19 не должен превышать 48 часов с момента поступления биологического материала в лабораторию до получения его результата лицом, в отношении которого проведено соответствующее исследование [387].

Данные лабораторных исследований немедленно передаются в медицинские организации, направившие материал в целях постановки (изменения) диагноза. Медицинские организации в соответствии с действующим санитарным законодательством направляют экстренное извещение (список, заверенный медицинской организацией) в территориальные органы Роспотребнадзора. Учет больных COVID-19 и внесение в отчетные формы Роспотребнадзора проводится территориальными органами Роспотребнадзора только по полученным экстренным извещениям (спискам, заверенным медицинской организацией).

Медицинские организации, выявившие случай заболевания COVID-19 (в т. ч. подозрительный), вносят информацию о нем в информационный ресурс в соот-

ветствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 31 марта 2020 г. № 373 (ред. от 05.06.2020) «Об утверждении Временных правил учета информации в целях предотвращения распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» [385].

Категории пациентов, подлежащих обследованию на SARS-CoV-2

В целях оперативной организации проведения исследований и противоэпидемических мероприятий лабораторное обследование на COVID-19 в условиях распространения инфекции проводят населению исходя из приоритетов 1, 2 и 3-го уровней.

К приоритету 1-го уровня относят:

- лиц, прибывших на территорию Российской Федерации с наличием симптомов инфекционного заболевания (или при появлении симптомов в течение периода медицинского наблюдения);
- лиц, контактировавших с больным COVID-19, при появлении симптомов, не включающих COVID-19, в ходе медицинского наблюдения и при отсутствии клинических проявлений на 8-10-й календарный день медицинского наблюдения со дня контакта с больным COVID-19;
- лиц, контактировавших с больным COVID-19, при появлении симптомов, не включающих COVID-19;
- работников медицинских организаций, имеющих риск инфицирования при профессиональной деятельности при появлении симптомов, не включающих COVID-19;
- лиц, при появлении респираторных симптомов, находящихся в интернатах, детских домах, детских лагерях, пансионатах для пожилых и других стационарных организациях социального обслуживания, учреждениях уголовно-исполнительной системы.

К приоритету 2-го уровня относят:

- лиц старше 65 лет, обратившихся за медицинской помощью с респираторными симптомами;
- работников медицинских организаций, имеющих риск инфицирования при профессиональной деятельности (лабораторные исследования проводятся 1 раз в неделю до появления иммуноглобулина G (далее – IgG));
- работников стационарных организаций социального обслуживания населения, учреждений уголовно-исполнительной системы при вахтовом методе работы до начала работы в организации с целью предупреждения заноса COVID-19.

К приоритету 3-го уровня относят:

- детей из организованных коллективов при возникновении 3 и более случаев заболеваний, не включающих COVID-19 (обследуются как при вспышечной заболеваемости) [387].

Иные контингенты относятся к приоритетам более низкого уровня [387].

3.2. Требования к медицинским изделиям (МИ)

В соответствии с ч. 4 ст. 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» на территории Российской Федерации разрешается обращение медицинских изделий, зарегистрированных в порядке, установленном Правительством Российской Федерации, уполномоченным им федеральным органом исполнительной власти.

Информация о зарегистрированных в Российской Федерации медицинских изделиях для диагностики SARS-CoV-2 размещена в Государственном реестре медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (далее – Государственный реестр), опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора www.roszdravnadzor.ru в разделе «Электронные сервисы» <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch/>

Для поиска медицинского изделия возможно воспользоваться поисковой строкой сервиса «Расширенный поиск».

Строка «Расширенный поиск» позволяет осуществлять навигацию по:

- номеру регистрационного удостоверения;
- дате выдачи регистрационного удостоверения;
- наименованию и стране производителя;
- виду номенклатурной классификации медицинского изделия и др.

При использовании поисковой строки сервиса «Расширенный поиск» требуется задать необходимые критерии поиска и нажать на кнопку «Вывести результаты» [385].

3.3. Комплекс иммунодиагностики SARS-CoV-2

Включает:

- диагностику иммунологических прогностических маркеров тяжести воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга (контроль за динамикой иммунологического ответа);
- этиологическую диагностику непрямыми методами (обнаружение антител против SARS-CoV-2).
- золотой стандарт для определения серопозитивности «Анализ нейтрализующей активности антител».

3.4. Диагностика иммунологических прогностических маркеров воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга

Выявление особой иммунной сигнатуры COVID-19 имеет практическое значение, поскольку может быть предиктором клинического ухудшения, например, необходимости интубации или летального исхода.

Идентификация специфических иммунных сигнатур SARS-CoV-2

1. Стойкая лимфопения:

- в тяжелых случаях среднее абсолютное количество лимфоцитов (LYMP) может быть ниже (\downarrow) $<1,0 \times 10^9$ л;
- низкий уровень (\downarrow) лимфоцитов характеризует большую склонность пациентов к микробной инфекции.

2. Среднее абсолютное количество нейтрофилов (NEU): повышение (\uparrow) количества до $5,0\text{--}11,8 \times 10^9$ л характеризует интенсивность воспалительных реакций, способствующих цитокиновому шторму.

3. Отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) – маркер системного воспаления:

- повышение (\uparrow) уровня показателя характеризует индивидуумов, у которых либо не развиваются продуктивные противовирусные иммунные ответы, либо тех, кто более склонен к развитию тяжелой формы COVID-19 (гипервоспаление и ОРДС);
- положительно коррелирует с возрастом, степенью ожирения и диабетом 2-го типа.

4. Эозинофилы (EO), базофилы (Baso) и моноциты (MONO): снижение/истощение (\downarrow) уровней показателей наблюдают у тяжелых пациентов.

5. Отношение нейтрофилов № к CD8⁺ Т-лимфоцитам (N8R): маркер прогноза тяжелой формы COVID-19, сопоставим с NLR.

6. Циркулирующие плазмацитоидные дендритные клетки (pDC): снижение (\downarrow) количества отражает лимфопению.

7. CD4⁺ Т, CD8⁺ Т, NK и В-клетки:

- заметное снижение (\downarrow) абсолютного количества в тяжелых случаях по сравнению с легкими;
- наличие активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток наблюдают до облегчения симптомов;
- соотношение Т-лимфоцитов CD4/CD8: повышение соотношения (\uparrow) характеризует низкую эффективность лечения.

8. CD134, CD137, CD95, CD69, CD38, CD27, CD44: повышенная (\uparrow) экспрессия у тяжелых пациентов по сравнению с легкими.

9. Основной профиль цитокинового шторма:

- IL-6: повышение (↑) уровня тесно связано с биомаркерами дисфункции печени, почек и сердца;
- IL-10: повышение (↑) уровня связано с уровнем γ -глутаминтрансферазы;
- IL-2: экстремально повышенный (↑) уровень – у пациентов с симптомами, снижение (↓) уровня – у бессимптомных лиц, связан с пиковым ответом антител;
- интерферон IFN- γ : экстремально повышенный (↑) уровень – у пациентов с симптомами, снижение (↓) уровня – у бессимптомных лиц;
- фактор некроза опухоли (TNF)- α : повышение (↑) уровня в тяжелых случаях по сравнению с легкими.

10. IL-3 в плазме: пониженный (↓) уровень связан с увеличением уровней IFN α и IFN λ , с увеличением тяжести заболевания, вирусной нагрузки и риска летального исхода.

11. Повышенная экспрессия цитокинов – биомаркер тяжести COVID-19:

- приводит к деструктивному аутовоспалению, органной недостаточности и летальному исходу;
- IFN γ -индуцибельный белок 10 (IP-10), MCP3: постоянно повышенные (↑) уровни являются предикторами неблагоприятных исходов COVID-19, связаны с дисфункцией и повреждением легких, а также с летальным исходом.

12. Развитие аутоантител: антител к цитокинам, интерферонам, хемокинам и лейкоцитам, к тканевым специфическим антигенам, экспрессируемым в центральной нервной системе, сосудистой сети, соединительной ткани, сердечной ткани, ткани печени и кишечного тракта, потенциально способно вызывать опосредованное антителами повреждение органов.

13. Отсутствие ответа IFN типа I: потеря контроля за вирусом, согласуется со снижением (↓) количества плазматоцитидных дендритных клеток.

14. Неограниченная активация комплемента:

лектиновый путь:

- C3, C4: высокая (↑) экспрессия компонентов комплемента в альвеолярных эпителиальных клетках и пневмоцитах, а также в воспалительных клетках при тяжелой форме COVID-19, в сравнении с легкой формой заболевания;
- C5, C6 и C8 (белки комплекса атаки на мембрану): высокие (↑) уровни при тяжелой форме COVID-19, в сравнении с легкой формой заболевания;

классический путь:

- C1R, C1S и C8A: высокие (↑) уровни при тяжелой форме COVID-19 в сравнении с легкой формой заболевания;

альтернативный путь:

- IgA: повышенные титры (↑) у тяжелобольных пациентов, могут синергетически действовать с IgG, способствуя антителозависимой цитотоксичности (COVID-19 – частично IgA-опосредованное заболевание);
- IgG: повышенные титры (↑) можно рассматривать как дополнительный индикатор для дифференцировки тяжелых пациентов от нетяжелых.

3.5. Методы исследования Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2

Для определения Т-клеточного ответа против нового коронавируса применяются:

- сложные платформы: Elispot и/или упрощенный IFN-γ Elispot и цитометрия;
- простая платформа: тест секвенирования T-Detect COVID.

3.5.1. Сложные платформы

К ним относят традиционные методы тестирования Т-клеток. В контексте COVID-19 выполняется стимуляция клеток человека специфическими белками SARS-CoV-2 (S1, S2, N, M) для исследований ответа со стороны Т-клеток. Интерпретация результатов исследования не стандартизована. Эти методы используются, в основном, для экспериментальных научных целей. Каждый из них имеет свое прямое функциональное значение и позволяет оценивать антиген-специфические Т-клетки при различных вирусных инфекциях и исследовать поствакцинальный иммунитет [390, 391, 392, 393]. Методы различаются по чувствительности, на их эффективность влияют: количество клеток, используемых в анализе, время инкубации, выбор и концентрация антигена, а также измеряемые маркеры активности Т-клеток. Исследования трудоемки и требуют высокой квалификации (уровень научного сотрудника), что ограничивает их применение не дальше специализированных лабораторий.

При анализе ответа со стороны Т-клеток следует учитывать:

- возможность перекрестных Т-клеточных реакций на разные циркулирующие коронавирусы, ранее присутствовавшие в разных географических популяциях [394], т. к. реактивность Т-клеток к эпитопам SARS-CoV-2 была выявлена в 50 % заархивированных проб от добровольцев до пандемии (2015–2018 гг.) [395];
- в числе перекрестно реагирующих вирусов, кроме коронавирусов SARS-CoV-1 и простуды человека, могут присутствовать другие неизвестные коронавирусы животного происхождения и такие вирусы, как CMV, вирус иммунодефицита человека типа 1 и вирус Эбола [396, 397];
- высокочувствительные анализы Т-клеток обнаруживают ранее существовавшие наивные антиген-специфические CD4+ Т-клетки и CD4+ Т-клетки памяти, выработанные на другие микробы, у большинства людей, не подвергавшихся воздействию SARS-CoV-2.

Исследования Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 в разных фазах COVID-19.

В острой фазе наблюдали:

- высокоактивный цитотоксический фенотип [398];
- увеличение величины и широты ответов памяти (↑) в результате увеличения вирусного воздействия.

В фазе выздоровления наблюдали:

- CD4⁺ – в 100 % случаев, CD8⁺ – в 70 % случаев [399];
- сильные полифункциональные Т-клеточные реакции [398] у серонегативных домашних контактов с инфекцией без сероконверсии, либо у ранее переболевших сезонными коронавирусами, в результате перекрестно-реактивной иммунной памяти.

У неинфицированных серонегативных добровольцев наблюдали:

- отсутствие значимых ответов в *ex vivo* IFN- γ ELISpot на SARS-CoV-2;
- наличие перекрестных реакций памяти на спайковый белок, с применением более чувствительных анализов [395].

Платформа IFN- γ ELISpot (ответ эффекторных Т-клеток, измеренный с помощью 18-часового анализа IFN- γ ELISpot *ex vivo*) выявляет:

- отсутствие специфических для SARS-CoV-2 паттернов ответа Т-клеток у большинства здоровых серонегативных добровольцев;
- присутствие специфических для SARS-CoV-2 паттернов ответа Т-клеток: у пациентов с недавней инфекцией, подтвержденной в ОТ-ПЦР, а также у медицинских работников с высоким уровнем серонегативного воздействия, недавно перенесших COVID-19;
- присутствие более частых и высоких ответов (↑) на белки М и N, коррелирующих с суммарным ответом на спайковые, структурные и вспомогательные пептиды SARS-CoV-2, что указывает на их пригодность в качестве антигенов для скрининга;
- отсутствие Т-клеточных ответов в неэкспонированных популяциях на спайк (S) и другие белки SARS-CoV-2;
- недавнее заражение SARS-CoV-2, специфические для SARS-CoV-2 паттерны ответа Т-клеток у недавно инфицированных людей, без перекрестной реактивности.

Платформа Цитометрия (на примере MIFlowCyt – 7-дневный анализ пролиферации (CellTrace® Violet (CTV) с комбинаторным окрашиванием цитокинов). Технология основана на определении эпитопов Т-клеток, специфичных для SARS-CoV-2, поэтому дифференцирует людей, инфицированных SARS-CoV-2, от людей с перекрестным иммунитетом к другим коронавирусам и выявляет:

- наличие ответов на субъединицы S1 и S2 спайк-белка (S) у здоровых людей, из-за перекрестных реакций памяти на спайк-белок сезонных циркулирующих коронавирусов, либо других микроорганизмов [397, 400];
- частые и сильные реакции памяти на белки M и N^е (маркеры реакции Т-клеток) у выздоравливающих от SARS-CoV-2, но значительно меньшие у серонегативных контрольных добровольцев;
- пролиферацию и клеточный ответ на спайковые субъединицы S1/S2, что указывает на уже существующие популяции перекрестно-реактивных Т-клеток на ранее существовавшие вирусы у > 90 % выздоравливающих или не подвергавшихся воздействию людей;
- широко распространенные реакции памяти Т-клеток у инфицированных и у не инфицированных SARS-CoV-2;
- ответы памяти Т-клеток на белки M и N^е SARS-CoV-2 более характерны для предыдущей инфекции.

Таким образом, обнаружение Т-клеточных ответов на SARS-CoV-2 в значительной степени зависит от анализа и выбора антигена. Ответы памяти на специфические белки без спайков позволяют методу отличить недавнюю инфекцию от ранее существовавшего иммунитета в подверженных воздействию вируса популяциях [401].

3.5.2. Более простая платформа

Тест секвенирования T-Detect COVID с применением «правил машинного обучения / искусственного интеллекта». Срок выполнения лабораторной процедуры 7-10 дней. Целесообразен для диагностики пациента через 15 дней после появления симптомов. В основе – технология секвенирования долгоживущих Т-клеток памяти, специфичных для SARS-CoV-2. Является дополнением к тестированию на антитела для определения предыдущего контакта с SARS-CoV-2.

T-Detect COVID анализирует как частоту, так и распределение присутствующих Т-клеточных рецепторов (TCR), а также произошедшие клональные экспансии Т-клеток (клональная ширина и глубина).

Основное применение теста – мониторинг эффективности различных вакцин против исходного пандемического штамма, применяющихся особенно в уязвимых группах населения. Новый анализ Т-клеток людей, выздоровевших от COVID-19, подтвердил, что они остаются активными в отношении трех новых вызывающих беспокойство вариантов SARS-CoV-2: B.1.1.7, B.351 и B.1.1.248 [402].

3.5.3. ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot)

Elispot – иммуноферментный анализ на клональных отпечатках Т-клеток: из венозной крови человека выделяют клетки, затем стимулируют рекомбинантным белком; через 1-2 суток инкубации в специальной среде определяется количество клеток, выделяющих цитокины; результаты в качественном (тип иммунного белка) и количественном (число стимулированных клеток) вариантах.

Упрощенный IFN- γ Elispot: из венозной крови человека выделяют клетки, стимулируют рекомбинантным белком; через 1-2 суток инкубации в специальной среде определяют уровень гамма-интерферона методом ИФА; результаты активности клеточного иммунитета оценивают косвенно, по уровню гамма-интерферона.

Принцип Elispot основан на методе ELISA с той разницей, что в Elispot анализы, секретируемые клетками, помещенными в 96-луночные планшеты, немедленно захватываются антителом, нанесенным на мембрану, используемую для покрытия дна таких планшетов. После удаления клеток захваченный анализ (цитокин, хемокин, иммуноглобулин (Ig) или другая секретируемая молекула) становится видимым благодаря развитию каскадного комплекса «биотин-авидин-фермент-субстрат», что приводит к появлению цветных пятен (цвет зависит от фермента и субстрата, выбранных для анализа) на беловатой мембране. Цветные пятна обычно подсчитываются с помощью автоматизированной системы считывания Elispot. Каждое пятно представляет собой одну клетку, которая секретировала интересующий анализ, и представляет собой интеграцию количества анализа, секретированного в течение продолжительности анализа, а также кинетику его секреции [403]. Пятна имеют отличительные особенности: более темный центр и блеклые пятна на периферии пятна лунки, а также ограничение минимального размера, которое позволяет некоторым образом отличить их от артефактов и других нежелательных сигналов.

Общий протокол Elispot для подсчета цитокин-секретирующих клеток мало изменился [404], хотя его приложения усовершенствовались. Производителями улучшались материалы, реагенты, подходы к стандартизации и валидации [405], что повысило чувствительность Elispot. Повышено качество сохранения целостности образца: стадия покоя в течение ночи ранее замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) и подсчет апоптотических клеток для получения точных подсчетов жизнеспособной фракции клеток, добавленных в анализ. Тем не менее иммунный мониторинг выявил резкие различия в результатах, представленных участниками групп, при тестировании одних и тех же образцов с помощью IFN- γ Elispot, в соответствии с их собственными протоколами [406, 407, 408]. Резкая вариативность результатов Elispot обусловлена следующими причинами:

- не стандартизован фактический этап считывания планшетов, т. е. подсчет «цветных пятен на белой мембране»;
- предварительная сортировка клеток обычно ограничивается выделением РВМС и, в некоторых случаях, выделением субпопуляций клеток с помощью магнитных шариков или других методов, в связи с чем фактический образец, взаимодействующий с мембраной, покрывающей дно планшета во время инкубации, может содержать в качестве «примесей» мертвые или апоптотические клетки, другие популяции (гранулоциты, тромбоциты или эритроциты), скопления клеток, остатки тканей, осадки белка и ДНК и т.д., дающих множество искусственных сигналов, что затрудняет анализ клеток;

- в ходе технического выполнения анализа при прикосновении наконечников хрупкая мембрана может быть повреждена или разорвана, на нее могут осесть частицы пыли и т.п., что приводит к большому количеству артефактов, влияющих на результат в процессе оценки пластины.

Эксперимент Elispot состоит из трех этапов: выделение и подготовка клеточного материала для тестирования, фактический анализ и оценка пластин Elispot.

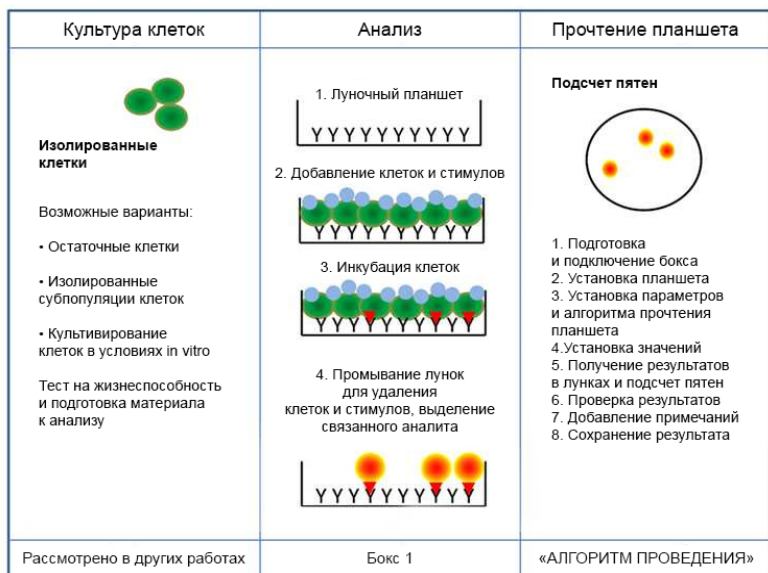


Рисунок 11. Этапы выполнения Elispot

Источник: Published online 25 June 2015; doi:10.1038/inprot.2015.068

Живые изолированные Т-клетки периферической крови инкубируют с антигенами (белковыми/пептидными), с целью имитации естественного процесса презентации антигена в организме, т. е. узнавания Т-клетками антигенов в лимфоузлах и их активации. Небольшая доля специфичных клеток узнает антигены и производит IFN γ , который сразу фиксируется и позже визуализируется в точке секреции. В процессе активации Т-клетки делятся, из одной клетки образуется целый клон антиген-специфичных клеток, все они производят интерферон. При визуализации «пятно» продукции интерферона растет в диаметре.

В Elispot сложно точно определить, какое количество антиген-специфичных клонов было изначально в образце до активации, размножения и формирования пятна, какое количество Т-клеток, распознавших антиген in vivo, не прореагировали в ходе реакции из-за лабораторного способа презентации антигена, отличающегося от естественной активации Т-клеток в лимфоузлах [409, 410].

Привлекательность Elispot:

- относительно прост в исполнении, существует возможность исследования большого количества проб одновременно;
- аналитически надежен и чувствителен;
- пригоден в качестве скринингового для исследования одноклеточных популяций с подсчетом клеток, секретирующих интересующий анализит;
- чаще применяют для обнаружения IFN- γ ;
- разработаны различные модификации для детекции: цитокинов при цитотоксических, воспалительных и аллергических реакциях; общей активации и активации регуляторных Т-клеток, моноцитов и дендритных клеток; Ig, хемокинов и даже секреции аполипептидов;
- экономически более доступен (приборы и реагенты), чем цитометрия (FACS-анализ).

Ограничения Elispot:

- доступность антигена (получение четких пятен требует высоких концентраций антигена);
- перед оценкой секреции интересующего анализита следуют: активация В-клеток памяти с помощью комбинации агониста толл-подобных рецепторов (TLR) R484 и интерлейкина (IL -2)) и стимуляция Т-клеток памяти антигеном, после чего они способны превращаться в цитотоксические;
- разная кинетика секреции у разных анализитов: гранзим В секретируется цитотоксическими Т-клетками несколько минут (требуется инкубация в течение <6 часов); IFN- γ секретируется несколько часов (требуется инкубация в течение 16–24 часов), а для обнаружения секреции IL-17 требуется более длительное время инкубации – от 48 до 72 часов;
- появление больших диффузных пятен в результате артефактов или ограниченное обнаружение сигнала по причине структурных изменений антигенного эпитопа, в результате его связывания с мембраной или продолжающегося протеолиза.

3.5.4. Проточная цитометрия (FACS-анализ)

Высокоскоростной метод подсчета, анализа и сортировки флуоресцентно-меченных клеток, основан на анализе изображения, отражающего гомогенный или гетерогенный характер экспрессии маркера (маркеров) изучаемой популяции. Чаще всего используют для анализа Т- и В-клеток разных типов. Такие исследования больше применяют в научных целях.

Принцип метода: клетки, выделенные из венозной крови человека, стимулируют рекомбинантным белком; после инкубации определяют уровень специфических CD-маркеров клеток, участвующих в клеточном иммунном ответе; результатом

исследования является определение уровня CD-маркеров активации клеток для оценки количества клеток, участвующих в процессе клеточного иммунного ответа.

Идентификацию клеток памяти осуществляют прикреплением флуоресцентной метки к молекуле, присутствующей только на поверхности изучаемых клеток, после чего их подсчитывают по одной при прохождении через лазер и детектор флуоресценции. Т.о. распознают процент клеток, выполняющих определенную функцию, например, весь объем клеток памяти в крови на все прошлые инфекции. Чтобы выделить из общего числа только клетки памяти на SARS-CoV-2, определяют недавно активированные клетки. Для этого лимфоциты из образца крови пациента смешивают и инкубируют с очищенными белками SARS-CoV-2, нарезанными на фрагменты. Т- и В-клетки, способные узнать и связать вирусный антиген, активируются и становятся активированными эффекторными клетками, различимыми среди всей иммунной памяти на FACS-анализаторе.

Суспензия клеток, предварительно помеченных светящимися молекулами (флуорохромами), помещается в поток жидкости, пропускаемый через проточную ячейку. Модель «поток в потоке» порождает эффект гидродинамического фокусирования, исследуемые клетки выстраиваются в цепочку и в таком порядке пересекают пучок световых (обычно лазерных) лучей, которые анализируют каждую отдельно взятую клетку. Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы преобразуют в электрические импульсы и анализируют при помощи специального программного обеспечения.

Таким образом, в результате цитометрического анализа определяют состояние каждой клетки в каждой из популяций образца. Всего за несколько десятков секунд сквозь проточную ячейку проходят тысячи клеток, позволяя идентифицировать состав и характеристики клеточной суспензии. Кроме того, при помощи проточного цитометра можно определить абсолютное число клеток в исследуемом образце, с использованием калибровочных счетных микросфер или волюметрическим методом.

Стандартная процедура тестирования состоит из 2 основных этапов: пробоподготовка и учет результатов.

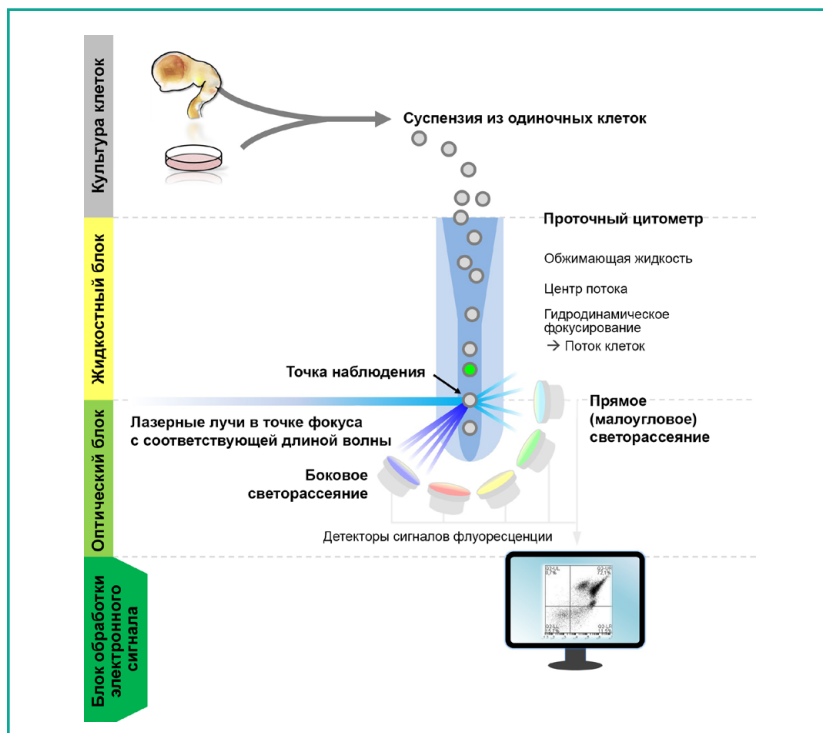


Рисунок 12. Процедура выполнения проточной цитометрии (FACS-анализ)

Источник: картинка из интернета

Иммунофенотипирование поверхностных маркеров клеток периферической крови (на примере мультипараметрического анализа данных цитометрии):

- пробоподготовка: выполняют по протоколам окрашивание-лизис-отмывка и окрашивание-лизис-без-отмывки [411], при необходимости отсрочить анализ на 2-24 часа пробоподготовку дополняют фиксацией клеток образца; при необходимости выявления внутриклеточных маркеров в протокол окрашивания включают процедуру пермеабиллизации [412] при работе с клеточной суспензией, в которой по определению отсутствуют эритроциты, из протокола исключают процедуру лизиса;
- учет результатов: анализ антигенной экспрессии выполняют на проточном цитометре с использованием программного обеспечения для анализа больших массивов данных; возбуждение флуоресценции происходит при прохождении клеткой фокального пятна лазера, охлаждаемого воздухом; учет флуоресценции – при определенной длине волны для каждой из меток FITC, PE и PerCP/

PE-Cy5 каналов флуоресценции на 3 фотоумножителях соответственно; получают данные по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, а также по флуоресценции клеток, связавших флуорохром-конъюгированные антитела; компенсация наложения флуоресценции осуществляется средствами программного обеспечения, позитивность окрашивания с любым антителом оценивается при наложении квадрантов, определенных отрицательным изотипическим контролем.

Привлекательность цитометрии:

- быстрый анализ (до 30 000 событий в секунду);
- анализ большого количества клеток (до 106–108 клеток в образце);
- количественное измерение интенсивности флуоресценции;
- получение данных для каждой конкретной клетки;
- одновременный анализ разных процессов (из одной пробы получают информацию о содержащихся в ней разных популяциях Т-клеток, для каждой из которых измеряют уровень апоптоза, пролиферации, экспрессии клеточных рецепторов и иные интересующие показатели);
- разделение популяций (возможность анализа происходящего только в минорной популяции, без дополнительных процедур для ее выделения или концентрирования);
- обработка данных (качественная визуализация, возможность статистической обработки).

Ограничения цитометрии:

- долговременная и трудоемкая пробоподготовка (требуется несколько часов на выделение клеток и их активацию вирусными белками либо пептидами);
- сложная интерпретация результата;
- требуется роль эксперта, сопоставляющего данные иммунофенотипирования с морфологией и клинической картиной заболевания;
- требуется сочетанное использование автоматизированного анализа изображения и экспертной оценки биологического образца;
- не все биологические образцы соответствуют условиям автоматической и стандартизированной обработки изображения [413];
- непригодна для массового использования, в качестве рутинного целесообразна в централизованных клиничко-диагностических и научных лабораториях.
- возможность получения ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов, из-за аутофлуоресценции клеток и неспецифического связывания антител.

3.5.5. T-Detect COVID [414]

Принцип метода: секвенирование следующего поколения для выявления Т-клеток, распознающих антигены SARS-CoV-2. В сочетании с обширной геномной характеристикой репертуара Т-клеток людей, инфицированных SARS-CoV-2, для теста определен широкий набор Т-клеточных рецепторов (TCR), указывающих на заражение вирусом.

Эксперимент T-Detect COVID: выявление геномной ДНК Т-клеток, являющейся более стабильным анализом, с последующим секвенированием следующего поколения для определения Т-клеточных рецепторов (TCR), идентифицирующих свои родственные антигены. В ходе исследования образца устанавливается последовательность общего репертуара TCR, присутствующих в данном образце, а затем вычисляется относительное обогащение TCR, специфичных для SARS-CoV-2, по сравнению с заранее заданными пороговыми значениями и определением результата, с учетом вариаций в иммунных ответах людей.

Предназначение T-Detect COVID: определение Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2, обеспечивающего устойчивость к повторному инфицированию. Больше пригоден для изучения эффективности вакцин.

Т-клеточный тест на COVID-19 определяет последовательность ДНК TCR человека (темно-синий) для ответа на вопрос «Были ли они инфицированы?».

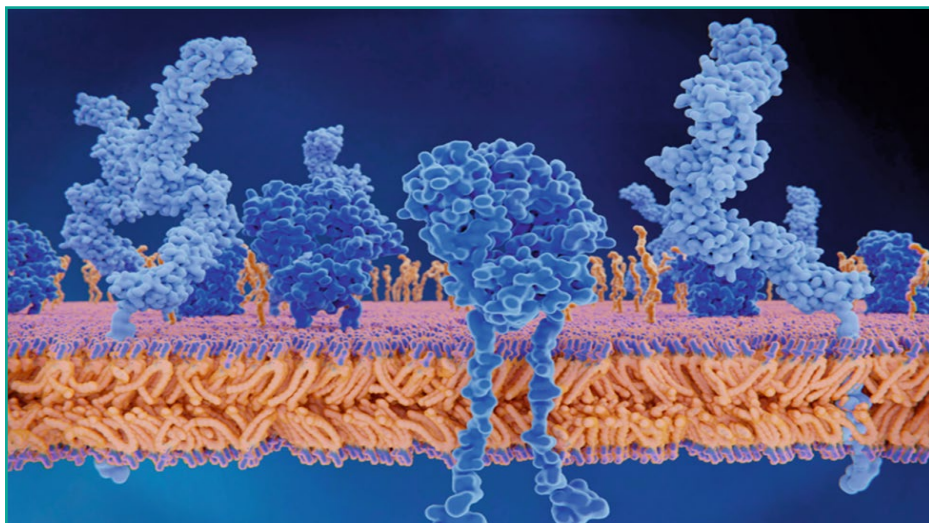


Рисунок 13. Последовательность ДНК TCR человека (выделено синим, Хуан Гертнер / Библиотека научных фотографий)

*Источник: Nature Biotechnology | VOL 39 | May 2021 | 529–539 | www.nature.com/naturebiotechnology
Published online: 12 May 2021 <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00931-6>*

Привлекательность T-Detect COVID:

- показатели эффективности теста: чувствительность 97,1 %, определяемая как положительное процентное совпадение и специфичность 100 %, определяемая как отрицательное процентное совпадение по сравнению с тестированием ПЦР через 15 дней или более после постановки диагноза;
- допускаются: транспортировка проб с биологическим материалом в действующую лабораторию при комнатной температуре и длительная заморозка;
- тест более точен, чем традиционные, и обеспечивает более широкое окно для установления наличия инфицирования, т. к. ответы Т-клеток длятся дольше, чем ответы антител.

Ограничения T-Detect COVID:

- требуется применение правил машинного обучения / искусственного интеллекта;
- тест не предназначен для диагностики активной инфекции;
- является дополнением к тестам на антитела, используемым для подтверждения недавних или предыдущих инфекций;
- нет регистрационного удостоверения, разрешающего применение на территории РФ.

3.6. Этиологическая лабораторная диагностика COVID-19 непрямыми методами (серологические исследования)

3.6.1. Порядок выполнения

Взятие венозной крови для серологического исследования на антитела к SARS-CoV-2 выполняют 2 раза: в острую фазу (в конце первой недели болезни) и через 2 недели после острой фазы.

Выявление антител к SARS-CoV-2 имеет вспомогательное значение для диагностики текущей инфекции и основное – для оценки иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию. Выявление антител к SARS-CoV-2 рекомендовано проводить с использованием иммунохимических методов [415]. Решение о тестировании на антитела к SARS-CoV-2 принимается лечащим врачом индивидуально, исходя из клинической целесообразности.

3.6.2. Специфическая диагностика связывающих антител IgM, IgA, IgG и общих к SARS-CoV-2

Инфекция COVID-19 также может быть обнаружена косвенно – путем измерения иммунного ответа хозяина на вирус SARS-CoV-2. Серологическая диагностика особенно важна для пациентов с легкой и средней тяжестью течения заболевания, которые могут обратиться за помощью по прошествии двух недель от начала заболевания. Серологическая диагностика – важный инструмент для оценки распространенности COVID-19 в сообществе и выявления

людей, которые являются иммунизированными и потенциально «защищены» от заражения.

Серологические исследования целесообразны:

- с диагностическими целями: если ПЦР-исследование не проводилось или дало отрицательный либо неопределенный результат, при сохраняющемся подорожении на COVID-19 (определение IgM, IgG, IgA);
- для оценки уровня антител к вирусу у медицинского персонала, работающего с больными COVID-19 (определение IgM, IgG, IgA);
- в эпидемиологических исследованиях: для обследования популяции с целью определения доли переболевших, перенесших инфекцию без симптомов, не контактировавших с возбудителем (определение IgG);
- при разработке, испытаниях и контроле эффективности вакцин (определение IgG);
- результаты серологических тестов помогают идентифицировать потенциальных доноров реконвалесцентной плазмы (один из методов лечения тяжелых больных COVID-19) [416].

3.6.3. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 непрямими (серологическими) методами

В качестве целевой мишени SARS-CoV-2 используют 2 белка вируса: нуклеокапсидный (N) и различные формы шиповидного Spike-протеина (S), против которых обнаруживаются антитела. S-белок необходим для проникновения вируса и присутствует на его поверхности. N-белок – наиболее широко экспрессируемый иммунодоминантный белок, взаимодействующий с РНК. В качестве антигенов используются множественные формы S-белка: полноразмерные (S1 + S2), частичные (S1-домен) и рецептор-связывающий домен (RBD). Белковая мишень определяет перекрестную реактивность и специфичность, т. к. N^е – более консервативен для коронавирусов, чем S, а в пределах S – RBD более консервативен, чем S1 или полноразмерный S. Считается, что обнаружение антител против RBD имеет более высокую корреляцию со способностью нейтрализовать вирус. Дифференциальная реактивность S- и N-специфических антител в серологических исследованиях информативна для дифференцировки предыдущей естественной инфекции от вакцинации. Различные белковые мишени вируса используются разными производителями тест-систем, при этом большинство тестов нацелено на один или более белков [416].

3.6.4. Технологии определения антител для выявления вирусных белков SARS-CoV-2

Для определения различных аспектов иммунного ответа и функциональности антител используют различные технологии:

- хемилюминесцентный анализ (ИХЛА/CLIA);

- иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA);
- иммунохроматографический/экспресс-тест (ИХТ/ РОС).

Метаанализ показал, что общая чувствительность на IgG/IgM:

- хемилюминесцентного анализа (CLIA) – около 98 %;
- иммуноферментного анализа (ELISA) – 84 %;
- экспресс-тестов (РОС) – 66 %, причем самая высокая и через ≥ 3 недель после возникновения симптомов [417].

3.6.5. Тестовые платформы для диагностики антител к SARS-CoV-2. Point-of-Care (POC)

Тесты РОС – полезный компонент диагностической стратегии в ответ на вспышку SARS-CoV-2 (COVID-19). Использование инструментов РОС для диагностических целей COVID-19 предусмотрено в месте оказания медицинской помощи: у постели больного, в кабинете врача, на догоспитальном этапе, в рамках оказания скорой и неотложной медицинской помощи (в случае необходимости быстрого получения результата), в медицинских кабинетах образовательных учреждений, учреждений длительного ухода, домах престарелых, в сельских больницах и других местах, где ограничен доступ к лабораторному обследованию.

Преимущества тестирования РОС: скорость диагностики и простота использования. В тестах РОС используются различные типы технологий: амплификация нуклеиновых кислот (ПНК) патогена, определение антигенов (белков) патогена, определение антител к антигенам (белкам) патогена.

Антительные экспресс-тесты Point-of-care (POC) созданы на основе иммунохроматографического анализа ИХА (RDT-боковой поток). С их помощью могут выявлять IgA, IgM и/или IgG или общие антитела в сыворотке, плазме и цельной крови. Важные преимущества – возможность использования капиллярной крови. Выдача результата в считанные минуты, не рекомендован в качестве единственного для подтверждения или исключения COVID-19.

Положительный результат антительного теста РОС на COVID-19 свидетельствует, что у человека есть антитела, которые, вероятно, являются результатом инфекции SARS-CoV-2 или, возможно, родственного коронавируса. Отрицательный результат не исключает SARS-CoV-2, особенно у индивидуумов, подвергшихся воздействию вируса и находящихся в инкубационном периоде.

Валидированные антительные тесты РОС, широко используемые в рамках исследований серопревалентности, целесообразны:

- для определения количества инфицированных людей и масштабов распространения вируса;
- для выявления популяций с большим числом случаев COVID-19;

- для групп населения, где затруднен доступ к лабораторному обследованию;
- в случае необходимости быстрого реагирования на возникающие вспышки инфекции [418].

ВОЗ рекомендует использование таких тестов только в рамках исследований [419].

ELISA/ИФА и CLIA/ИХЛА

Требуют обученного персонала и специального оборудования. В зависимости от реагентов выявляют антитела IgG, IgM и IgA или комбинированные общие антитела. Используются в лабораторных условиях, обеспечивая высокий уровень качества. Незаменимы при массовом скрининге. Существуют разнообразные решения, варьирующиеся по аналитическим характеристикам чувствительности и специфичности, уровню автоматизации, операционной эффективности, производительности, скорости выдачи результатов, подключению к информационным решениям и пр.

Регистрация результатов существующих иммунохимических тестов на антитела к SARS-CoV-2 проводится в качественных (интерпретируются как «положительный» или «отрицательный») и количественных показателях (результат пропорционален количеству выявляемого аналита, в связи с наличием стандартизованных антител к различным антигенам).

Серологическое тестирование [420] с использованием мультиплексного хемилюминесцентного анализа IgM, IgG и IgA к SARS-CoV-2 показало, что у участников исследования:

- уровни IgM определялись до появления симптомов COVID-19 и повышались в ходе нарастания симптомов; повышенные ранние уровни IgM указывали на острую инфекцию; у бессимптомных участников наблюдали более высокий ответ IgM; уровни IgM достигали пика примерно на 20-й день и снижались до неопределяемого уровня примерно через 6 месяцев;
- уровни IgG повышались дольше, чем уровни IgM; значительное увеличение средних титров антител IgG против всех антигенов наблюдали у пациентов с симптомами COVID-19; нарастание антител IgG было связано со снижением вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в дыхательных путях [421]; повышенные уровни IgG наблюдали у пациентов с COVID-19 через 50 дней [422]; пациенты с симптомами/с тяжелым заболеванием демонстрировали более высокий иммунный ответ IgG и устойчивый долгосрочный иммунитет, чем пациенты с более легким заболеванием [423]; более позднее повышение уровня IgG соответствует длительному иммунному ответу и активации адаптивного гуморального иммунитета [424];
- уровни IgA повышаются с увеличением тяжести симптомов; уровни титра IgA – ранний индикатор тяжести и прогрессирования заболевания; у бессимптомных участников не выявляют IgA; IgA опосредует ответы слизистых оболочек

и системные ответы на SARS-CoV-2; нейтрализующие IgA блокируют связывание вируса с поверхностными рецепторами на клетках и блокируют взаимодействие рецептор – вирус; высокие уровни сывороточного RBD IgA достоверно коррелируют с тяжестью симптомов COVID-19 [425, 426]; циркулирующий IgA участвует в образовании иммунных комплексов, усиливающих передачу сигналов провоспалительных цитокинов [427]; при умеренно-тяжелой симптоматике значительно более высокие уровни титра RBD IgA; IgA – основное нейтрализующее антитело для уничтожения патогенов до начала инфекционного процесса [427].

3.6.6. Схемы проведения тестовых платформ

Иммунохроматографический тест РОС (качественный)

Экспресс-тесты (иммунохроматографические) нашли широкое применение в диагностике COVID-19 для качественного выявления антител и указывают только на наличие или отсутствие антител IgM и IgG против SARS-CoV-2. Портативность тест-кассеты и быстрота исполнения (результат в течение нескольких минут) делают эти тесты привлекательными для использования в point-of-care начиная с 5-го дня появления симптомов заболевания [416].

Процедура тестирования (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ) представляет собой качественный мембранный иммуноанализ для выявления антител IgG и IgM к COVID-19 в пробах цельной крови, сыворотки или плазмы:

- 1 полную каплю (примерно 20 мкл) пробы внести в ячейку для проб (S);
- добавить 2 капли буфера (примерно 80 мкл);
- запустить таймер;
- учет результата.

Тест содержит нечеловеческий IgM и нечеловеческий IgG в качестве реагента для захвата и антиген COVID-19. В системе контрольной линии используется козий IgG. Во время тестирования проба реагирует с частицами, покрытыми антигеном COVID-19, в тест-кассете. Затем смесь с комплексами «антиген-антитело» перемещается по тестовой полоске. Если проба содержит антитела IgM к COVID-19, комплекс «конъюгат-образец» реагирует с нечеловеческим IgM. В результате в области тестовой линии IgM проявится цветная линия. Таким образом, если проба содержит антитела IgG к COVID-19, в области тестовой линии IgG проявится цветная линия. Если проба не содержит антител к COVID-19, цветная линия не проявится ни в одной из областей тестовой линии, что указывает на отрицательный результат. Для контроля процедуры тестирования в области контрольной линии всегда будет проявляться цветная линия, указывающая на то, что был использован правильный объем пробы и произошло его впитывание мембраной.

Чувствительность теста находится в пределах определения: для IgM – 87,8 %, для IgG – 89,6 %. Специфичность находится в пределах определения для IgM

и IgG – 100 %. Эти тесты безопасны, не образуют в ходе исследования аэрозоли и одобрены ЕС [428].

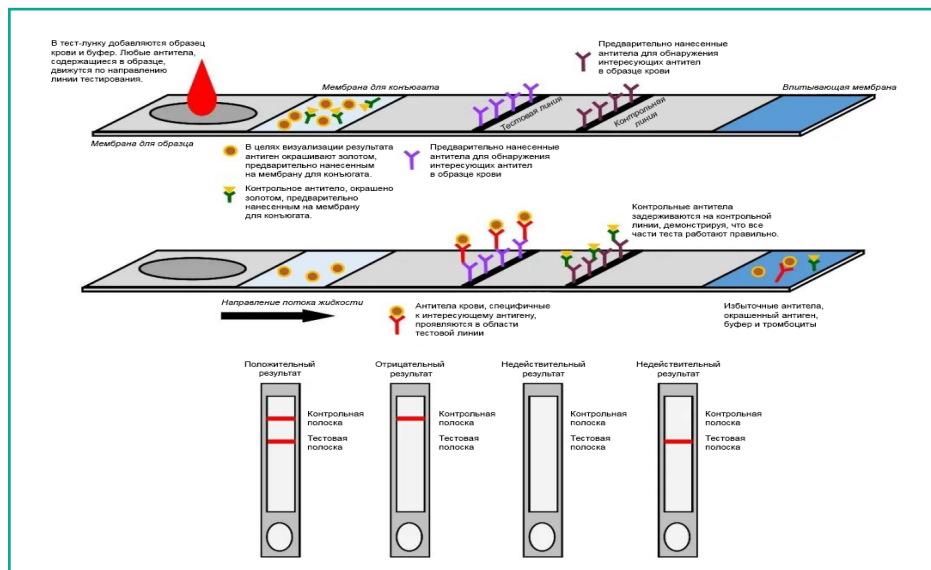


Рисунок 14. Схема проведения иммунохроматографического теста POC (качественный)

Источник: *Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States* // Published on April 22, 2020. Copyright © 2020 Johns Hopkins University

Иммунофлуоресцентный хроматографический тест POC (полуколичественный)

Экспресс-тест (point-of-care test, POC) основан на иммунофлуоресцентной хроматографии для полуколичественного определения антител IgG/IgM против SARS-CoV-2 в цельной/капиллярной крови человека, сыворотке и плазме. Образец равномерно смешивается с раствором буфера, после чего в лунку с образцом в тестовом чипе по каплям добавляется конъюгат, который захватывается козьими антителами против IgM или IgG человека, располагающимися на нитроцеллюлозе. В результате смесь реагирует с флуоресцентно-мечеными рекомбинантными белками SARS-CoV-2 (белок N^е и белок S RBD) и формируется иммунокомплекс (конъюгат + антиген-антитело). Полученные иммунокомплексы детектируются в иммунофлуоресцентном анализаторе с полуколичественным определением концентрации антител против SARS-CoV-2, позволяя осуществлять прослеживаемость образца. Результаты считываются через 8 мин инкубации. Положительные пороговые значения в соответствии с инструкциями производителя: положительные антитела IgG против SARS-CoV-2 >1,2 Т/К; положительные антитела IgM против SARS-CoV-2 >1,3 Т/К. Кроме того, существует возможность отправления результатов в ЛИС.

Чувствительность теста находится в пределах определения:

- для IgM – 84 %;
- для IgG – 93 %.

Специфичность теста находится в пределах определения:

- для IgM и IgG – 100 %.

Эти тесты безопасны, не образуют в ходе исследования аэрозоли и одобрены ЕС [428].

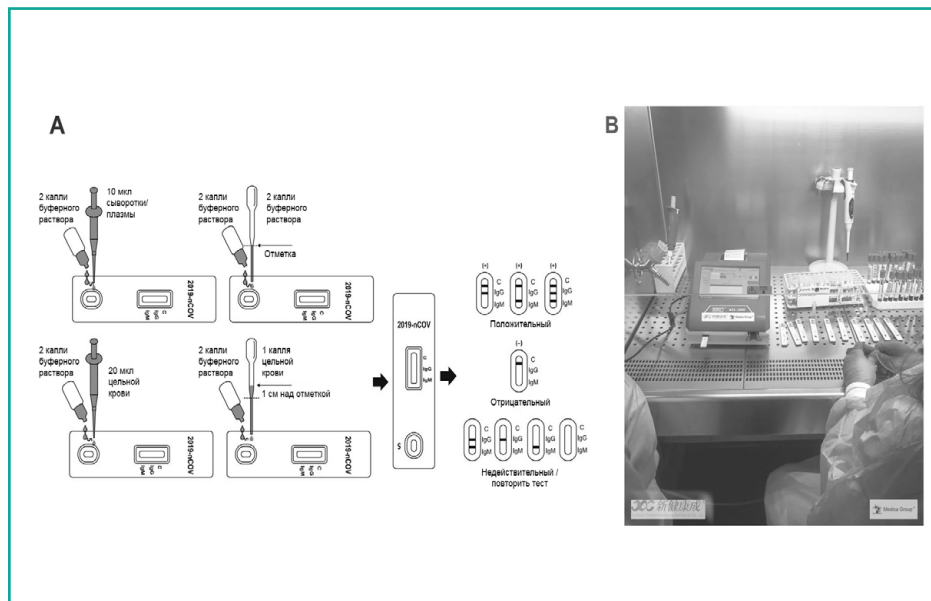


Рисунок 15. Схема проведения иммунофлуоресцентного хроматографического теста РОС (полуколичественный)

Источник: Nuccetelli et al. *Cell Death Discovery* (2020) 6:38; <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>

Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА/ELISA)

На текущий период времени разработан в качественном варианте для диагностики COVID-19 и выполняется в лабораторных условиях. В качестве пробы для ИФА-исследования используют образцы сыворотки или плазмы крови.

В результате прохождения реакции образуется окрашенный продукт окисления, производящий результирующий сигнал, отражающий наличие специфических антител в образце пациента. В контексте COVID-19 методом ИФА наиболее часто определяют наличие у пациента антител IgM или IgG к SARS-CoV-2.

Процедура тестирования на антитела класса IgM основана на двухстадийном capture – варианте твердофазного иммуноферментного анализа (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: связывание содержащихся в анализируемом образце антител класса IgM с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека;
- второй этап: связавшиеся антитела класса IgM к SARS-CoV-2 взаимодействуют с конъюгатом рекомбинантного антигена SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена. При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся иммунные комплексы. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации выявляемых IgM антител к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета. Учет результата производится относительно величин критического значения оптической плотности и, соответственно, коэффициента позитивности, полученных по формулам вычисления. В случае пограничного результата рекомендовано повторное исследование этих образцов параллельно с образцами данных пациентов, взятыми через 2–5 дней.

Процедура тестирования на антитела класса IgG основана на двухстадийном «не-прямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: специфические антитела (в том числе IgG) связываются с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2;
- второй этап: конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена взаимодействует с комплексами «антиген-IgG». При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-IgG-конъюгат». Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета. Учет результата (см. как Процедура тестирования на антитела класса IgM) [388].

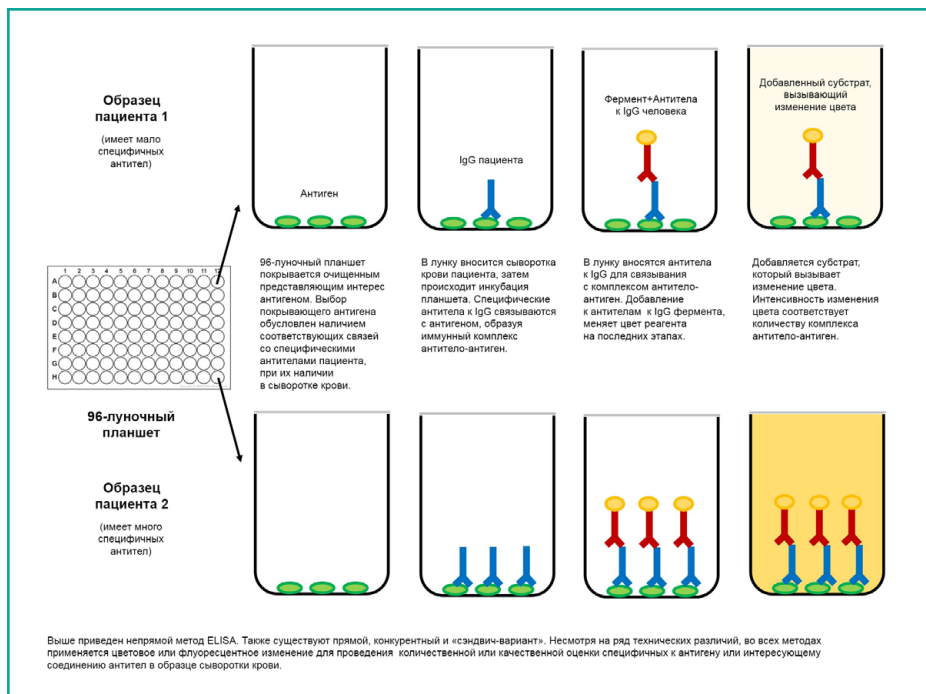


Рисунок 16. Схема проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA)

Источник: *Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States* // Published on April 22, 2020. Copyright © 2020 Johns Hopkins University

Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА/CLIA)

- Является аналогом ИФА. В диагностике COVID-19 привлекателен тем, что позволяет определить наличие антител IgM или IgG к штамму SARS-CoV-2 коронавируса в клиническом образце (сыворотке, гепаринизированной или цитратной плазме) в качественном и количественном вариантах (уровень содержания) на автоматизированных анализаторах.
- Принцип реакции: двухстадийный сэндвич-метод. В реакционной системе в качестве метки используют фермент-катализатор или молекулы субстрата.

В случае, когда в качестве метки используют:

- **фермент-катализатор** (пероксидаза, микропероксидаза (фрагмент цитохрома C)), то чувствительность метода оценивается в 10–13 М антигена;
- **молекулы субстрата** (изолуминол, эфиры акридина), то чувствительность метода оценивается в 10–12 М или до 0,2 пг антигена для изолуминола, до 10–18 М антигена для эфиров акридина.

Процедура тестирования с использованием в качестве метки «фермента-катализатора» (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: в реакционную ячейку дозируются определенные количества образца, раствора для обработки образца, парамагнитных микрочастиц, покрытых SARS-CoV-2 антигеном в буфере с консервантами, затем инкубация, в результате антитела к SARS-CoV-2, присутствующие в образце, связываются с антигенами SARS-CoV-2, иммобилизованными на поверхности микрочастиц. Микрочастицы захватываются магнитом, в то время как несвязанные вещества удаляются путем промывки. После промывки в реакционную ячейку дозируются раствор разбавителя, конъюгат щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами в буфере с консервантами. При инкубации конъюгат щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами связывается с комплексом парамагнитных частиц и SARS-CoV-2-антителами. Микрочастицы захватываются магнитом, в то время как несвязанные вещества удаляются путем промывки;
- второй этап: в реакционную ячейку добавляется раствор субстрата. Разложение субстрата катализируется конъюгатом щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами иммунокомплекса, оставшегося на микрочастицах. Полученная хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (ОСЕ) при помощи встроенного фотоумножителя. Количество SARS-CoV-2-антител в образце пропорционально количеству относительных световых единиц (ОСЕ), образованных в ходе реакции. Концентрация SARS-CoV-2-антител определяется по калибровочной кривой (Приложение 1).

Процедура тестирования с использованием в качестве метки «молекул субстрата» (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: образец смешивается с парамагнитными частицами, сенсibilизированными с антигеном SARS-CoV-2. Реакционная смесь промывается от несвязавшихся антител;
- второй этап: добавляется акридин-меченый конъюгат к IgG антителам человека. После промывки добавляются претриггерные и триггерный растворы. Получаемая в результате хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (RLU). Между количеством антител к SARS-CoV-2, присутствующих в образце, или RLU, детектированными оптикой системы, существует прямая зависимость. Данное соотношение отражено в коэффициенте реактивности (S/C), т. е. отношением сигнала образца (S) к пороговому значению (C).

Обнаружение на 1-й и 14-й дни в сыворотке крови пациента титров антиген-специфичных IgM свидетельствует о том, что пациент встречался с вирусом SARS-CoV-2, а выявление титров антиген-специфичных IgG используют в качестве индикатора для ретроспективной диагностики и эпидемиологического исследования.

При положительных результатах IgM, IgA, IgG (индикаторов инфекции) нельзя исключить:

- возможность получения ложноположительного результата (кросс-реактивность);
- следы ранее перенесенной инфекции;
- первичное инфицирование или рецидив в случае наличия клинических симптомов;
- бессимптомное течение COVID-19 в случае отсутствия клинических симптомов у пациента.

3.6.7. Кинетика гуморального ответа в диагностике COVID-19:

- наличие антител IgM и IgG не свидетельствует о контагиозности пациента;
- у большинства пациентов наблюдается иммунный ответ на контакт с вирусом;
- около 50 % пациентов с умеренными симптомами COVID-19 демонстрируют сероконверсию между 7-11 днями от начала симптомов;
- максимальная вероятность сероконверсии у пациентов с ярко выраженными симптомами наблюдается на 14-й день, у пациентов с мало выраженными симптомами пик антител может сдвигаться;
- у госпитализированных пациентов с тяжелыми формами заболевания антитела могут появляться между 5-6 днями после симптомов;
- появление антител (сероконверсия) сопровождается постепенным снижением вирусной нагрузки, а не резкой элиминацией вируса, т. к. наличия только сывороточных антител недостаточно для элиминации вируса;
- иммунный ответ выше у пациентов после 40 лет;
- оптимальным является выявление IgM и/или IgG для всех пациентов после 15 дня [416].

Обнаружение специфических антител после заражения SARS-CoV-2 указывает на то, что существует стимуляция антигена, но не обязательно инфекционное заболевание. Серологические методы являются эффективным дополнением к обнаружению нуклеиновых кислот и являются лишь косвенным доказательством заболевания COVID-19, т. к. направлены на выявление предыдущей инфекции SARS-CoV-2 и могут помочь подтвердить наличие текущей инфекции.

3.7. Золотой стандарт для определения серопозитивности «Анализ нейтрализующей активности антител»

Наличие одних только антител необязательно приводит к иммунитету, так как не все антитела могут нейтрализовать вирус. Защитный иммунитет состоит в иммунном ответе, который может защитить от SARS-CoV-2. Серологические тесты могут обеспечить информацию о качественном (да/нет) или количественном (титры) содержании антител к определенной части вируса. Однако способность

антител предотвращать вирусную репликацию и защищать от инфекции определяется с помощью анализа нейтрализующей способности антител. В лабораторных условиях было обнаружено, что антитела пациентов с COVID-19 нейтрализуют вирус SARS-CoV-2, но долгосрочность этих антител и обеспечение защиты от реинфекции на текущий период времени находятся в стадии изучения.

Взаимодействие между шиповым белком и ACE2 является частью процесса, через который коронавирусы проникают в клетки человека. Антитела, распознающие вирусный белок «Спайк» (S), связываются с ним, блокируют его способность связывать белок рецептора ACE2 на клетках человека и называются нейтрализующими антителами. Нейтрализующие антитела (NAb) играют важную роль в очищении от вирусов и рассматриваются как ключевой иммунный продукт для защиты или лечения вирусных заболеваний. Вирус-специфические NAb, индуцированные либо посредством инфекции, либо посредством вакцинации, обладают способностью блокировать вирусную инфекцию. Анализ нейтрализующей способности антител является золотым стандартом для определения наличия у пациента эффективных антител и защитного иммунитета против COVID-19, т. к. дает количественную информацию о способности антител пациента придавать защитный иммунитет.

Нейтрализующие антитела выявляются при смешивании сыворотки с соответствующим вирусом и последующим введением этой смеси в культуру клеток. На основании отсутствия цитопатического действия вируса судят о нейтрализующей способности антител. Эта реакция в условиях *in vitro* широко используется в вирусологии для определения вида или типа вируса и титра нейтрализующих антител.

Метод исследования трудоемкий, по времени занимает до 5 дней, не рекомендуется в качестве обычной диагностической процедуры. Исследование проводят в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность проведения работ с ПБА I–II групп патогенности, т. к. в ходе исследования используется суспензия живого или рекомбинантного вируса. Если в анализе нейтрализующих антител используется рекомбинантный псевдовirus, то методика может выполняться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность проведения работ с ПБА III–IV групп патогенности.

Нейтрализующая способность сыворотки пациента против вируса может быть определена количественно. Краткая схема выполнения исследования:

- из сыворотки крови пациента готовят серийные разведения (1:100, 1: 1000, 1:10000 и т. д.);
- к каждому серийному разведению добавляют одно и то же количество суспензии вируса одинаковой концентрации, затем перемешивают;
- серийные разведения сыворотки крови пациента, содержащие вирус и антитела, инкубируют, затем наносят на монослойные клетки хозяина;

- монослой клеток + вирусная суспензия + образец с разведением сыворотки покрывают агаром и инкубируют в течение нескольких дней;
- монослой клеток + только вирусная суспензия той же концентрации, что добавляли в серийные разведения, покрывают агаром и инкубируют несколько дней;
- через несколько дней на чашке появляются единичные бляшки, образуемые вирусом, или небольшие участки без роста клеток (без налета);
- учет результата: разбавление, при котором концентрация антител способна уменьшить образование налета на 50 %, показывает, что у пациента существуют антитела, способные нейтрализовать дальнейшую вирусную активность.

В диагностике COVID-19 применяют 2 типа нейтрализационных тестов:

- вирус-нейтрализационный тест (VNT), такой как plaque-reduction neutralization (PRNT)/нейтрализация бляшкообразования или микро-нейтрализация, когда используется SARS-CoV-2-вирус из клинического изолята или рекомбинант SARS-CoV-2 expressing reporter proteins;
- псевдовирус-нейтрализационный тест (pVNT), при котором используется рекомбинантный псевдовирус (подобно vesicular stomatitis virus, VSV) с инкорпорированным S-белком SARS-CoV-2 [433].

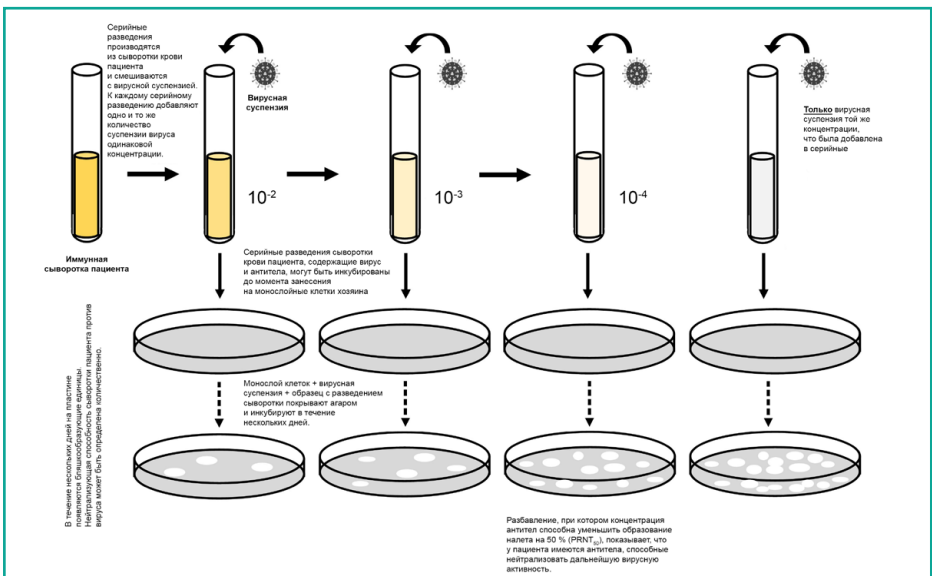


Рисунок 17. Схема проведения анализа нейтрализующей активности антител

Источник: *Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States // Published on April 22, 2020. Copyright © 2020 Johns Hopkins University*

Проведен анализ развития опосредованной антителами нейтрализующей активности у людей, инфицированных SARS-CoV-2. В ходе исследования использовали полностью репликативный изолят SARS-CoV-2 и псевдовиром на основе ВИЧ, экспонирующий белок S SARS-CoV-2 [430, 431, 432]. Сравнение обоих вариантов исследования показало высокую степень идентичности. Подтверждены быстрота, безопасность и специфичность псевдовиромного теста, что свидетельствует о его привлекательности для применения в качестве скринингового.

Результат анализа нейтрализации антител демонстрирует способность плазмы или сыворотки пациента, перенесшего COVID-19, оказывать нейтрализующее действие на вирус в условиях живой культуры *in vitro*, их присутствие коррелирует с иммунитетом к повторной инфекции, по крайней мере временно. В настоящее время этот метод применяется главным образом для научных целей. В стадии изучения способность и титр антител сыворотки/плазмы пациента блокировать репликацию вируса в условиях *in vitro* [416].

3.7.1. Кинетика нейтрализующих антител

Развитие нейтрализующей активности пациентов с тяжелыми симптомами COVID-19:

- у госпитализированных пациентов отсутствуют значительные различия в титрах нейтрализующих антител в зависимости от пола и возраста;
- у госпитализированных пациентов, находящихся в условиях интенсивной терапии, отмечена быстрая продукция более высокого титра нейтрализующих антител: к 11-му дню после появления симптомов – ответ у 50 %, к 17-му дню – максимальные ответы у > 80 %, что аналогично значениям титров общих антител, выявляемым на 11-й и 16-й дни соответственно;
- среди госпитализированных пациентов идентифицируют единичные случаи со стойкими неопределяемыми титрами нейтрализации, несмотря на тяжелую инфекцию и пребывание в стационаре больше 30 дней, причины и последствия неясны;
- у госпитализированных пациентов отсутствует явное влияние терапии на краткосрочную нейтрализующую активность, поскольку ни один из методов лечения (тоцилизумаб, кортикостероиды, IFN типа I или ингибиторы протеазы) не связан с большей или меньшей величиной нейтрализующих ответов;
- наличие нейтрализующих антител не является определяющим для разрешения болезни [434].

В сравнении пациенты с легкими симптомами демонстрировали:

- значительно более низкие титры нейтрализующих антител: примерно 50 %, пациентов с легкими симптомами/бессимптомные показали титры нейтрализации ниже 100, среди них значительная часть с неопределяемой нейтрализационной активностью [435, 436, 437, 438].

Очевидные риски для пациентов с низкой нейтрализующей способностью:

- возможность повторного заражения [439, 440], некоторые из таких случаев связаны с плохой сероконверсией после начальной инфекции [440];
- неполная защита, опосредованная антителами и ADE [441].

Возникает противоречивая ситуация, когда у госпитализированных больных титры нейтрализации не изменяются во время лечения, а люди с низкими нейтрализующими антителами защищены от тяжелой инфекции.

Это очевидное противоречие объясняется исследованиями других иммунологических механизмов вирусного контроля:

- врожденные и/или опосредованные Т-клетками ответы играют ключевую роль в обеспечении достаточной защиты в отсутствие широкой и мощной мобилизации В-клеток [442, 443];
- существующая перекрестно-реактивная защита Т-клеток присутствует у значительной части (примерно 50 %) людей, не подвергавшихся воздействию SARS-CoV-2 [444], в результате предыдущих инфицирований другими человеческими коронавирусами [445];
- отсутствие возможности лабораторного обнаружения нейтрализующей активности не исключает наличия временных и слабых нейтрализующих реакций, достаточных для контроля ранней репликации вируса, так, например, низкие титры RBD-специфических В-клеток были идентифицированы у людей с низкой нейтрализацией [446].

Динамика нейтрализующих антител сильно различается у отдельных пациентов с COVID-19 по пиковому уровню антител, скорости уменьшения и продолжительности существования. Обнаружена связь между стойкими нейтрализующими антителами, тяжелыми клиническими симптомами COVID-19 и более высокими уровнями провоспалительных цитокинов и хемокинов. В подгруппе протестированных пациентов Т-клетки, специфичные для SARS-CoV-2, были обнаружены независимо от уменьшения нейтрализующих антител. Клинические и эпидемиологические исследования реинфекции среди пациентов, выздоровевших от COVID-19, со стойкими нейтрализующими антителами и без них необходимы для ответа на важные клинические вопросы, касающиеся долгосрочности защитного иммунитета и титра нейтрализующих антител, соответствующих защите [460].

3.8. Подход к созданию алгоритма лабораторного обследования на COVID-19

3.8.1. Характеристики теста для принятия решения о его использовании

При проведении любого клинического обследования, в том числе лабораторного, всегда существует вероятность того, что полученные результаты объективно не отразят наличие или отсутствие заболевания.

Наличие (или отсутствие) патологии устанавливается определенным референтным – эталонным методом, называемым «золотой стандарт диагностики». Известно, что ни один метод лабораторной диагностики, в том числе использующийся в качестве эталона, не обладает 100 % чувствительностью и 100 % специфичностью и имеет свои ограничения.

В целях оценки пригодности того или иного диагностического лабораторного исследования относительно эталонного существуют такие критерии, как чувствительность и специфичность.

Чувствительность (sensitivity) определяется как доля лиц с заболеванием, у которых диагностический тест положителен.

Специфичность (specificity) – это доля лиц без заболевания, у которых диагностический тест отрицателен.

Для иллюстрации соотношений между результатами клинического теста и объективно существующей или несуществующей патологией строят так называемую четырехпольную таблицу.

| | Заболевание | | |
|--------------------|--------------|-------------|-----|
| | Присутствует | Отсутствует | |
| Положительный тест | a | b | a+b |
| Отрицательный тест | c | d | c+d |
| | a+c | b+d | |

Чувствительность (Se) = $a/(a+c)$

Специфичность (Sp) = $d/(b+d)$

Чувствительный тест часто дает положительный результат при наличии заболевания (обнаруживает его). Его информативность особенно высока в том случае, когда он дает отрицательный результат, т. к. редко пропускает пациентов с заболеванием.

Специфичный тест редко дает положительный результат при отсутствии заболевания. Особенно информативен при положительном результате, т. к. подтверждает предполагаемый диагноз.

При анализе чувствительности и специфичности диагностического теста следует понимать, что:

- тест, имеющий высокую чувствительность, при отрицательном его результате исключает заболевание;
- тест, имеющий высокую специфичность, при положительном его результате подтверждает заболевание.

После проведения клинического теста (необязательно только лабораторного) для получения ответа на основной вопрос, «болен ли обследуемый», оценивают прогностическую ценность этого теста, т. е. вероятность наличия или отсутствия заболевания при известном результате исследования. Когда распространенность заболевания стремится к 0 %, прогностическая ценность положительного результата стремится к нулю, если же распространенность заболевания стремится к 100 %, прогностическая ценность отрицательного результата стремится к нулю. Таким образом, прогностическая ценность положительного результата отражает вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста, а прогностическая ценность отрицательного результата отражает вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста.

К факторам, определяющим прогностическую ценность теста, относят не только чувствительность и специфичность метода диагностики, но и распространенность заболевания в исследуемой популяции.

Распространенность (prevalence) определяется как отношение числа лиц с наличием заболевания ко всей исследуемой популяции. Распространенность характеризуют как:

- априорную (претестовую) – вероятность выявления болезни до того, как стали известны результаты теста;
- апостериорную (посттестовую) – вероятность заболевания после того, как стали известны результаты теста.

Формула, связывающая чувствительность, специфичность и распространенность заболевания с прогностической ценностью положительного и отрицательного результата, выводится из теоремы Байеса, где:

- прогностическая ценность отрицательного результата: $-PV = c/c + d$;
- прогностическая ценность положительного результата: $+PV = a/a + b$;
- распространенность заболевания: $P = a + c/a + b + c + d$.

Чем чувствительнее тест, тем выше прогностическая ценность его отрицательного результата (т. е. возрастает вероятность того, что отрицательные результаты теста отвергают наличие заболевания). Наоборот, чем специфичнее тест, тем выше прогностическая ценность его положительного результата (т. е. возрастает вероятность того, что положительные результаты теста подтверждают предполагаемый диагноз).

Интерпретация прогностической ценности положительного или отрицательного результата теста меняется в зависимости от распространенности заболевания. Следует учитывать, что в популяции:

- с низкой вероятностью заболевания положительные результаты даже высокоспецифичного теста окажутся преимущественно ложноположительными, т. к. в такой популяции распространенность заболевания стремится к нулю,

следовательно, прогностическая ценность положительного результата тоже стремится к нулю;

- с высокой вероятностью заболевания отрицательные результаты высокочувствительного теста, скорее всего, будут ложноотрицательными, т. к. в такой популяции распространенность заболевания стремится к 100 %, следовательно прогностическая ценность отрицательного результата стремится к нулю.

Метаанализ результатов [429], стратифицированных по времени с момента появления симптомов в ежедневно обновляющемся Кокрановском регистре исследований COVID-19 и в базе данных живых доказательств COVID-19 Бернского университета, показал, что чувствительность для IgG, IgM, IgA, общих антител и IgG/IgM с момента появления симптомов:

- низкая в течение 1–7 дней – 30,1 % (95 % ДИ от 21,4 до 40,7);
- повышающаяся на второй неделе в течение 8–14 дней – 72,2 % (95 % ДИ от 63,5 до 79,5);
- достигающая больших значений на третьей неделе от 15 до 21 дня – 91,4 % (95 % ДИ от 87,0 до 94,4);
- достигающая максимальных значений в течение 21–35 дней – 96,0 % (95 % ДИ от 90,6 до 98,3).

Ложноположительные результаты чаще всего получают при подозрении и неподтвержденном COVID-19, а также при невысоких значениях уровней антител.

Кроме того, следует отметить, что на 15–21-й день после появления симптомов COVID-19 из 1000 протестированных на IgG и IgM при распространенности:

- 50 % (например, в группе медицинских работников, страдающих респираторными симптомами), ожидаемо, что 43 (от 28 до 65) случаев будут пропущены, а 7 (от 3 до 14) будут ложноположительными;
- 20 %, ожидаемо, что 17 (от 11 до 26) будут пропущены, а 10 (от 5 до 22) будут ложноположительными;
- 5 %, ожидаемо, что 4 (от 3 до 7) будут пропущены, а 12 (от 6 до 27) будут ложноположительными.

Поэтому в клинической практике для лабораторного обследования применяют, как правило, несколько лабораторных тестов.

Подходы к применению нескольких тестов:

- параллельный, при котором несколько тестов назначаются одновременно, причем положительный результат любого из них рассматривается в пользу наличия болезни, применяют при необходимости быстрой оценки состояния, например, у госпитализированных больных, при неотложных состояниях или же у амбулаторных пациентов, прибывших для обследования на короткое время, обеспечивает более высокую чувствительность и большую прогности-

ческую ценность отрицательного результата при данной распространенности заболевания, чем каждый тест в отдельности. С другой стороны, при таком подходе снижаются специфичность и прогностическая ценность положительного результата теста, т. е. уменьшается вероятность того, что заболевание будет пропущено;

- последовательный, при котором каждый новый тест назначается с учетом результатов предыдущего и для установления диагноза все тесты должны дать положительный результат, поскольку в случае отрицательного результата диагностический поиск прекращается, такой подход предпочтителен в клинических ситуациях, не требующих быстрой оценки состояния больного, например, в амбулаторной практике. При последовательном применении тестов повышаются специфичность и прогностическая ценность положительного результата, но снижаются чувствительность и прогностическая ценность отрицательного результата, в итоге положительный результат теста подтверждает наличие предполагаемой болезни, но одновременно возрастает риск пропустить заболевание. Последовательное применение тестов особенно полезно, когда ни один из имеющихся в распоряжении методов диагностики не обладает высокой специфичностью.

Обычно для того, чтобы получить достаточно надежный диагноз, приходится использовать несколько лабораторных тестов параллельно или последовательно [447].

3.8.2. Стратегии тестирования на COVID-19

В условиях текущей пандемии максимальные цифры специфичности, а, соответственно, и положительного предсказательного значения в алгоритме тестирования являются ключевыми, поскольку общая распространенность антител в популяции, скорее всего, низкая. Например, если в популяции распространенность – 5 %, то тест с чувствительностью 90 % и специфичностью 95 % будет иметь положительное предсказательное значение 49 %, это означает, что только менее чем у половины обследованных, получивших положительный результат, он будет истинным. Совсем иначе выглядит ситуация при применении того же теста, но в популяции с распространенностью 52 %, его положительное предсказательное значение 95 %, что значит, что только у 1 из 20 человек с положительным результатом этот положительный результат будет ошибочным.

Стратегии для получения результата от скрининга:

- выбрать тест со специфичностью не ниже 99,5 % или выше, тогда будет получен хороший результат в популяции с распространенностью выше 5 %; тем не менее прогностическая ценность положительного результата покажет некоторые вариации в зависимости от распространенности в популяции при использовании единой стратегии тестирования; положительная прогностическая ценность для гипотетических популяций с различной распространенностью антител против SARS-CoV-2 с использованием теста с чувствительностью 90 % и специфичностью 99,8 %:

| Распространенность COVID-19 среди населения | PPV для одного теста (Se = 90 %, Sp = 99,8 %) |
|---|---|
| 2 % | 90,2 % |
| 5 % | 95,9 % |
| 10 % | 98,0 % |
| 30 % | 99,5 % |

PPV = положительная прогностическая ценность;

Se = чувствительность;

Sp = специфичность.

Для достижения высокой положительной прогностической ценности в группах населения с низкой распространенностью требуется:

- специфичность не менее 99,5 %, поскольку более низкая специфичность, например 95 %, будет давать субоптимальные положительные прогностические значения;
- фокусироваться на популяции с высокой распространенностью инфекции (высокая претестовая вероятность), например, на пациентах с подозрением или, возможно, перенесенным COVID-19;
- использовать алгоритм последовательного тестирования, когда пациентам, у которых получены первоначальные положительные результаты, проводят другой тест [18]; во избежание противоречивых результатов следует учитывать детектирующий тип антигена и класс Ig в обоих тестах (S и № соответственно), а также изменение временной динамики вирус-специфических иммунных ответов IgM и IgG после заражения.

Стратегия серологического надзора за COVID-19 направлена на широкомасштабное выявление числа случаев инфицирования SARS-CoV-2 в разные периоды времени, в разных географических местностях и в пределах разных популяций.

Исследования с использованием серологических тестов в случае положительных результатов свидетельствуют о предыдущем инфицировании. Их проводят для изучения серологической распространенности и более полной оценки распространенности COVID-19 (частота заражения). Надзор с помощью серологических тестов дает важную информацию для управления мерами контроля, такими как социальное дистанцирование и др.

3.8.3. Тестирование на COVID-19 в условиях ограниченных ресурсов (в отдаленных районах)

Ключевые факторы готовности к диагностике в сложных условиях: доступность, чувствительность, специфичность, удобство использования, быстрота, надеж-

ность, отсутствие потребности в оборудовании и беспроблемная возможность доставки наборов реагентов и расходного материала конечным пользователям.

Клиническая валидация в условиях ограниченных ресурсов для обеспечения диагностической эффективности требует установления целевой группы с сопутствующими эндемическими заболеваниями, некоторые из которых могут быть сезонными или географически рассредоточенными [448]. Большинство лабораторий, расположенных в условиях ограниченных ресурсов, могут не иметь дорогостоящих платформ для проведения эффективных тестов из-за недостаточного финансирования или множества других проблем [449]. В соответствии со стандартами отчетности по исследованиям диагностической точности (STARD) [450] в ходе исследований должны активно регистрироваться рабочие характеристики (чувствительность, специфичность, точность и т. д.) диагностического теста COVID-19. Тестирование стабильности должно включать сценарии «открытого пакета», то есть вскрытие упаковки, «предварительное заполнение» пробирок или нахождение их на столе (во влажном климате) до взятия образцов [451]. Срок годности диагностикума – важный фактор в таких условиях. Необходимо оценивать удобство технологии выполнения теста в соответствии с конкретными критериями в условиях низкого уровня ресурсов и без них [452]. Иммуноанализы РОС, выявляющие антитела COVID-19, часто используются в условиях ограниченных ресурсов и имеют регистрационные удостоверения Росздравнадзора и разрешены к применению на территории России. Тем не менее следует учитывать существующий значительный разрыв в информации и опыте между лабораториями в городах и лабораториями в условиях ограниченных ресурсов сельской местности [453]. Поэтому позиционирование вариантов тестов для использования различается в зависимости от финансовых возможностей.

В условиях ограниченных ресурсов органы здравоохранения сталкиваются со множеством проблем с точки зрения проведения тестирования, включая отсутствие инфраструктуры, обученного персонала, реагентов и современного оборудования, что препятствует повсеместному тестированию и надзору за COVID-19.

Кризисы не являются оправданием для снижения требований утвержденных стандартов. Остается потребность в разработке новых тестов с высокими внутренними стандартами контроля качества и хорошо проверенными процессами. Наконец, тестирование на COVID-19 не должно приводить к снижению перечня обычно выполняемых лабораторных тестов.

3.9. Контроль качества лабораторных исследований на COVID-19

С учетом того, что серологические тесты могут предоставить ценную информацию отдельным лицам и органам общественного здравоохранения, существуют требования, обязательные к исполнению, во избежание получения недостоверных результатов лабораторных исследований. Первым и наиболее актуальным из них является валидация серологических тестов. Клиническая валидация диагностического теста – это оценка его эффективности по сравнению с эталоном, который позволяет безошибочно определять статус образца. Она включает более всесто-

роннее исследование критических параметров конкретной технологии для обеспечения максимальной вероятности обнаружения источников отклонений.

Комитет экспертов ВОЗ по биологической стандартизации [488] в декабре 2020 г. принял «Международный стандарт» на иммуноглобулин против SARS-CoV-2 (IS), который признан эталонным материалом высшего порядка для биологических веществ, ему присвоена активность в международных единицах (МЕ). Этот стандарт используется для количественной оценки биологической активности, присутствующей в образце, в единицах МЕ, что позволяет сопоставлять результаты анализов, выполненных в разных лабораториях, для более точного определения аналитической чувствительности тестов и уровня содержания защитных антител. Его использование способствует стандартизации серологических исследований на COVID-19 для выявления антител против SARS-CoV-2 с целью установления иммунных ответов на живой вирус и вакцину, а также сбора эпидемиологических данных.

Международный стандарт ВОЗ на иммуноглобулин против SARS-CoV-2 – это эталонный стандарт, позволяющий проводить точную калибровку анализов с точностью до произвольной единицы, тем самым уменьшая межлабораторные различия и создавая общий язык для представления данных. Он основан на объединенной человеческой плазме выздоравливающих пациентов, которая лиофилизирована в ампулах с назначенной единицей в 250 международных единиц (МЕ) в 1 ампуле для определения нейтрализующей (коррелирует с RBD) или в другой такой же 1 ампуле для определения связывающей активности (IgM, IgA, IgG и общие антитела). Условной величиной числа антител было принято 1000 МЕ/мл, соответственно, в одной ампуле стандарта содержится 250 МЕ (ампула 0,25 мл).

Для анализов связывания **разрешено использовать 1 единицу из 1000 единиц связывающих антител (BAU) на мл для сравнения результатов анализов, выявляющих один и тот же класс иммуноглобулинов с одинаковой специфичностью (например, антирецептор-связывающий домен IgG, анти-N IgM и т. д.), не допускается сравнение** тест-систем, определяющих разные типы Ig, например, тест-системы, исследующей Ig G к S-белку, и тест-системы, исследующей Ig G к N-белку.

Международный стандарт доступен в каталоге NIBSC **и создан для согласования результатов различных клинических испытаний вакцин с использованием общих стандартных операционных процедур и одних и тех же важнейших реагентов, включая рабочий стандарт, откалиброванный в соответствии с международным стандартом.**

Глобальное использование международного стандарта и МЕ, по которым результаты анализов должны быть откалиброваны с использованием надежного метода, – необходимый инструмент для разработчиков вакцин и национальных лабораторий во всем мире. Рекомендовано, чтобы результаты иммуногенности представлялись в виде международных стандартных единиц (МЕ/мл для нейтрализующих антител и BAU/мл для анализа связывающих антител).

Результаты клинических испытаний, выраженные в МЕ, позволят сравнить иммунные ответы после естественной инфекции и индуцированные различными вакцинами-кандидатами.

Такое сравнение особенно важно для выявления коррелятов защиты от COVID-19. ***Если нейтрализующие антитела будут и далее поддерживаться в качестве компонента защитного ответа, экспрессия ответов антител в МЕ/мл имеет важное значение для достижения консенсуса по результатам клинических испытаний и других исследований в отношении титра, необходимого для защиты.***

На текущий период времени коррелят защиты (уровень иммунных клеток и/или титр защитных антител) от SARS-2-CoV еще не определен однозначно. Антитела, как предполагают, будут по крайней мере частью защитного ответа. Влияние новых вариантов SARS-2-CoV на оценку антител очевидно, но требуются однозначные сравнения. Отчетность об иммунологических ответах на клинические испытания вакцины в соответствии с международным стандартом имеет важное значение для оценки клинических данных, представляемых национальным регулирующим органам, а также в ВОЗ для внесения в список с целью использования в чрезвычайных ситуациях, т. к. исследования эффективности с использованием плацебо становятся практически невозможными. Регулирующие органы во всем мире намереваются запрашивать данные в МЕ/мл или ВАУ/мл на основе использования международного стандарта с целью представления результатов иммуногенности в единых международных стандартных единицах измерения. В ЕС запущены инициативы по «гармонизации» оценки иммунного ответа между вакцинами-кандидатами COVID-19, включая Глобальную централизованную лабораторную сеть CEPI [489].

Наличие международного стандарта (МС) для антител упростит стандартизацию серологических методов SARS-CoV-2 и позволит сравнивать и согласовывать набор данных между лабораториями. Это поможет определить уровни антител, которые необходимы для определения эффективности действия вакцин, и улучшит понимание эпидемиологии вирусов.

В России для диагностики COVID-19 зарегистрировано большое количество наборов для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 методами иммуноферментного, иммунохемилюминесцентного, иммунофлюоресцентного и иммунохроматографического анализа, включая экспресс-тесты.

С целью оценки степени сопоставимости результатов исследований на COVID-19, выполняемых в различных учреждениях здравоохранения, и соответствия их установленным нормам аналитической точности Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) на основе обработки результатов проведенных клинико-диагностическими лабораториями исследований образцов контрольных материалов, рассылаемых Центром внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований, проводит межлабораторные сличения по разделам, в том числе «Выявление антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2».

На основании положений стандарта ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», основной целью применения которого является признание результатов, пункт 5.6.3. Межлабораторные сличения, подпункт 5.6.3.1. Участие, лаборатории должны участвовать в программе (программах) межлабораторных сличений (таких как программы внешней оценки качества или программы испытания профессиональной компетентности) соответственно исследованиям и интерпретациям результатов исследований.

Еще одним важным элементом комплекса мероприятий, направленных на обеспечение качества клинических лабораторных исследований, является внутрилабораторный контроль качества, который состоит в постоянном (повседневном в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий: исследовании проб контрольных материалов или осуществлении мер контроля с использованием проб пациентов. Целью внутрилабораторного контроля является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий.

В случае отсутствия аттестованного контрольного материала используют неаттестованный материал или сливные сыворотки. По полученным результатам рассчитывают: среднюю арифметическую результата повторных измерений контрольного материала (\bar{X}), среднее квадратическое отклонение (S) и коэффициент вариации (CV). Если полученные значения величины относительного смещения (B) и коэффициент вариации (CV) не превышают их предельно допустимых значений, делают вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и переходят к построению и анализу контрольных карт по правилам Westgard. В случае превышения одним из полученных значений B или CV соответствующих предельно допустимых значений проводят дополнительную работу по устранению источников повышенного смещения или вариации.

Внутрилабораторный контроль качества обязателен в отношении всех видов исследований, выполняемых в лаборатории. Правила внутрилабораторного контроля качества количественных исследований содержатся в Приказе МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Несмотря на доступность большого количества валидированных серологических тестов, имеющих регистрационные удостоверения Росздравнадзора (РУ), разрешающие их применение на территории России, осуществление внешнего и внутреннего контроля качества является обязательной и неотъемлемой частью лабораторного процесса.

4

ВРЕМЕННЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИММУНОДИАГНОСТИКЕ COVID-19 ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ

4.1. Общие требования

1. К применению на территории РФ разрешены реагенты для определения антител к SARS-CoV-2, имеющие регистрационные удостоверения Росздравнадзора, что свидетельствует о проведении независимой оценки их эффективности.
2. На текущий период времени отсутствуют преимущества между лабораторными исследованиями на IgG, IgM и IgG или на общие антитела.
3. Для минимизации получения ложноположительных результатов исследований следует выбирать набор реагентов с высокой специфичностью к SARS-CoV-2 для исключения возможных перекрестных реакций в результате предыдущих контактов с эндемичными коронавирусами. В качестве альтернативы целесообразен алгоритм лабораторного обследования, т. е. использование двух независимых тестов последовательно в том случае, когда первый тест дает положительный результат. Такой подход рекомендован, если ожидаемая положительная прогностическая ценность одного теста низкая.
4. На основании результатов серологических тестов не рекомендовано прекращать физическое дистанцирование и использование средств индивидуальной защиты, несмотря на возможное предположение о снижении контагиозности пациента в связи с выработкой защитного иммунитета от повторного инфицирования (при обнаружении антител через 1–3 недели после появления симптомов).
5. Выполнять лабораторные исследования уровня антител:
 - для выявления инфицированных, бессимптомных и переболевших SARS-CoV-2 с целью мониторинга эпидемической ситуации, для принятия мер реагирования на вспышки COVID-19;
 - для изучения серологической распространенности (совокупной заболеваемости инфекцией);
 - для выявления доли населения, ранее инфицированного SARS-CoV-2 и потенциально защищенного, с высокой степенью иммунитета на какое то время, для определения реконвалесцентов – доноров плазмы.

6. Требования безопасности:

- следует учитывать, что при легкой и средней степенях COVID-19 вирусная РНК обнаруживается на низком уровне, а при более тяжелом течении – на более высоком, поэтому лабораторные исследования состояния иммунитета следует выполнять строго в СИЗ (маска, перчатки, одноразовый костюм и защитные очки).

4.2. Учет динамики гуморального иммунитета

1. После инфицирования SARS-CoV-2 почти у всех иммунокомпетентных людей разовьется гуморальный иммунный ответ IgM/IgG/IgA.
2. Антитела IgM и IgG могут возникать в сыворотке почти одновременно в течение 2–3 недель после начала заболевания, выявление IgM без IgG редко, продолжительность определения IgM и IgG после инфекции неизвестна, у некоторых индивидуумов после инфекции не вырабатываются антитела IgG или IgM; отсутствие детектируемых антител IgM или IgG необязательно исключает раннее инфицирование.
3. Нейтрализующие антитела подавляют репликацию вируса *in vitro*, их присутствие коррелирует с иммунитетом к повторной инфекции, по крайней мере временно.
4. Присутствие антител предполагает краткосрочный иммунитет к SARS-CoV-2, защищающий от повторного заражения, рецидив заболевания COVID-19 очень редок.
5. Выработка антител коррелирует с заметным снижением вирусной нагрузки в дыхательных путях и, предположительно, может снижать контагиозность.

4.3. Тесты на антитела

Для определения различных аспектов иммунного ответа и функциональности антител используют различные типы анализов.

Виды тестов:

- **тесты на месте (ПОС)** обнаруживают IgG, IgG и IgM или общие антитела в сыворотке, плазме, цельной крови и/или слюне, их можно проводить на образцах капиллярной крови;
- **лабораторные тесты:**

ELISA (иммуноферментный анализ) или CLIA (иммунохемилюминесцентный анализ); в зависимости от наборов реагентов выявляют антитела IgG, IgM и IgA отдельно или суммарно/общие антитела; выполнение исследований требует обученных лабораторных специалистов и автоматических анализаторов;

тесты нейтрализации суррогатного вируса (sVNT) на связывающие антитела для выявления потенциально нейтрализующих антител, предотвращающих взаимодействие RBD с ACE2 (рецептор клеточной поверхности для SARS-CoV-2); эти тесты не требуют наличия живого вируса, их можно проводить в лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III–IV групп патогенности.

4.4. Выявление связывающих и нейтрализующих антител

Определение связывающих антител:

1. К связывающим антителам относят отдельные типы антител IgG, IgM и IgA или общие антитела:
 - IgM наиболее информативен для определения недавней инфекции, поскольку обычно становится неопределяемым через несколько недель или месяцев после заражения;
 - IgG может продолжаться обнаруживаться в течение нескольких месяцев или лет;
 - IgA важен для иммунитета слизистых оболочек и может обнаруживаться не только в крови, но и в слизистых выделениях, таких как слюна.
2. В ходе исследования используются очищенные белки SARS-CoV-2, а не живой вирус, поэтому их разрешено проводить в лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III–IV групп патогенности.
3. В зависимости от сложности анализов эти тесты могут быть выполнены быстро (менее чем за 30 минут) в полевых условиях или за несколько часов в лаборатории.

Обнаружение нейтрализующих антител

1. Проводят два типа тестов нейтрализации:
 - в тестах нейтрализации вирусов (VNT): тест нейтрализации / уменьшения бляшек (PRNT) и микронейтрализация, используется вирус SARS-CoV-2 из клинического изолята или рекомбинантный SARS-CoV-2, экспрессирующий репортерные белки, его выполнение может занять до 5 дней;
 - в тестах нейтрализации псевдовирюсов (pVNT) используются рекомбинантные псевдовirus (например, вирус везикулярного стоматита, VSV), которые включают S-белок SARS-CoV-2.
2. Не разрешено использование тестов нейтрализации SARS-CoV-2 в практической деятельности лабораторий медицинских организаций, т. к. с их помощью определяют функциональную способность антител предотвращать заражение вирусом *in vitro*, они включают инкубацию сыворотки или плазмы с живым вирусом с последующим инфицированием и инкубацией клеток, поэтому для выполнения этих анализов требуется разрешение на работу с микроорганизмами II группы патогенности.

4.5. Стратегии тестирования

1. В условиях пандемии COVID-19 в большинстве случаев предпочтительна максимальная специфичность и, следовательно, положительная прогностическая ценность серологического алгоритма, поскольку общая распространенность

антител в большинстве популяций, вероятно, низкая. Для достижения высокой положительной прогностической ценности в группах населения с низкой распространенностью требуется специфичность не менее 99,5 %.

2. Тесты с более низкой специфичностью, например, специфичностью 95 %, будут давать субоптимальные положительные прогностические значения при использовании в группах населения с низкой распространенностью. В такой ситуации рекомендовано разработать алгоритмы последовательного тестирования, чтобы максимально увеличить общую специфичность при сохранении максимальной чувствительности.

4.6. Стратегии для улучшения положительной прогностической ценности

Выбрать одну из трех стратегий:

1. Выбрать тест с очень высокой специфичностью, возможно, 99,5 % или выше, т. к. он даст высокую прогностическую ценность положительного результата в популяциях с низкой распространенностью.
2. Сосредоточить тестирование на людях с высокой вероятностью наличия антител против SARS-CoV-2 перед тестированием, например, на лицах с клиническими симптомами COVID-19.
3. Использовать алгоритм последовательного тестирования, при котором индивидуумы с положительным результатом теста проходят второй тест, каждый из которых имеет уникальные характеристики (например антигены).

4.7. Эффективность алгоритмов последовательного тестирования

1. При интерпретации результатов теста следует учитывать тип антигена и класс Ig обоих тестов в алгоритме тестирования. Например, у человека, инфицированного SARS-CoV-2, может развиваться иммунный ответ, который сильно смещен в сторону определенного вирусного белка (например спайкового белка). Этот сценарий может привести к противоречивым результатам теста, если детектирующие антигены в первом и втором тестах были спайк-белком и нуклеопротеином соответственно.
2. Временная динамика вирус-специфических иммунных ответов IgM и IgG может различаться после заражения. В этом случае использование тестов, выявляющих различные классы Ig (общий Ig, IgM или IgG), может привести к противоречивым результатам.

4.8. Учет ограничений серологического исследования

В настоящее время иммунологические корреляты иммунитета от инфекции SARS-CoV-2 четко не определены, в связи с этим рекомендовано:

- результаты интерпретировать с осторожностью, желательно с использованием референтного стандарта для диагностирования либо исключения COVID-19;
- в случае бессимптомных и легких случаев необходимы дополнительные доказательства эффективности тестирования;
- тесты на выявление антител к SARS-CoV-2 не применять для выявления острой инфекции;
- учитывать, что результаты антительных тестов достоверно не демонстрируют наличие или отсутствие инфекции в настоящее время или в прошлом, т. к. на выработку антител IgM и IgG может потребоваться 1–3 недели после заражения;
- учитывать, что надежность антительных тестов доказана только на этапе выздоровления, после проведенной терапии;
- учитывать, что у некоторых индивидуумов после заражения антитела могут не вырабатываться, а у тех, у кого они выработались, уровни со временем могут снижаться до неопределяемых;
- учитывать, что наличие антител, связывающихся с SARS-CoV-2, не гарантирует, что они нейтрализуют вирус и обеспечивают защитный иммунитет;
- при получении результата учитывать, что не исключена перекрестная реактивность с другими эндемичными коронавирусами, что может привести к ложноположительным результатам.

4.9. Учет требований к серологическому обследованию на COVID-19

Рекомендовано:

- серологическое исследование нельзя использовать как единственное диагностическое исследование при острой инфекции;
- отбирать парные образцы сыворотки (в острую фазу и на этапе выздоровления через 2–4 недели) при сильном подозрении на инфекцию и отрицательном результате в ОТ-ПЦР, т. к. сероконверсия/повышение титров антител в парных образцах сыворотки помогают подтвердить недавнее развитие инфекции или острый процесс;
- в случае, когда исследование первоначального образца дает положительный результат, нельзя исключить перенесенную в прошлом инфекцию, не связанную с текущим заболеванием;
- учитывать, что сероконверсия может протекать быстрее и быть более устойчивой при тяжелом течении COVID-19 в сравнении с легкой и/или бессимптомной формой заболевания;

- использовать для подтверждения диагноза в остром периоде инфекции у пациентов с поздним обращением (через 9–14 дней после появления симптомов) в комплексе с другими методами определения вируса (например, ОТ-ПЦР, тесты с выявлением антигена);
- использовать для пациентов с поздними осложнениями (например, мультисистемным воспалительным синдромом у детей);
- использовать в исследованиях санэпиднадзора;
- выполнять процедуры лабораторных исследований с проведением внешнего, внутреннего и международного контроля качества для валидации функциональности исследования;
- для каждой лаборатории прописать стандартные операционные процедуры (СОПы) по выполнению серологической диагностики SARS-CoV-2;
- строгое соблюдение требований к отчетности.

4.10. Проведение серологических исследований для категорий пациентов

Провести исследование на антитела IgG и IgM к SARS-CoV-2 в качественном/количественном варианте:

- для госпитализированных пациентов с клиническими проявлениями COVID-19 в тяжелой форме и соответствующей картиной КТ, но с отрицательным результатом в амплификации нуклеиновых кислот;
- для уточнения диагноза у госпитализированных пациентов с клиникой COVID-19 в тяжелой форме, но невыполненным исследованием на РНК в течение 7 дней от начала симптомов;
- для нетяжелых симптоматических пациентов, подозрительных на COVID-19, находящихся под наблюдением с отрицательным результатом исследования на РНК, в качестве первичной диагностики;
- для нетяжелых симптоматических пациентов, подозрительных на COVID-19, находящихся под наблюдением, но без выполненных исследований методами амплификации нуклеиновых кислот в течение 7 дней после появления симптомов с целью уточнения диагноза;
- для нетяжелых симптоматических пациентов с ранее перенесенной ОРВИ до этапа проведения амплификации нуклеиновых кислот, в качестве этиологической диагностики;
- медицинскому персоналу и работникам других служб наряду с действующими рекомендациями, в дополнение к исследованию на наличие РНК вируса.

4.11. Тактика серологической диагностики COVID-19

1. С целью диагностики COVID-19 серологическим методом рекомендуется проведение раздельного тестирования на антитела классов IgM/IgA и IgG, а также мониторинг появления антител в динамике (детекция сероконверсии) – повторное тестирование в неясных случаях через 5–7 дней.
2. Для определения наличия IgG рекомендуется использовать наборы реагентов с количественным определением титра антител (Приложение 2), что позволит оценивать напряженность иммунитета в динамике и проводить отбор потенциальных доноров иммунной плазмы.
3. Для минимизации ложноположительных результатов рекомендуется ввести алгоритм последовательного тестирования пациентов, у которых получены первоначальные положительные результаты на антитела классов IgM/IgA или IgG, с использованием другого теста. С этой целью необходимо использовать тест-систему с максимальными показателями чувствительности и специфичности, а также с одновременным выявлением антител классов A, M, G, которая будет играть роль референтной (верифицирующей) тест-системы. В качестве такой тест-системы может использоваться тест-система для выявления рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2. Использование такого алгоритма позволит выполнять надежную диагностику.
4. Тестирование на суммарные антитела (IgA, IgM и IgG) или IgG к SARS-CoV-2 рекомендуется проводить еженедельно всем медработникам, которым не проводилось такое исследование ранее или если был получен отрицательный результат.
5. При появлении IgG к SARS-CoV-2 в результате перенесенной инфекции или вакцинации, а также для оценки иммунитета к COVID-19 после вакцинации COVID-19 или для оценки необходимости вакцинации у непривитого человека дальнейшее тестирование на антитела к вирусу не рекомендовано, т. к. вакцины индуцируют антитела к специфическим вирусным белкам-мишеням, результаты серологических тестов после вакцинации будут отрицательными у лиц, не имевших в анамнезе предшествующей естественной инфекции, или когда используемый тест не обнаруживает антитела, индуцированные вакциной.
6. При оценке напряженности поствакцинального протективного иммунитета методом ИХЛА/ИФА целесообразно определение антител к рецептор-связывающему домену (анти-RBD антител) [385].
7. С учетом того, что ранее инфицированные SARS-CoV-2 индивидуумы могут быть недостоверно диагностированы с помощью тестов на основе одного антигена [454, 455, 456], при доступности мультиплексных технологий использовать мультиплексный иммуноанализ для одновременного обнаружения различных ответов антител (IgG/IgM/IgA) против антигенов N, S1 и RBD (в ка-

честве основы) в рамках одного диагностического прогона [457]. Толкование правила RBD & N/S1 состоит в том, что считывание против RBD потенциально информирует о наличии нейтрализующих антител [458, 459]; считывание против № уменьшает эффекты потенциальной перекрестной реактивности антител, которая существует против S-белков, сохраняющихся между коронавирусами; мультиплексирование с № может выступать в качестве фактора, различающего индуцированный вакцинацией или естественный иммунитет, поскольку вакцины на основе Spike показали огромную эффективность и широко применяются.

8. Отрицательный серологический тест не исключает перенесенную инфекцию, т. к. у части людей, инфицированных SARS-CoV-2, могут не вырабатываться антитела на определяемом уровне, что ограничивает чувствительность любого теста на антитела для выявления предыдущей инфекции; титр антител может со временем снижаться до неопределяемого уровня, а степень серореверсии может варьироваться в зависимости от используемого теста на антитела.

4.12. Серологическая диагностика пациентов с симптомами при подозрении на острый COVID-19

1. У пациентов с симптомами при подозрении на острый COVID-19 тесты на антитела не применяются в качестве основных для диагностики COVID-19, поскольку в течение первой недели от момента появления симптомов их чувствительность слишком мала.
2. У госпитализированных пациентов с отрицательным результатом в ОТ-ПЦР тесты на антитела имеют повышенную вероятность выявления иммунного ответа на инфекцию только с течением времени, по мере появления и прогрессирования симптомов.
3. Рекомендовано использовать тесты на антитела к SARS-CoV-2 для пациентов с подозрением на COVID-19, но отрицательных в ОТ-ПЦР по прошествии более двух недель с момента появления симптомов.

4.13. Серологическая оценка перенесенной ранее естественной инфекции SARS-CoV-2 и иммунного ответа на вакцину

1. У человека, никогда не вакцинированного:
 - положительный результат теста на антитела против N, S или RBD указывает на предшествующую естественную инфекцию.
2. У вакцинированного человека (Приложение 3):
 - положительный результат теста на антитела против мишени-антигена вакцины, такой как белок S, и отрицательный на другие антигены предполагает,

что это продукция индуцированных вакциной антител и что вакцинированный человек никогда не был инфицирован SARS-CoV-2;

- положительный результат теста на любое антитело, кроме индуцированного против мишени-антигена вакцины, такого как белок N, указывает на исчезновение инфекции SARS-CoV-2, которая могла возникнуть до или после вакцинации.
3. Следует учитывать:
 - первая вакцина, распространенная в России, индуцирует антитела к S-белку, т. е. наличие антител к белку N^о указывает на предыдущую естественную инфекцию независимо от статуса вакцинации, в то время как наличие антител к белку S указывает либо на предыдущую естественную инфекцию, либо на вакцинацию.
 4. Присутствие антител к S-белку и отсутствие антител к N-белку в одном и том же образце указывает, что это:
 - результат вакцинации и человек никогда не переносил естественную инфекцию;
 - предшествующая естественная инфекция у человека, чьи антитела к N-белку уменьшились.
 5. Поскольку вакцины индуцируют антитела к конкретным вирусным белкам-мишеням, результаты серологических тестов после вакцинации будут отрицательными у лиц, не имевших в анамнезе предшествующей естественной инфекции, если используемый тест не обнаруживает антитела, индуцированные вакциной.

4.14. Применение методов серологических исследований

1. Иммунохемилюминесцентные тесты ИХЛА/CLIA:
 - полностью автоматизированы, выполняются в полностью автоматизированном режиме, с ограничением воздействия образцов крови на лабораторный персонал, т. е. в ходе процесса не образуются аэрозоли;
 - рекомендованы для широкого скрининга посредством забора венозной крови в автоматизированных лабораториях стационаров.
2. Иммунохроматографические тесты:
 - полностью ручные, чтение результатов субъективно, только в иммунофлуоресцентном хроматографическом тесте чтение результатов осуществляется через детектор флуоресценции; тесты сразу готовы к использованию (ready-to-use) и экономят время;
 - удобны в определенных ситуациях за пределами медицинских организаций

в сценариях с капиллярной кровью, т. к. ее проще анализировать, отсутствует необходимость сбора, центрифугирования, хранения и транспортировки образцов для исследования в действующую КДЛ, особенно в местах скопления людей (аэропорты, места лишения свободы, дома престарелых, хосписы и т. д.).

3. Прослеживаемость:

- полная: при использовании ИХЛА/CLIA и иммунофлуоресцентных хроматографических полуколичественных тестов, т. к. существует возможность отправки результатов в ЛИС.
4. Для диагностики рекомендованы все описанные методы с учетом ограничений каждого.

4.15. Ключевые биомаркеры для диагностики иммунитета при разном течении COVID-19

| Лабораторные показатели | крайне тяжелое течение COVID-19 | тяжелое течение COVID-19 | средне-тяжелое течение COVID-19 | легкое течение COVID-19 |
|--|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| LYMP – лимфоциты (среднее абсолютное количество) | ↓↓ | ↓↓ | ↓ | ↓ |
| NEU – нейтрофилы (среднее абсолютное количество) | ↑↑ | ↑↑ | ↑ | ↑/- |
| NLR – отношение нейтрофилов к лимфоцитам | ↑↑ | ↑ | ↑/- | - |
| EO – эозинофилы (среднее абсолютное количество) | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| Vaso – базофилы (среднее абсолютное количество) | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| MONO – моноциты (среднее абсолютное количество) | ↓ | ↓ | ↓ | ↓/- |

| Лабораторные показатели | крайне тяжелое течение COVID-19 | тяжелое течение COVID-19 | средне-тяжелое течение COVID-19 | легкое течение COVID-19 |
|--|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Макрофаги | ↓ | ↓ | ↓ | ↓/- |
| N8R – отношение нейтрофилов № к CD8+ Т-лимфоцитам (сопоставим с NLR) | ↑↑ | ↑ | ↑/- | - |
| pDCs – плазмоцитоидные дендритные клетки (снижение согласуется с отсутствием ответа IFN типа I) | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| CD4 + Т-клетки | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| CD8 + Т-клетки (степень CD8 + Т-клеточной лимфопении обратно пропорциональна степени воспаления) | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| В-лимфоциты | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| НК-клетки | ↓↓ | ↓ | ↓/- | - |
| Соотношение Т-лимфоцитов CD4+/CD8+ (↑ характеризует низкую эффективность лечения) | ↑↑ | ↑ | ↑/- | - |

| Лабораторные показатели | крайне тяжелое течение COVID-19 | тяжелое течение COVID-19 | средне-тяжелое течение COVID-19 | легкое течение COVID-19 |
|--|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Цитокины: IL-6, IL-8, CXCL10, IFN- γ , MIP-1 α , MCP1, IL-2, IL-15, IL-1RA, IL-4, G-CSF, TNF, IL-10 (вирусная нагрузка коррелирует с повышением цитокинов) | ↑↑ | ↑ | ↑/- | - |
| Цитокин: IL-3 в плазме | ↓ | ↓/- | - | - |
| IgA (через 5-7 дней после начала симптомов) | ↑↑ | ↑ | ↑/- | - |
| IgG (через 8-14 дней после начала симптомов) | ↑↑ | ↑ | ↑/- | ↑/- |

«↑↑» – значительное повышение;

«↓↓» – значительное понижение;

«↑» – повышение;

«↓» – понижение;

«↑/-» – незначительное повышение;

«↓/-» – незначительное понижение;

«-» – изменение уровня не наблюдается.

4.16. Диагностика коагулопатии при подтвержденном COVID-19

| Критерии | Значения критериев |
|---|---|
| тромбоциты | снижение количества до $<150 \times 10^9$ л |
| D-димер | увеличение уровня более чем в два раза выше верхней границы нормы |
| протромбиновое время | > 1 с |
| международное нормализованное отношение (МНО) | $> 1,2$ |
| тромбоз | наличие макротромбоза и/или микротромбоза |

Предложено диагностировать при оценке наличия ≥ 2 из перечисленных критериев.

Оценка риска коагулопатии, при подтвержденном COVID-19

При наличии 1 из вышеперечисленных критериев и 1 из нижеследующих критериев

| Критерии | Значения критериев |
|----------------------------|--|
| фибриноген | повышенный уровень |
| VWF | повышенный уровень более чем в два раза выше верхней границы нормы |
| волчаночный антикоагулянт | высокий титр |
| антифосфолипидные антитела | высокий титр |

Рекомендовано клиническое использование измеренных значений вышеуказанных биомаркеров:

- для определения траектории заболевания во время госпитализации у отдельных пациентов и прогнозирования исходов;
- для выявления инфицированных индивидуумов с риском развития тяжелой формы COVID-19;

- для правильного выбора пациентов, наиболее нуждающихся в целенаправленном раннем лечении, т. к. ранние иммунологические вмешательства, направленные на воспалительные маркеры, позволяющие прогнозировать худший исход заболевания, будут более эффективными, чем те, которые блокируют поздно появляющиеся цитокины;
- для улучшения оказания помощи пациентам в связи со своевременным применением целенаправленных клинических методов лечения COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На текущий период времени многие аспекты вируса SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания COVID-19 не изучены. Отсутствуют однозначные ответы на многие, в том числе следующие вопросы:

1. какова роль ранее существовавшего и приобретенного Т-клеточного иммунитета в развитии и прогрессировании COVID-19?
2. каковы точные прогностические пороги для известных биомаркеров тяжести COVID-19, исходов и осложнений?
3. каковы профили компарментализации растворимых медиаторов воспаления и клеточных субпопуляций в отдельных органах и системах?
4. каков иммунологический дефицит, связанный со старением и сопутствующими заболеваниями, ухудшающими эффективные иммунологические ответы против SARS-CoV-2?
5. как должна выглядеть единая платформа мониторинга для характеристики отдаленных результатов иммунных нарушений после заражения SARS-CoV-2?
6. каков порог защитных антител, выработанный в результате перенесенной естественной инфекции, необходимый для истинной защиты от реинфекции SARS-CoV-2?
7. каков порог защитных поствакцинальных антител, необходимых для защиты от реинфекции SARS-CoV-2?
8. каков порог защитных поствакцинальных антител, необходимых для ревакцинации от SARS-CoV-2?
9. является ли повторное заражение редким явлением, которое встречается у людей со слабым иммунным ответом? Если да, то чем ограничиваются эти ответы?
10. какова вся многогранность иммунного ответа на SARS-CoV-2?

11. какое количество бессимптомных инфекций могло остаться незарегистрированным?
12. каковы показатели коллективного иммунитета на текущий период времени?
13. каков уровень выявленных и невыявленных симптоматических случаев COVID-19?
14. каков уровень вирусной персистенции, приводящий к постоянной иммунной стимуляции

Существует много неопределенностей по отношению к иммунодиагностике COVID-19, которые необходимо продолжать изучать с помощью лабораторных исследований.

Так, например, масштабное тестирование стало основной стратегией для управления пандемией COVID-19. По мере того, как передача инфекции от сообществ укоренилась внутри стран, полезность крупномасштабного тестирования населения стала предметом интенсивных дискуссий, хотя оно, по сути, явилось решением для снижения и даже остановки пандемии. Ограничения и пробелы широкомасштабного тестирования очевидны: это высокая стоимость и низкая эффективность.

Человеческое население пережило множество пандемий на протяжении всей истории, однако это первая пандемия, при которой было доступно широкое и рутинное тестирование, благодаря чему появилась возможность отслеживать и контролировать передачу вируса в течение последующих пандемических волн SARS-CoV-2 среди населения не только в России, но и во всем мире. Полученная лабораторная информация имела решающее значение для понимания передачи вируса, эффективного реагирования и прогноза возникновения вспышек в будущем, хотя не предоставила простого единого технического решения. Тем не менее она послужила неоценимым руководством к нашим ответным мерам.

Пандемия действует как катализатор, увеличивая скорость, с которой многообещающие диагностические тесты переходят по конвейеру от разработки и валидации в клиническую практику общественного здравоохранения.

В случае предстоящей волны COVID-19 доступны к немедленному использованию все созданные и существующие на текущий период времени инструменты. Приоритет имеют количественные тесты, что позволяет быстро обнаруживать новых инфицированных людей, их изолировать и применять меры. Дальнейшая оптимизация тестов и более обширная клиническая и эпидемиологическая проверка, включая официальное одобрение Росздравнадзора и Роспотребнадзора, обязательны. Кроме того, по-прежнему отсутствуют биобанки и последующие наблюдения за переболевшими пациентами. Отсутствуют инструменты искусственного интеллекта и машинного обучения для интерпретации результатов лабораторных исследований. Необходима солидарность в отношении доступных тестов, и, что важно, диагностика и меры инфекционного контроля должны быть тесно взаимосвязаны для борьбы с нынешними и будущими пандемиями. Диагно-

стика должна определять выбор терапии и последующее наблюдение за эффективностью ее проведения.

В связи с этим для совершенствования настоящих рекомендаций потребуются более полные данные.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chinazzi, M. et al. The effect of travel restrictions on the spread of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.aba9757> (2020).
2. Read, J. M., Bridgen, J. R. E., Cummings, D. A. T., Ho, A. & Jewell, C. P. Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. <https://doi.org/10.1101/2020.01.23.20018549> (2020).
3. Kucharski, A. J. et al. Early dynamics of transmission and control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30144-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30144-4) (2020).
4. Watson, J., Richter, A., Deeks, J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ.* 2020 Sep 8;370:m3325.
5. Gudbjartsson, D. F., Norddahl, G. L., Melsted, P., et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *Nº Engl J Med.* 2020 Sep 1 [Epub ahead of print].
6. Chandrashekar, A., Liu, J., Martinot, A. J., et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science.* 2020 May 20 [Epub ahead of print].
7. Kirkcaldy, R. D., King, B. A., Brooks, J. T. COVID-19 and postinfection immunity: limited evidence, many remaining questions. *JAMA.* 2020 May 11 [Epub ahead of print].
8. Ni, L., Ye, F., Cheng, M. L., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity.* 2020 Jun 16;52(6):971-7.
9. Public Health England. Past COVID-19 infection provides some immunity but people may still carry and transmit virus. 2021 [internet publication].
10. Kissler, S. M., Tedijanto, C., Goldstein, E., Grad, Y. H. & Lipsitch, M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science* 368, 860–868 (2020).
11. Borchering, R. K. et al. Impacts of Zika emergence in Latin America on endemic dengue transmission. *Nat. Commun.* 10, 5730 (2019).

12. He, D. et al. Global spatio-temporal patterns of influenza in the postpandemic era. *Sci. Rep.* 5, 11013 (2015).
13. Peiris, J. S. M. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767–1772 (2003).
14. Weissleder, R., Lee, H., Ko, J. & Pittet, M. J. COVID-19 diagnostics in context. *Sci. Transl Med.* 12, eabc1931 (2020).
15. Team NCPERE. Vital surveillances: the epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) – China. *China CDC Weekly.* 2020;2(8):113-22.
16. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods. Mol. Biol.* 1282, 1–23 (2015).
17. 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. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544 (2020).
18. Временные методические рекомендации МЗ РФ. Версия 7 от 03.06.2020. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
19. Guan, W. J. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032> (2020).
20. Pung, R. et al. Investigation of three clusters of COVID-19 in Singapore: implications for surveillance and response measures. *Lancet.* 395, 1039–1046 (2020).
21. Li, Q. et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 382, 1199–1207 (2020).
22. Lauer, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.* <https://doi.org/10.7326/m20-0504> (2020).
23. Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M. & Wang, Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30113-4) (2020).
24. Kim, J. Y. et al. Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 35, e86 (2020).
25. Zou, L. et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 382, 1177–1179 (2020).
26. Peiris, J. S. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767–1772 (2003).

27. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
28. Wang, D. et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323, 1061–1069 (2020).
29. Berlin, D. A., Gulick, R. M. & Martinez, F. J. Severe COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 383, 2451–2460 (2020).
30. Lavezzo, E. et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature* 584, 425–429 (2020).
31. Chan, J. F. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523 (2020).
32. Chen, G. et al. Clinical and immunologic features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/jci137244> (2020).
33. Liu, Y. et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci. China Life Sci.* 63, 364–374 (2020).
34. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 395, 507–513 (2020).
35. Phan, L. T. et al. Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 382, 872–874 (2020).
36. Zhang, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).
37. Siddiqi, H. K. & Mehra, M. R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transpl.* 39, 405–407 (2020).
38. Zhang, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).
39. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 395, 507–513 (2020).
40. Zhang, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).
41. Fung, M., Babik, J. M. COVID-19 in immunocompromised hosts: what we know so far. *Clin Infect Dis* 2021;72:340–50.
42. Pranata, R., Huang, I., Lim, M. A., Wahjoepramono, E. J., July, J. Impact of cerebrovascular and cardiovascular diseases on mortality and severity of COVID-19 systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020;29. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949.

43. Fadini, G. P., Morieri, M. L., Longato, E., Avogaro, A. Prevalence and impact of diabetes among people infected with SARS-CoV-2. *J Endocrinol Invest* 2020;43:867–9.
44. Lippi, G., Henry, B. M. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Respir Med* 2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc7154502/>.
45. Yang, J., Zheng, Y., Gou, X. et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020;94:91–5.
46. A Prüss-Ustün, J Wolf, C Corvalán, R Bos and M Neira, Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks. World Health Org, 2016.
47. Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M., et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA* 2020;323:2052–9.
48. Dai, Y., Liu, Z., Du, X. et al. Acute kidney injury in hospitalized patients infected with COVID-19 from Wuhan, China: a retrospective study. *Biomed Res Int* 2021;2021:6655185.
49. Dennis, A. et al. Multi-organ impairment in low-risk individuals with long COVID. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.10.14.20212555> (2020).
50. Ludvigsson, J. F. Case report and systematic review suggest that children may experience similar long-term effects to adults after clinical COVID-19. *Acta Paediatr.* <https://doi.org/10.1111/apa.15673> (2020).
51. Davido, B., Seang, S., Tubiana, R. & de Truchis, P. Post-COVID-19 chronic symptoms: a post-infectious entity? *Clin. Microbiol. Infec.* 26, 1448–1449 (2020).
52. Guillot, X., Ribera, A. & Gasque, P. Chikungunya-induced arthritis in Reunion Island: a long-term observational follow-up study showing frequently persistent joint symptoms, some cases of persistent chikungunya immunoglobulin M positivity, and no anticyclic citrullinated peptide seroconversion after 13 years. *J. Infect. Dis.* 222, 1740–1744 (2020).
53. Clark, D. V. et al. Long-term sequelae after Ebola virus disease in Bundibugyo, Uganda: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 15, 905–912 (2015).
54. Hickie, I. et al. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ.* 333, 575 (2006).
55. Whittaker, E. et al. Clinical characteristics of 58 children with a pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2. *JAMA.* 324, 259–269 (2020).

56. Belot, A. et al. SARS-CoV-2-related paediatric inflammatory multisystem syndrome, an epidemiological study, France, 1 March to 17 May 2020. *Euro. Surveill.* 25, 2001010 (2020).
57. Toubiana, J. et al. Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the COVID-19 pandemic in Paris, France: prospective observational study. *BMJ.* 369, m2094 (2020).
58. Morris, S. B. et al. Case series of multisystem inflammatory syndrome in adults associated with SARS-CoV-2 infection—United Kingdom and United States, March–August 2020. *Morbidity Mortal. Wkly Rep.* 69, 1450–1456 (2020).
59. Marrani, E., Burns, J. C. & Cimaz, R. How should we classify Kawasaki disease? *Front Immunol.* 9, 2974 (2018).
60. Whittaker, E. et al. Clinical characteristics of 58 children with a pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2. *JAMA* 324, 259–269 (2020).
61. Diorio, C. et al. Multisystem inflammatory syndrome in children and COVID-19 are distinct presentations of SARS-CoV-2. *J. Clin. Invest.* 130, 5967–5975 (2020).
62. Consiglio, C. R. et al. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell* 183, 968–981 (2020).
63. Consiglio, C. R. & Brodin, P. Stressful beginnings with long-term consequences. *Cell* 180, 820–821 (2020).
64. Gruber, C. et al. Mapping systemic inflammation and antibody responses in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Cell.* 183, 982–995 (2020).
65. Wucherpennig, K. W. *J. Clin. Invest.* 108, 1097–1104 (2001).
66. Zhang, Q. et al. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.abd4570> (2020).
67. Bastard, P. et al. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.abd4585> (2020).
68. Karki, R. et al. *Cell.* 184, 149–168.e17 (2021).
69. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 181, 271–280 (2020).
70. Xu, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral. Sci.* 12, 8 (2020).
71. Hikmet, F. et al. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol. Syst. Biol.* 16, e9610 (2020).
72. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 579, 270–273 (2020).
73. Zhao, Y. et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCoV. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.01.26.919985> (2020).

74. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS- CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058> (2020).
75. Qi, F., Qian, S., Zhang, S. & Zhang, Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 526, 135–140 (2020).
76. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173, 89–97 (2000).
77. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol* 23, 225–274 (2005).
78. Park, W. B. et al. Virus isolation from the first patient with SARS- CoV-2 in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 35, e84 (2020).
79. Zhang, H. et al. Histopathologic changes and SARS- CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* <https://doi.org/10.7326/m20-0533> (2020).
80. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916 (2005).
81. Yang, M. Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. *SSRN* <https://doi.org/10.2139/ssrn.3527420> (2020).
82. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 395, 497–506 (2020).
83. Zhang, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).
84. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
85. Tian, S. et al. Pulmonary pathology of early phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010> (2020).
86. Guan, W. J. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032> (2020).
87. Qin, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248> (2020).
88. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 395, 497–506 (2020).
89. Zhou, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395, 1054–1062 (2020).
90. Liao, M. et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single- cell RNA sequencing. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.02.23.20026690> (2020).

91. Zhou, Y. et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Natl. Sci. Rev.* <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041> (2020).
92. Miorin, L. et al. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117, 28344–28354 (2020).
93. Arunachalam, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science.* 369, 1210–1220 (2020).
94. Arunachalam, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science.* 369, 1210–1220 (2020).
95. Blanco-Melo, D. et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 181, 1036–1045 (2020).
96. Lucas, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 584, 463–469 (2020).
97. Vabret, N. et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity.* 52, 910–941 (2020).
98. Casanova, J.-L., Su, H. C. & COVID Human Genetic Effort. A global effort to define the human genetics of protective immunity to SARS-CoV-2 infection. *Cell.* 181, 1194–199 (2020), <https://www.covidhge.com>.
99. Zhang, Q. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 370, eabd4570 (2020).
100. Bastard, P. et al. Auto-antibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 370, eabd4585 (2020).
101. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
102. Tian, S. et al. Pulmonary pathology of early phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010> (2020).
103. Mihai, G. Netea et. al./Defining trained immunity and its role in health and disease/ *NATURE Reviews Immunology* volume 20/June 2020/375.
104. Biering-Sorensen, S. et al. Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighing <2500 g: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 65, 1183–1190 (2017).
105. Rieckmann, A. et al. Vaccinations against smallpox and tuberculosis are associated with better long-term survival: a Danish case-cohort study 1971–2010. *Int. J. Epidemiol.* 46, 695–705 (2017).

106. Aaby, P. et al. Vaccinia scars associated with better survival for adults. An observational study from Guinea-Bissau. *Vaccine*. 24, 5718–5725 (2006).
107. Aaby, P. et al. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J. Infect. Dis.* 204, 245–252 (2011).
108. Aaby, P. et al. Non-specific beneficial effect of measles immunisation: analysis of mortality studies from developing countries. *BMJ*. 311, 481–485 (1995).
109. Aaby, P. et al. Non-specific effects of standard measles vaccine at 4.5 and 9 months of age on childhood mortality: randomised controlled trial. *BMJ*. 341, c6495 (2010).
110. Lund, N. et al. The effect of oral polio vaccine at birth on infant mortality: a randomized trial. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1504–1511 (2015).
111. Andersen, A. et al. National immunization campaigns with oral polio vaccine reduce all-cause mortality: a natural experiment within seven randomized trials. *Front. Public Health*. 6, 13 (2018).
112. Kleinnijenhuis, J. et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 109, 17537–17542 (2012).
113. Kleinnijenhuis, J. et al. BCG-induced trained immunity in NK cells: role for non-specific protection to infection. *Clin. Immunol.* 155, 213–219 (2014).
114. Jensen, K. J. et al. Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in Guinea-Bissau: a randomized-controlled trial. *J. Infect. Dis.* 211, 956–967 (2015).
115. Freyne, B. et al. Neonatal BCG vaccination influences cytokine responses to toll-like receptor ligands and heterologous antigens. *J. Infect. Dis.* 217, 1798–1808 (2018).
116. Aaby, P. et al. Differences in female-male mortality after high-titre measles vaccine and association with subsequent vaccination with diphtheria-tetanus-pertussis and inactivated poliovirus: reanalysis of West African studies. *Lancet*. 361, 2183–2188 (2003).
117. Blok, B. A. et al. Interacting non-specific immunological effects of BCG and TDAPF vaccinations: an explorative randomized trial. *Clin. Infect. Dis.* 70, 455–463 (2019).
118. Nankabirwa, V. et al. Child survival and BCG vaccination: a community based prospective cohort study in Uganda. *BMC Public Health*. 15, 175 (2015).
119. Lipsitch, M., Grad, Y. H., Sette, A. & Crotty, S. Cross-reactive memory T cells and herd immunity to SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 709–713 (2020).
120. Mateus, J. et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* 370, 89–94 (2020).

121. Ng, K. W. et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*. 370, eabe1107 (2020).
122. Anderson, E. M. et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.20227215> (2020).
123. Tso, F. Y. et al. High prevalence of pre-existing serological cross-reactivity against SARS-CoV-2 in sub-Saharan Africa. *Int. J. Infect. Dis.* 102, 577–583 (2020).
124. Wu, J. T. et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat. Med.* 26, 506–510 (2020).
125. Zuo, J., Dowell, A., Pearce, H. et al. Robust SARS-CoV-2-specific T-cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *bioRxiv*. 2020 Nov 2 [Epub ahead of print].
126. Stephens, D. S., McElrath, M. J. COVID-19 and the path to immunity. *JAMA*. 2020 Sep 11 [Epub ahead of print].
127. Leo Swadling and Mala K. Maini. T cells in COVID-19 – united in diversity *Nature Immunology* | VOL 21 | November 2020 | 1307–1318 | www.nature.com/natureimmunology.
128. Grifoni, A. et al. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015> (2020).
129. Gallais, F. et al. //Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Induces Cellular Immune Response without Seroconversion//*medRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.06.21.20132449).
130. Yanchun Peng et. al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19// *Nature Immunology* | VOL 21 | November 2020 | 1336–1345 | www.nature.com/natureimmunology).
131. Grifoni, A. et al. Targets of T cell responses to SARS- CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 181, 1489–1501 (2020).
132. Juno, J. A. et al. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0995-0> (2020).
133. Humoral Immunity and Complement // *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* / Lowell A. Goldsmith, Stephen I. Katz, Barbara A. Gilchrist, Amy S. Paller, David J. Leffell, Klaus Wolff. – New York, NY: The McGraw-Hill Companies, 2012. Архивировано 2 января 2021 года.
134. Тарантул В. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. Русско-английский. – Litres, 2018. – Т. 1. – С. 490–491. – 986 с. – ISBN 978-5-04-099417-5.

135. Jr Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik. The Humoral Immune Response (англ.) // Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. — 2001. Архивировано 2 января 2021 года.
136. Gary, R. Klimpel. Immune Defenses (англ.) // Medical Microbiology / Samuel Baron. – Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. – ISBN 978-0-9631172-1-2. Архивировано 3 января 2021 года.
137. Dhama, K. et al. COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. *Hum. Vaccin. Immunother.* 18, 1–7 (2020).
138. Guo, L. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 71, 778–785 (2020).
139. Pillay, T. S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J. Clin. Pathol.* 73, 366–369 (2020).
140. Jiang, S., Hillyer, C. & Du, L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol.* 41, 355–359 (2020).
141. Jang, S., He, Y. & Liu, S. SARS vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1016–1020 (2005).
142. Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 269–270 (2020).
143. Li, L. et al. Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and life-threatening COVID-19: a randomized clinical trial. *J. Am. Med. Assoc.* 324, 460–470 (2020).
144. Suthar, M. S. et al. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. *Cell Rep Med.* 1, 100040 (2020).
145. Premkumar, L. et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 5, (2020).
146. Weihong Zeng et al. Characterization of SARS-CoV-2-specific antibodies in COVID-19 patients reveals highly potent neutralizing IgA/ Signal Transduction and Targeted Therapy (2021) 6: 35; <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00478-7>.
147. Ahmed, S. F., Quadeer, A. A. & McKay, M. R. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses* 12, E254 (2020).
148. Zhang, L. et al. Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals. *J. Med. Virol.* 78, 1–8 (2006).
149. Guo, L. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 71, 778–785 (2020).

150. Ren, L. et al. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19 COMMUNICATIONS BIOLOGY | (2020) 3:780 | <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01526-8> | www.nature.com/commsbio.
151. Kening, Li et. al, Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. NATURE COMMUNICATIONS/ (2020) 11:6044/ <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19943-y> / www.nature.com/naturecommunications).
152. Liu, Y. et al. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.20024166v3> (2020).
153. Lippi, G. & Plebani, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. Clin. Chem Lab. Med. 58, 1131–1134 (2020).
154. Tan, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. Signal Transduct. Target Ther. 5, 33 (2020).
155. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395, 497–506 (2020).
156. Lu, X. et al. SARS-CoV-2 infection in children. N. Engl. J. Med. 382, 1663–1665 (2020).
157. Chu, Y., Li, T., Fang, Q. & Wang, X. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): A multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. J. Infect. 80, 388–393 (2020).
158. Wu, J. et al. Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu province: a multicenter descriptive Study. Clin. Infect. Dis. ciaa199, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199> (2020).
159. Xu, X. W. et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. BMJ 368, m606 (2020).
160. Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 579, 265–269 (2020).
161. Chan, J. F. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet 395, 514–523 (2020).
162. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270–273 (2020).
163. Chen, H. et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. Lancet 395, 809–815 (2020).

164. Guan, W. J. et al. Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 382, 1708–1720 (2020).
165. Wan, S. et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021832v1> (2020).
166. Diao, B et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 11, 827 (2020).
167. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
168. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
169. Qin, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* ciaa248, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248> (2020).
170. Tan, M. et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology* 160, 261–268 (2020).
171. Liu, J. et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 55, 102763 (2020).
172. Ni, L., Ye, F., & Cheng, M.-L. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity.* 52, 971–977. e3 (2020).
173. Li, C. K. et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol.* 181, 5490–5500 (2008).
174. Zhou, Y. et al. Aberrant pathogenic GM-CSF+T cells and inflammatory CD14+CD16+monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.12.945576v1> (2020).
175. Croft, M., So, T., Duan, W. & Soroosh, P. The significance of OX40 and OX40L to Tcell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* 229, 173–191 (2009).
176. Laderach, D., Movassagh, M., Johnson, A., Mittler, R. S. & Galy, A. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *Int Immunol.* 14, 1155–1167 (2002).
177. Thevarajan, I. et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat. Med.* 26, 453–455 (2020).
178. Diao, B et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 11, 827 (2020).

179. Zheng, H. Y. et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* 17, 541–543 (2020).
180. Zhang, B. et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.12.20035048v1> (2020).
181. Liu, Y. et al. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.20024166v3> (2020).
182. Lippi, G. & Plebani, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin. Chem Lab. Med.* 58, 1131–1134 (2020).
183. Liu, J. et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 55, 102763 (2020).
184. Li, J. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio positively correlates to age in healthy population. *J. Clin. Lab Anal.* 29, 437–43 (2014).
185. Yilmaz, H. et al. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio to prediction of type 2 diabetes mellitus in morbid obesity. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 9, 299–304 (2015).
186. Zhang, B. et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.12.20035048v1> (2020).
187. Yip, M. S. et al. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong. Kong Med. J.* 22, 25–31 (2016).
188. Wen, W. et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov.* 6, 31 (2020).
189. Wu, D. & Yang, X. O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53, 368–370 (2020).
190. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
191. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
192. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513 (2020).
193. Qin, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* ciaa248, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248> (2020).

194. Liu, J. et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 55,102763 (2020).
195. Wan, S. et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021832v1> (2020).
196. Diao, B. et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 11, 827 (2020).
197. Yang, L. et al. Immune characteristics predict outcome of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.* in press, (2020).
198. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
199. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
200. Zhang, B. et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.12.20035048v1> (2020).
201. Zhao, J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* ciaa344, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344> (2020).
202. Long, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 26, 845–848 (2020).
203. Nicol, T. et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J. Clin. Virol.* 129, 104511 (2020).
204. Diao, B. et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 11, 827 (2020).
205. Yang, L. et al. Immune characteristics predict outcome of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.* in press (2020).
206. McFadyen, J. D., Stevens, H. & Peter, K. The emerging threat of (micro)thrombosis in COVID-19 and its therapeutic implications. *Circ. Res.* 127, 571–587 (2020).
207. Ranucci, M. et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1747–1751 (2020).
208. Gupta, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 26, 1017–1032 (2020).

209. Fox, S. E. et al. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir. Med.* 8, 681–686 (2020).
210. Wichmann, D. et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann. Intern. Med.* 173, 268–277 (2020).
211. Carsana, L. et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 20, 1135–1140 (2020).
212. Schurink, B. et al. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe.* 1, e290–e299 (2020).
213. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34–45 (2013).
214. Siddiqi, H. K. & Mehra, M. R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinicaltherapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transpl.* 39, 405–407 (2020).
215. Buckley, L. F. et al. Role for anti-cytokine therapies in severe coronavirus disease 2019. *Crit. Care Explor.* 2, e0178 (2020).
216. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 395, 497–506 (2020).
217. Vecchie, A. et al. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? *J. Cell Physiol.* 236, 1638–1657 (2021).
218. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine storm. *N. Engl. J. Med.* 383, 2255–2273 (2020).
219. Mehta, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 395, 1033–1034 (2020).
220. Kox, M., Waalders, N. J. B., Kooistra, E. J., Gerretsen, J. & Pickkers, P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA.* 324, 1565–1567 (2020).
221. Leisman, D. E. et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.* 8, 1233–1244 (2020).
222. Blanco-Melo, D. et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 181, 1036–1045.e9 (2020).
223. Rodrigues, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* 218, e20201707 (2021).

224. Wang, C. et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. *EbioMedicine*. 57, 102833 (2020).
225. Adachi, T. et al. Clinicopathologic and immunohistochemical findings from autopsy of patient with COVID-19, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 2157–2161 (2020).
226. Liao, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 26, 842–844 (2020).
227. Alon, R. et al. Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 49–64 (2021).
228. Tay, M. Z., Poh, C. M., Renia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 363–374 (2020).
229. Tang, N., Li, D., Wang, X. & Sun, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 18, 844–847 (2020).
230. Panigada, M. et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: a report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1738–1742 (2020).
231. Goshua, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 7, e575–e582 (2020).
232. Iba, T., Levy, J. H., Levi, M., Connors, J. M. & Thachil, J. Coagulopathy of coronavirus disease 2019. *Crit. Care Med.* 48, 1358–1364 (2020).
233. Gazzaruso, C. et al. Association between antithrombin and mortality in patients with COVID-19. A possible link with obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 30, 1914–1919 (2020).
234. Mir, N., D’Amico, A., Dasher, J., Tolwani, A. & Valentine, V. Understanding the andromeda strain – the role of cytokine release, coagulopathy and antithrombin III in SARS-CoV2 critical illness. *Blood Rev.* 45, 100731 (2021).
235. Wang, Y. et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J. Hepatol.* 73, 807–816 (2020).
236. Portincasa, P., Krawczyk, M., Machill, A., Lammert, F. & Di Ciaula, A. Hepatic consequences of COVID-19 infection. Lapping or biting? *Eur. J. Intern. Med.* 77, 18–24 (2020).
237. Whyte, C. S., Morrow, G. B., Mitchell, J. L., Chowdary, P. & Mutch, N. J. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1548–1555 (2020).
238. Iba, T., Warkentin, T. E., Thachil, J., Levi, M. & Levy, J. H. Proposal of the definition for COVID-19-associated coagulopathy. *J. Clin. Med.* 10, 191 (2021).

239. Tian, S. et al. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 15, 700–704 (2020).
240. Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 395, 1417–1418 (2020).
241. Schaller, T. et al. Postmortem examination of patients with COVID-19. *JAMA.* 323, 2518–2520 (2020).
242. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A. & Bridgewood, C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun. Rev.* 19, 102537 (2020).
243. Chen, L. & Hao, G. The role of angiotensin-converting enzyme 2 in coronaviruses/ influenza viruses and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 116, 1932–1936 (2020).
244. Magro, C. et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl Res.* 220, 1–13 (2020).
245. Zhang, H. et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 172, 629–632 (2020).
246. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
247. Teuwen, L. A., Geldhof, V., Pasut, A. & Carmeliet, P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 389–391 (2020).
248. Wichmann, D. et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann. Intern. Med.* 173, 268–277 (2020).
249. Fox, S. E. et al. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir. Med.* 8, 681–686 (2020).
250. Carsana, L. et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 20, 1135–1140 (2020).
251. Tian, S. et al. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 15, 700–704 (2020).
252. Levi, M. & van der Poll, T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* 149, 38–44 (2017).
253. Panigada, M. et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: a report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1738–1742 (2020).

254. Goshua, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 7, e575–e582 (2020).
255. Helms, J. et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 46, 1089–1098 (2020).
256. Escher, R., Breakey, N. & Lammler, B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thromb. Res.* 190, 62 (2020).
257. Goshua, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 7, e575–e582 (2020).
258. Guervilly, C. et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19. *J. Infect. Dis.* 222, 1789–1793 (2020).
259. McGonagle, D., O'Donnell, J. S., Sharif, K., Emery, P. & Bridgewood, C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *Lancet Rheumatol.* 2, e437–e445 (2020).
260. Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 395, 1417–1418 (2020).
261. Marini, J. J. & Gattinoni, L. Management of COVID-19 respiratory distress. *JAMA* 323, 2329–2330 (2020).
262. Perico, L. et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* 17, 46–64 (2021).
263. Bonetti, P. O., Lerman, L. O. & Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 168–175 (2003).
264. Levi, M. & van der Poll, T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* 149, 38–44 (2017).
265. Hottz, E. D. et al. Platelet activation and platelet–monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood.* 136, 1330–1341 (2020).
266. Nicolai, L. et al. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation.* 142, 1176–1189 (2020).
267. Levi, M. Platelets in critical illness. *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 252–257 (2016).
268. Zaid, Y. et al. Platelets can associate with SARS-Cov-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19. *Circ. Res.* 127, 1404–1418 (2020).
269. Chrysanthopoulou, A. et al. Interferon λ 1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation. *J. Pathol.* 243, 111–122 (2017).
270. Nicolai, L. et al. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation.* 142, 1176–1189 (2020).

271. Goshua, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 7, e575–e582 (2020).
272. Gu, S. X. et al. Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat. Rev. Cardiol.* 18, 194–209 (2021).
273. Ciceri, F. et al. Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. *Crit. Care Resusc.* 22, 95–97 (2020).
274. Goshua, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 7, e575–e582 (2020).
275. Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 395, 1417–1418 (2020).
276. Bradley, B. T. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet* 396, 320–332 (2020).
277. Zaid, Y. et al. Platelets can associate with SARS-Cov-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19. *Circ. Res.* 127, 1404–1418 (2020).
278. Manne, B. K. et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* 136, 1317–1329 (2020).
279. Zhang, S. et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J. Hematol. Oncol.* 13, 120 (2020).
280. Yan, S. F., Mackman, N., Kisiel, W., Stern, D. M. & Pinsky, D. J. Hypoxia/hypoxemia-induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2029–2035 (1999).
281. Thevarajan, I. et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat. Med.* 26, 453–455 (2020).
282. Perlman, S. & Dandekar, A. A. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 917–927 (2005).
283. Moon, C. Fighting COVID-19 exhausts T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 277 (2020).
284. Tan, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct. Target Ther.* 5, 33 (2020).
285. Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 269–270 (2020).
286. Li, D. et al. Immune dysfunction leads to mortality and organ injury in patients with COVID-19 in China: insights from ERS-COVID-19 study. *Signal Transduct. Target Ther.* 5, 62 (2020).
287. Liu, Y. et al. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.20024166v3> (2020).

288. Deshmukh, H. S. et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat. Med.* 20, 524–530 (2014).
289. Smith, C. K. & Trinchieri, G. The interplay between neutrophils and microbiota in cancer. *J. Leukoc. Biol.* 104, 701–715 (2018).
290. Roncati, L., Nasillo, V., Lusenti, B. & Riva, G. Signals of T h 2 immune response from COVID-19 patients requiring intensive care. *Ann. Hematol.* 99, 1419–1420 (2020).
291. Katzelnick, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* 358, 929–932 (2017).
292. Taylor, A. et al. *Immunol. Rev.* 268, 340–364 (2015).
293. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8 (2020).
294. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6 (2020). 55. Wrapp, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263 (2020).
295. Muus, C. et al. Integrated analyses of single-cell atlases reveal age, gender, and smoking status associations with cell type-specific expression of mediators of SARS-CoV-2 viral entry and highlights inflammatory programs in putative target cells. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.19.049254v2> (2020).
296. Sungnak, W. et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat. Med.* 26, 681–687 (2020).
297. Ziegler, C. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is enriched in specific cell subsets across tissues. *Cell* 181, 1016–1035.e19 (2020).
298. Chan, J. F. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523 (2020).
299. Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74 (2016).
300. Yang, L. et al. Immune characteristics predict outcome of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.* in press, (2020).
301. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513 (2020).

302. Zhou, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395, 1054–1062 (2020).
303. Kim, D., Quinn, J., Pinsky, B., Shah, N. H. & Brown, I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *J. Am. Med. Assoc.* 323, 2085–2086 (2020).
304. Peiris, J. S. M. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767–1772 (2003).
305. Zlosnik, J. E. A. et al. Burkholderia species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada: 30 years' experience. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 70–78 (2015).
306. Drevinek, P. & Mahenthiralingam, E. Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 821–830 (2010).
307. Otto, M. Staphylococcus epidermidis – the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 555–567 (2009).
308. Lee, J. Y. H. et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of Staphylococcus epidermidis. *Nat. Microbiol.* 3, 1175–1185 (2018).
309. Valentine-King, M. A., Cisneros, K., James, M. O., Huigens, R. W. & Brown, M. B. Turning the tide against antibiotic resistance by evaluating novel, halogenated phenazine, quinoline, and NH125 compounds against ureaplasma species clinical isolates and Mycoplasma type strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e02265–18 (2019).
310. Krause, R. & Schubert, S. In-vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against Mycoplasma hominis and Ureaplasma ssp. isolated in Germany over 20 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1649–1655 (2009).
311. Otto, M. Staphylococcus epidermidis – the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 555–567 (2009).
312. Man, W. H., De Steenhuijsen Piters, W. A. A. & Bogaert, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 259–270 (2017).
313. Prompetchara, E., Ketloy, C. & Palaga, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 38, 1–9 (2020).
314. Liu, Y. et al. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.20024166v3> (2020).

315. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422 (2020).
316. Wu, J. et al. Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu province: a multicenter descriptive Study. *Clin. Infect. Dis.* ciaa199, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199> (2020).
317. Cai, J. et al. A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.* ciaa198, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa198> (2020).
318. Moon, C. Fighting COVID-19 exhausts T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 277 (2020).
319. Vaninov, N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 277 (2020).
320. Yang, L. et al. Immune characteristics predict outcome of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.* in press, (2020).
321. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513 (2020).
322. Lurie, N., Saville, M., Hatchett, R. & Halton, J. Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *N. Engl. J. Med.* 382, 1969–1973 (2020).
323. Amanat, F. & Krammer, F. Perspective SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity* 52, 583–589 (2020).
324. WHO. Target product profiles for COVID-19 vaccines. April 9, 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profiles-for-covid-19-vaccines> (accessed Dec 1, 2020).
325. Klein, S. L., Jedlicka, A. & Pekosz, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect. Dis.* 10, 338–349 (2010).
326. Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G. & Kennedy, R. B. Personalized vaccinology: a review. *Vaccine* 36, 5350–5357 (2018).
327. Sette, A. & Crotty, S. Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 457–458 (2020).
328. Jackson, L. A. et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 383, 1920–1931 (2020).
329. Folegatti, P. M. et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 396, 467–478 (2020).
330. Keech, C. et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383, 2320–2332 (2020).

331. Mulligan, M. J. et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 586, 589–593 (2020).
332. Voysey, M, Clemens, S. A. C., Madhi, S. A. et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021; 397: 99–111.
333. Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G. et al. Safety and immunogenicity of the Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine candidate: interim results of a phase 1/2a, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *medRxiv* 2020; published online Sept 25. <https://doi.org/10.1101/2020.09.23.20199604> (preprint).
334. Zhu, F.-C., Guan, X.-H., Li, Y.-H. et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2020; 396: 479–88.
335. Almuqrin, A., Davidson, A. D., Williamson, M. K. et al. SARS-CoV-2 candidate vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals a normal low range of viral backbone gene expression alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein expression. *Res Square* 2020; published online Oct 20. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-94837/v1> (preprint).
336. Liu, J., Ewald, BA., Lynch, DM. et al. Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J Virol* 2008; 82: 4844–52.
337. Lu, S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 346–51.
338. Logunov, D. Y. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. www.thelancet.com / Published online February 2, 2021 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8).
339. By Ewen Callaway & Heidi Ledford, HOW TO REDESIGN COVID VACCINES SO THEY PROTECT AGAINST VARIANTS, *Nature*/ Vol 590 / 4 February 2021/1.
340. World Health Organization. SARS-CoV-2 variants. 2020 [internet publication].
341. Centers for Disease Control and Prevention. Emerging SARS-CoV-2 variants. 2021 [internet publication].
342. Imperial College London; Volz, E., Mishra, S., Chand, M., et al. Report 42: transmission of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England – insights from linking epidemiological and genetic data. 2020 [internet publication].
343. Public Health England. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant: variant of concern 202012/0. 2021 [internet publication].

344. Public Health England. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant: variant of concern 202012/0. 2021 [internet publication].
345. World Health Organization. SARS-CoV-2 variants. 2020 [internet publication]] [38 Centers for Disease Control and Prevention. Emerging SARS-CoV-2 variants. 2021 [internet publication].
346. Centers for Disease Control and Prevention. Emerging SARS-CoV-2 variants. 2021 [internet publication].
347. Centers for Disease Control and Prevention. Emerging SARS-CoV-2 variants. 2021 [internet publication].
348. World Health Organization. SARS-CoV-2 mink-associated variant strain: Denmark. 2020 [internet publication].
349. Statens Serum Institut. Mutations in the mink virus. 2020 [internet publication].
350. Salje, H. et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science* 369, 208–211 (2020).
351. Britton, T., Ball, F. & Trapman, P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS- CoV-2. *Science* 369, 846–849 (2020).
352. Goldstein, E., Lipsitch, M. & Cevik, M. On the effect of age on the transmission of SARS- CoV-2 in households, schools and the community. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.07.19.20157362> (2020).
353. Byambasuren, O. et al. Estimating the seroprevalence of SARS- CoV-2 infections: systematic review. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.20153163> (2020).
354. Salje, H. et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science* 369, 208–211 (2020).
355. Flaxman, S. et al. Estimating the effects of non- pharmaceutical interventions on COVID-19 in Europe. *Nature* 584, 257–261 (2020).
356. Sekine, T. et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017> (2020).
357. Sette, A. & Crotty, S. Pre-existing immunity to SARS- CoV-2: the knowns and unknowns. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 457–458 (2020).
358. Sermet-Gaudelus, I. et al. Prior infection by seasonal coronaviruses does not prevent SARS- CoV-2 infection and associated multisystem inflammatory syndrome in children. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.20142596> (2020).
359. Miller, M. A., Viboud, C., Balinska, M. & Simonsen, S. The signature features of influenza pandemics — implications for policy. *N. Engl. J. Med.* 360, 2595–2598 (2009).

360. Molony, R. D. et al. Aging impairs both primary and secondary RIG-I signaling for interferon induction in human monocytes. *Sci. Signal.* 10, eaan2392 (2017).
361. Han, Y. et al. Lactate dehydrogenase, a risk factor of severe COVID-19 patients. *Aging* 12, 11245–11258 (2020).
362. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A. & Bridgewood, C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun. Rev.* 19, 102537 (2020).
363. Pido-Lopez, J., Imami, N. & Aspinall, R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.* 125, 409–413 (2001).
364. Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R. & Goriely, S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity* 37, 771–783 (2012).
365. Mertz, D. et al. Pregnancy as a risk factor for severe outcomes from influenza virus infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Vaccine* 35, 521–528 (2017).
366. Kam, K. Q. et al. A well infant with coronavirus disease 2019 (COVID-19) with high viral load. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa201> (2020).
367. Saso, A. & Kampmann, B. Vaccine responses in newborns. *Semin. Immunopathol.* 39, 627–642 (2017).
368. Dong, Y. et al. Epidemiological characteristics of 2143 pediatric patients with 2019 coronavirus disease in China. *Pediatrics* <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702> (2020).
369. Berghöfer, B. et al. TLR7 ligands induce higher IFN- α production in females. *J. Immunol.* 177, 2088–2096 (2006).
370. Klein, S. L., Marriott, I. & Fish, E. N. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. H.* 109, 9–15 (2015).
371. Klein, S. L., Jedlicka, A. & Pekosz, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect. Dis.* 10, 338–349 (2010).
372. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Chin. J. Epidemiol.* 41, 145–151 (2020).
373. Webb, K. et al. Sex and pubertal differences in the type 1 interferon pathway associate with both X chromosome number and serum sex hormone concentration. *Front Immunol.* 9, 3167 (2019).
374. Taneja, V. Sex hormones determine immune response. *Front. Immunol.* 9, 1931 (2018).

375. Bastard, P. et al. Auto-antibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370, eabd4585 (2020).
376. Takahashi, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 588, 315–320 (2020).
377. Whittaker, E. et al. Clinical characteristics of 58 children with a pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2. *JAMA* 324, 259–269 (2020).
378. Dennis, A. et al. Multi-organ impairment in low-risk individuals with long COVID. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.10.14.20212555> (2020).
379. Ludvigsson, J. F. Case report and systematic review suggest that children may experience similar long-term effects to adults after clinical COVID-19. *Acta Paediatr.* <https://doi.org/10.1111/apa.15673> (2020).
380. Методические рекомендации МР 3.1.0169-20 (в редакции МР 3.1.0174-20 Изменения № 1 в МР 3.1.0170-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утверждены Роспотребнадзором 30.04.2020).
381. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (утверждены Роспотребнадзором от 28 января 2008 г. № 4).
382. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» (утверждены Роспотребнадзором от 28 ноября 2013 г. № 64).
383. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2008 № 4 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08» (зарегистрирован Минюстом России 21.02.2008 № 11197).
384. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021. № 3).
385. Временные методические рекомендации МЗ РФ Версия 10 от 08.02.2021. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
386. Письмо Роспотребнадзора от 07.04.2020 № 02/6339-2020-32 «О направлении памятки по применению многоразовой защитной одежды при COVID-19».

387. СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.05.2020 № 15).
388. Методические рекомендации ДЗМ МР № 89 от 21.07.2020 «Временное руководство по лабораторной диагностике COVID-19 в условиях пандемии».
389. Методические рекомендации ДЗМ МР № 28 от 04.07.2017 г. «Организация работы пунктов приема биологического материала».
390. Lee, L. Y. et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 118, 3478–3490 (2008).
391. Li, C. K. et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol.* 181, 5490–5500 (2008).
392. Powell, T. J. et al. Identification of H5N1-specific T-cell responses in a high-risk cohort in Vietnam indicates the existence of potential asymptomatic infections. *J. Infect. Dis.* 205, 20–27 (2012).
393. Dong, T. et al. Extensive HLA-driven viral diversity following a narrow-source HIV-1 outbreak in rural China. *Blood* 118, 98–106 (2011).
394. Le Bert, N. et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z> (2020).
395. Peng, Y. et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 21, 1336–1345 (2020).
396. Su, L. F. & Davis, M. M. Antiviral memory phenotype T cells in unexposed adults. *Immunol. Rev.* 255, 95–109 (2013).
397. Campion, S. L. et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4+ T cells in unexposed blood donors. *J. Exp. Med.* 211, 1273–1280 (2014).
398. Sekine, T. et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 183, 158–168 (2020).
399. Grifoni, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 181, 1489–1501 (2020).
400. Su, Laura F. et al. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity* 38, 373–383 (2013).
401. Ane Ogbe, et al/T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses/ *NATURE COMMUNICATIONS* | (2021) 12:2055 | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21856-3> | www.nature.com/naturecommunications.

402. Nature Biotechnology | VOL 39 | May 2021 | 529–539 | www.nature.com/naturebiotechnology.
403. Karulin, A. Y. & Lehmann, P. V. How ELISPOT morphology reflects on the productivity and kinetics of cells' secretory activity. *Methods Mol. Biol.* 792, 125–143 (2012).
404. Czerkinsky, C. et al. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods* 110, 29–36 (1988).
405. Janetzki, S., Cox, J. H., Oden, N. & Ferrari, G. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. *Methods Mol. Biol.* 302, 51–86 (2005).
406. Janetzki, S. et al. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 303–315 (2008).
407. Britten, C. M. et al. The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 289–302 (2008).
408. Cox, J. H. et al. Results of an ELISPOT proficiency panel conducted in 11 laboratories participating in international human immunodeficiency virus type 1 vaccine trials. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 68–81 (2005).
409. Yasushi Miyahira, Kenichiro Murata, Dolores Rodriguez, Juan R. Rodriguez, Mariano Esteban, et al. (1995). Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *Journal of Immunological Methods.* 181, 45–54.
410. Karulin, A., Karacsony, K., Zhang, W., Targoni, O., Moldovan, I., et al. (2015). ELISPOTs Produced by CD8 and CD4 Cells Follow Log Normal Size Distribution Permitting Objective Counting. *Cells.* 4, 56–70.
411. Gratama, J. W., Sutherland, D. R., Keeney, M., Papa. S. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:14–22.
412. Hrusak. O., Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting enotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; 16:1233–1258.
413. Cualing, H. D. Automated analysis in flow cytometry. *Cytometry.* 2000 Apr 15;42(2):110–3.
414. Nature Biotechnology | VOL 39 | May 2021 | 533–534| www.nature.com/naturebiotechnology.
415. Временные методические рекомендации МЗ РФ. Версия 11 от 07.05.2021. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в Приложении 3-2.

416. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings, CDC (May, 2020), <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>.
417. Lisboa Bastos, M., Tavaziva, G., Abidi, S. K. et al. Diagnostic accuracy of serological tests for COVID-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 Jul 1;370:m2516.
418. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/testing/serology-overview.html>.
419. World Health Organization. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19: scientific brief. 2020 [internet publication].
420. Allison, N. Grossberg et al. A multiplex chemiluminescent immunoassay for serological profiling of COVID-19-positive symptomatic and asymptomatic patients. *NATURE COMMUNICATIONS* | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21040-7>.
421. Bryan, A. et al. Anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies are associated with reduced viral load. *medRxiv*, 2020.2005.2022.20110551 (2020).
422. Wang, B. et al. Long-term coexistence of SARS-CoV-2 with antibody response in COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 92, 1684–1689 (2020).
423. Du, S. Q. & Yuan, W. Mathematical modeling of interaction between innate and adaptive immune responses in COVID-19 and implications for viral pathogenesis. *J. Med. Virol.* 92, 1615–1628 (2020).
424. Vashist, S. K. In vitro diagnostic assays for COVID-19: recent advances and emerging trends. *Diagnostics (Basel)* 10, 202 (2020).
425. Ma, H. et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol. Immunol.* 17, 773–775 (2020).
426. Yu, H. Q. et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.* 56, 2001526 (2020).
427. Jacpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1, 11–22 (2008).
428. Nuccetelli M. et al. SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? Nuccetelli et al. *Cell Death Discovery* (2020) 6:38 <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>.
429. John Wiley & Sons, Ltd. PMID: 32584464 PMCID: PMC7387103 (доступно на 2021-06-25) DOI: 10.1002 / 14651858.CD013652.
430. Nie, J. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 680–686 (2020).
431. Zhao, G. et al. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV. *Virol. J.* 10, 266–274 (2013).

432. Schmidt, F. et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20201181> (2020).
433. Gronvall, G. et al. Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States, Published on April 22, 2020, Johns Hopkins University.
434. Wu, F. et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. <https://www.ssrn.com/abstract=3566211> (2020).
435. Robbiani, D. F. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 584, 437–442 (2020).
436. Grzelak, L. et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci. Transl. Med.* 12, eabc3103. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3103> (2020).
437. Wang, Y. et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J. Clin. Investig.* 130, 5235–5244 (2020).
438. Chen, X. et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 180 (2020).
439. Gupta, V. et al. Asymptomatic reinfection in two healthcare workers from India with genetically distinct SARS-CoV-2. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1451> (2020).
440. To, K. K.-W. et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1275> (2020).
441. Wan, Y. et al. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *J. Virol.* 94, e02015 (2020).
442. Grifoni, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 181, 1489–1501.e15 (2020).
443. Sekine, T. et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 183, 158–168.e14 (2020).
444. Zhao, J. et al. Airway memory CD4(+) T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses. *Immunity* 44, 1379–1391 (2016).
445. Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses: drug discovery and therapeutic options. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 327–347 (2016).
446. Robbiani, D. F. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 584, 437–442 (2020).
447. Флетчер, Р., Флетчер, С., Вагнер, Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. М., Медиа Сфера, 1998. 352 с.

448. Ombelet, S. et al. Clinical bacteriology in low- resource settings: today's solutions. *Lancet Infect. Dis.* 18, e248–e258 (2018).
449. Shammi, M., Bodrud-Doza, M., Towfiqul Islam, A. R. M. & Rahman, M. M. COVID-19 pandemic, socioeconomic crisis and human stress in resource – limited settings: a case from Bangladesh. *Heliyon* 6, e04063 (2020).
450. Bossuyt, P. M. et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Radiology* 277, 826–832 (2015).
451. World Health Organization. Technical guidance series (TGS) for WHO prequalification – diagnostic assessment panels for quality assurance and quality control of in vitro diagnostic medical devices. In *Technical Guidance* vol. 6. https://www.who.int/diagnostics_laboratory/guidance/technical_guidance_series/en/ (2017).
452. World Health Organization. Technical guidance series (TGS) for WHO prequalification – designing instructions for use for in vitro diagnostic medical devices. in *Technical Guidance* vol. 5. https://www.who.int/diagnostics_laboratory/guidance/technical_guidance_series/en/ (2017).
453. Guest, J. L., Del Rio, C. & Sanchez, T. The three steps needed to end the COVID-19 pandemic: bold public health leadership, rapid innovations, and courageous political will. *JMIR Public Health Surveill.* 6, e19043 (2020).
454. Okba, N. M. A. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1478–1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841> (2020).
455. Zhang, G., Nie, S., Zhang, Z. & Zhang, Z. Longitudinal change of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.* 222, 183–188. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa229> (2020).
456. Grzelak, L. et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci. Transl. Med.* 12, 3103. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3103> (2020).
457. Whitman, J. D. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0659-0> (2020).
458. Mariën, J. et al. Evaluating SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins as targets for antibody detection in severe and mild COVID-19 cases using a Luminex bead-based assay. *J. Virol. Methods* 288, 114025 (2021).
459. Terpos, E. et al. Anti-SARS-CoV-2 antibody responses in convalescent plasma donors are increased in hospitalized patients; subanalyses of a phase 2 clinical study. *Microorganisms* 8, 1885 (2020).
460. Wan Ni Chia, Feng Zhu, Sean Wei Xiang Ong et al. Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study/ www.thelancet.com/microbe Vol 2 June 2021.

461. David Adam. The rush to study fast-spreading coronavirus variants. 20 | Nature | Vol 594 | 3 June 2021.
462. Ray, J. G., Schull, M. J., Vermeulen, M. J. & Park, A. L. Association between ABO and Rh blood groups and SARS-CoV-2 infection or severe COVID-19 illness: a population-based cohort study. *Ann. Intern. Med.* 174, 308–315 (2021).
463. Michael Zietz et al. Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. *NATURE COMMUNICATIONS* | (2020) 11:5761 | <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19623-x> | www.nature.com/naturecommunications.
464. Cai, Q. et al. Obesity and COVID-19 severity in a designated hospital in Shenzhen, China. *Diabetes Care* 43, 1392–1398 (2020).
465. Kumar, A. et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis. *Diabetes Metab. Syndr.* 14, 535–545 (2020).
466. Henry, B. M. & Lippi, G. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Int. Urol. Nephrol.* 52, 1193–1194 (2020).
467. Honce, R. et al. Obesity-related microenvironment promotes emergence of virulent influenza virus strains. *mBio* 11, e03341-19 (2020).
468. Hadjadj, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369, 718–724 (2020). This study identifies low levels of type I interferon in the blood as a marker of COVID-19 disease severity.
469. Tan, W. & Aboulhosn, J. The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. *Int. J. Cardiol.* 309, 70–77 (2020).
470. Zhou, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395, 1054–1062 (2020).
471. Al-Thani, M. H., Farag, E., Bertollini, R. et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection in the craft and manual worker population of Qatar. *medRxiv* 2020:2020.11.24.20237719.
472. Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H., Ayoub, H. H. et al. Characterizing the Qatar advanced-phase SARS-CoV-2 epidemic. *medRxiv* 2020:2020.07.16.20155317v2.
473. Ayoub, H. H., Chemaitelly, H., Seedat, S. et al. Mathematical modeling of the SARS-CoV-2 epidemic in Qatar and its impact on the national response to COVID-19. *medRxiv* 2020:2020.11.08.20184663.
474. Jeremijenko, A., Chemaitelly, H., Ayoub, H. H. et al. Evidence for and level of herd immunity against SARS-CoV-2 infection: the ten-community study. *medRxiv* 2020:2020.09.24.20200543.
475. Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H., Malek, J. A. et al. Assessment of the risk of SARS-CoV-2 reinfection in an intense re-exposure setting. *medRxiv* 2020:2020.08.24.20179457.

476. Mindray. CL-900i Chemiluminescence immunoassay system. Available at: <https://www.mindray.com/en/product/CL-900i.html>. Accessed September 20, 2020.
477. BioMerieux. VIDAS SARS-CoV-2: Two immunoassay tests to detect IgM & IgG antibodies.
478. The Roche Group. Roche's COVID-19 antibody test receives FDA Emergency Use Authorization and is available in markets accepting the CE mark. Available at: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2020-05-03.htm>. Accessed June 5, 2020.
479. Nuccetelli, M., Pieri, M., Grelli, S., et al. SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? *Cell Death Discov* 2020; 6.
480. Wolff, F., Dahma, H., Duterme, C. et al. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; 98:115140.
481. Sethuraman, N., Jeremiah, S.S., Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 2020.
482. Wajnberg, A., Mansour, M., Leven, E. et al. Humoral immune response and prolonged PCR positivity in a cohort of 1343 SARS-CoV 2 patients in the New York City region. *medRxiv* 2020:2020.04.30.20085613.
483. 22 Public Health England. Evaluation of Roche Elecsys AntiSARS-CoV-2 serology assay for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/891598/Evaluation_of_Roche_Elecsys_anti_SARS_CoV_2_PHE_200610_v8.1_FINAL.pdf. Accessed on June 5, 2020.
484. Mindray. SARS-CoV-2 IgG (CLIA). Available at: [http://www.fremm.es/portal/UserFiles/file/CORREOS %20ELECTRONICOS/2020/LABORATORIO %20FLORENCIANO %20SARS-CoV-2 %20IgG %20\(CLIA\).pdf](http://www.fremm.es/portal/UserFiles/file/CORREOS%20ELECTRONICOS/2020/LABORATORIO%20FLORENCIANO%20SARS-CoV-2%20IgG%20(CLIA).pdf). Accessed September 20, 2020.
485. Padoan A. et al, Analytical and diagnostic performances of a high-throughput immunoassay for SARS-CoV-2 IgM and IgG. <https://doi.org/10.1101/2020.11.20.20235267>.
486. Kowitdamrong, E., Puthanakit, T., Jantarabenjakul, W., Prompetchara, E., Suchartlikitwong, P., Puthcharoen, O., Hirankarn, N., Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019, *PLoS One*. 15 (2020) e0240502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240502>.
487. Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., Altman, D. R., Bailey, M. J., Mansour, M., McMahon, M., Meade, P., Mendu, D. R., Muellers, K., Stadlbauer, D., Stone, K., Strohmeier, S., Simon, V., Aberg, J., Reich, D. L., Krammer, F., Cordon-Cardo, C., Robust neutralizing antibodies to SARSCoV-2 infection persist for months, *Science* (2020) (ahead of print).<https://doi.org/10.1126/science.abd7728>.

488. Ramasamy, M. N., Minassian, A. M., Ewer, K. J. et al. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a primeboost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 2020; 396: 1979–93.
489. Voysey, M, Clemens, S. A. C., Madhi, S. A. et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021; 397: 99–111.
490. Levi, M., Thachil, J., Iba, T. et al. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* 2020 May 11;7(6):e438-40.
491. American Society of Hematology. ASH guidelines on use of anticoagulation in patients with COVID-19. 2020 [internet publication].
492. Demelo-Rodríguez, P., Cervilla-Muñoz, E., Ordieres-Ortega, L. et al. Incidence of asymptomatic deep vein thrombosis in patients with COVID-19 pneumonia and elevated D-dimer levels. *Thromb Res.* 2020 May 13;192:23-6.
493. Wichmann, D., Sperhake, J. P., Lütgehetmann, M. et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2020 May 6 [Epub ahead of print].
494. Wang, T., Chen, R., Liu, C. et al. Attention should be paid to venous thromboembolism prophylaxis in the management of COVID-19. *Lancet Haematol.* 2020 May;7(5):e362-3.
495. Zhang, Y., Xiao, M., Zhang, S. et al. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19. *Nº Engl J Med.* 2020 Apr 23;382(17):e38.] [Bowles L, Platton S, Yartey N, et al. Lupus anticoagulant and abnormal coagulation tests in patients with Covid-19. *Nº Engl J Med.* 2020 Jul 16;383(3):288-90.
496. Galeano-Valle, F., Oblitas, C. M., Ferreiro-Mazón. M. M. et al. Antiphospholipid antibodies are not elevated in patients with severe COVID-19 pneumonia and venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2020 Aug;192:113-5.
497. Xiao, M., Zhang, Y., Zhang, S. et al. Brief report: anti-phospholipid antibodies in critically ill patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Arthritis Rheumatol.* 2020 Jun 30 [Epub ahead of print].
498. Reyes Gil, M., Barouqa, M., Szymanski, J. et al. Assessment of lupus anticoagulant positivity in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Netw Open.* 2020 Aug 3;3(8):e2017539.
499. Regulatory Focus. COVID-19 Vaccine Tracker [https:// www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2020/3/ COVID -19-vaccine-tracker](https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2020/3/COVID-19-vaccine-tracker) (2021).

500. Logunov, D. Y. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet* Volume 397, Issue 10275, 20–26 February 2021, Pages 671–681.
501. Pagotto, V. et al. Active surveillance of the sputnik V vaccine in health workers. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.03.21251071>; this version posted February 5, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in It is made available under a CC-BY-NC-ND 4.0 International license.
502. Montalti, M. et al. ROCCA study protocol and interim analysis on safety of Sputnik V vaccine (Gam-COVIDVac) in the Republic of San Marino: an observational study using active surveillance. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.03.21256509>; this version posted May 5, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a CC-BY-NC-ND 4.0 International license.
503. doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01813-2>.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ ФЕРМЕНТА-КАТАЛИЗАТОРА

(по приведенным инструкциям в наборах «Шэньчжэнь Миндрей Био-медикал Электроникс Ко., Лтд.», имеющих РУ на территории РФ)

Качественный вариант на примере исследования SARS-CoV-2 IgM

Анализ SARS-CoV-2 IgM серии CL представляет собой двухэтапный анализ для качественного выявления антител IgM к SARS-CoV-2.

На первом этапе в реакционный сосуд добавляют пробу, раствор для обработки пробы и парамагнитные микрочастицы, покрытые антигенами SARS-CoV-2. Во время инкубации антитела IgM к SARS-CoV-2 в пробе начинают связываться с микрочастицами, покрытыми антигенами SARS-CoV-2, затем парамагнитные частицы захватываются магнитным полем, а не связавшиеся компоненты реакционной смеси удаляются путем промывки в модуле магнитной сепарации.

На втором этапе в реакционную кювету добавляют раствор разбавителя и моноклональное антитело против иммуноглобулина (IgM) человека, меченное щелочной фосфатазой (ALP). После инкубации моноклональное антитело против IgM человека, меченное щелочной фосфатазой, образует сэндвич-структуру с микрочастицами и захваченными антителами IgM к SARS-CoV-2, затем микрочастицы захватываются магнитным полем, а другие несвязанные вещества удаляются путем промывки в дисперсионной посуде. Далее в реакционную кювету добавляют раствор субстрата, который катализируется щелочной фосфатазой. Результатом химической реакции является хемилюминесценция. Результирующая хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (RLU) с помощью фотоумножителя, встроенного в прибор.

Существует прямо пропорциональная связь между количеством антител IgM к SARS-CoV-2 в пробе и RLU, генерируемом в ходе реакции. Наличие или отсутствие аналитов в пробе определяется путем сравнения хемилюминесцентного сигнала в реакции с сигналом отсечки. Cutoff-индекс (COI) рассчитывается путем деления RLU пробы на RLU Cutoff.

Количественный вариант на примере исследования SARS-CoV-2 IgG

Анализ на определение антител IgG к штамму SARS-CoV-2 коронавируса представляет собой двухэтапный анализ для количественного выявления антител IgG к SARS-CoV-2.

На первом этапе в реакционную кювету добавляют раствор разбавителя и моноклональное антитело против иммуноглобулина (IgG) человека, меченное щелочной фосфатазой (ALP). После инкубации моноклональное антитело против IgG человека, меченное щелочной фосфатазой, будет образовывать сэндвич-структуру с микрочастицами, захваченными антителами IgG к SARS-CoV-2. Затем микрочастицы захватываются магнитным полем, а другие несвязанные вещества удаляются путем промывки в модуле магнитной сепарации. Далее раствор субстрата добавляют в реакционный сосуд. Субстрат катализируется щелочной фосфатазой, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека в иммунном комплексе, удерживаемом на микрочастицах с испусканием света. Результирующая хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (RLU) с помощью фотоумножителя в приборе.

На втором этапе в реакционную кювету добавляют раствор разбавителя и моноклональное антитело против иммуноглобулина (IgG) человека, меченное щелочной фосфатазой (ALP). После инкубации моноклональное антитело против IgG человека, меченное щелочной фосфатазой, будет образовывать сэндвич-структуру с микрочастицами, захваченными антителами IgG к SARS-CoV-2. Затем микрочастицы захватываются магнитным полем, а другие несвязанные вещества удаляются путем промывки в модуле магнитной сепарации. Далее раствор субстрата добавляют в реакционный сосуд. Субстрат катализируется щелочной фосфатазой, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека в иммунном комплексе, удерживаемом на микрочастицах с испусканием света. Результирующая хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (RLU) с помощью фотоумножителя в приборе.

Количество антител IgG к SARS-CoV-2, присутствующих в пробе, прямо пропорционально относительным световым единицам (RLU), генерируемым во время реакции. Результаты анализа на антитела IgG к SARS-CoV-2 определяют с помощью калибровочной кривой, которая устанавливается на закодированной основной калибровочной кривой и двух уровнях калибраторов продукта.

Образцы с результатами $< 10,00$ ед./мл считаются отрицательными на антитела IgG к SARS-CoV-2. Отрицательный результат не может исключить COVID-19.

Образцы с результатами $\geq 10,00$ ед./мл считаются положительными на антитела IgG к SARS-CoV-2, что указывает на предыдущую или текущую инфекцию. Следует учесть, что положительные результаты теста нуждаются в дальнейшем подтверждении.

Использование ROC-графика (графика зависимости чувствительности от частоты ложноположительных заключений) предоставляет статистический анализ

для определения результатов, создает в текущих условиях тестирования и использования данной партии реагента значение положительной реакции RLU (значение Cutoff RLU). Именно полученное таким образом значение Cutoff RLU эффективно для данной партии реагента в течение срока действия калибровки.

Статистический анализ проводят с помощью статистического программного обеспечения GraphPad Prism. Для анализа клинической чувствительности и клинической специфичности результатов измерения образцов с отрицательной реакцией и образцов с положительной реакцией используют ROC-график, выбирая соответствующую оптимальной чувствительности и специфичности RLU в качестве Cutoff RLU.

После определения Cutoff RLU устанавливается соответствующая данному значению Cutoff RLU величина концентрации образца – 10 ед/мл, являющаяся показателем положительной реакции величины концентрации образца (значение Cutoff).

Технические ресурсы для выполнения ИХЛА/CLIA

«Анализаторы автоматические иммунохемилюминесцентные для диагностики *in vitro* серии CL с принадлежностями, в различных вариантах исполнения: CL-1000i, CL-1200i, CL-2000i» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2020/10238 от 4 мая 2020 года) и «Анализатор автоматический иммунохемилюминесцентный CL-6000i для диагностики *in vitro*» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2020/11923 от 10 сентября 2020 года) предназначены для обнаружения аналитов в сыворотке крови, плазме и других жидкостях организма человека методом иммунохемилюминесцентного анализа.

Анализаторы выполняют измерения с использованием сэндвич- и конкурентного методов иммунологического анализа, применяемых для измерения макромолекулярных комплексов. Конкурентный метод обычно используется для измерения малых молекулярных комплексов.

Сэндвич-метод

Многослойный метод включает методы иммунодиффузии двойных антител и антигенов. Например, двухфазный метод двойных антител применяется для анализа поливалентных антигенов более чем с двумя антигенными детерминантами.

Принцип метода: специфические антитела, сорбированные на твердую фазу, ковалентно связываются с антигеном из образца. Затем проба инкубируется. После инкубации с помощью промывочного буфера из реакционной смеси удаляются интерферирующие аналиты, не связавшиеся с антителами на твердой фазе. После промывки в реакционную смесь добавляют моноклональные антитела, конъюгированные с ферментной меткой, которые специфически связываются с иммунным комплексом на твердой фазе. Затем твердо-жидкая фаза отделяется и промывается. На последнем этапе анализа для запуска химической реакции и оптического измерения добавляется люминесцентная базовая жидкость.

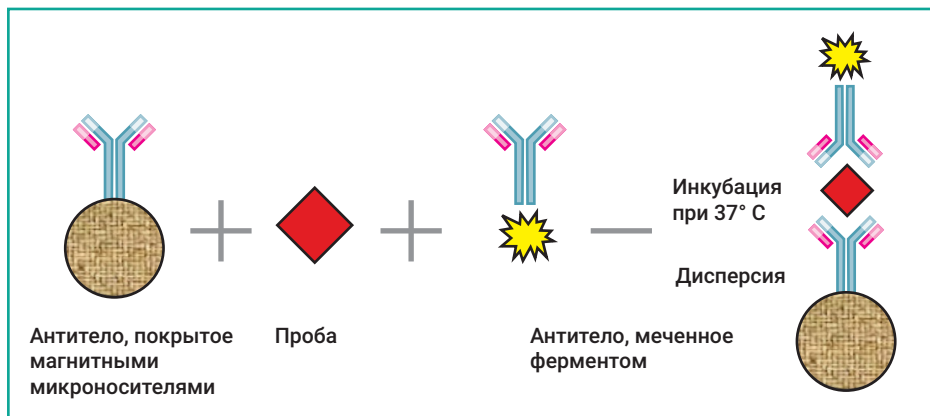


Рисунок А.1. Сэндвич-метод

Конкурентный метод

Конкурентный метод используется для количественного измерения антигенов и гаптоенов, а также для измерения антител. Конкурентный метод применяется для измерения малых молекулярных комплексов. Например, для измерения антигенов сначала специфическое антитело иммобилизуется на твердой фазе. Затем одновременно добавляются проба, содержащая исследуемый антиген, и меченый антиген. Смесь подвергается инкубации для конкурентного связывания исследуемого антигена и меченого антигена на твердой фазе. Далее смесь промывается, чтобы удалить непрореагировавший антиген и меченый антиген. После чего добавляется люминесцентная базовая жидкость для инициализации химической реакции и последующего измерения интенсивности свечения.

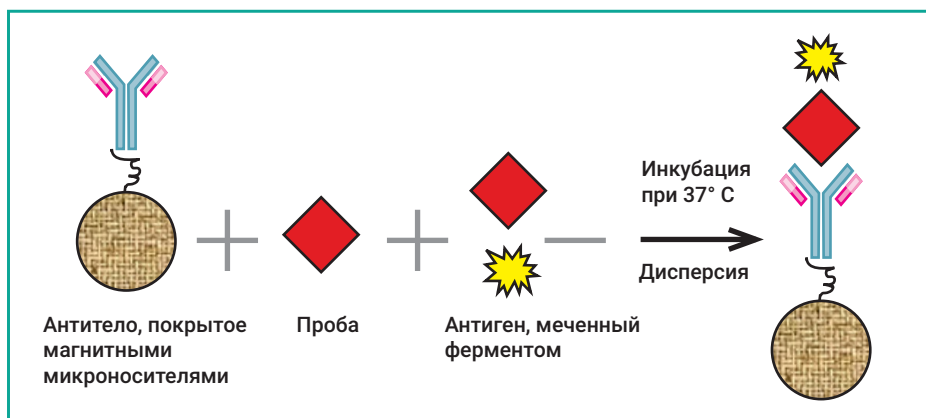


Рисунок А.2. Конкурентный метод измерения

Принцип анализа

Анализатор выполняет измерения главным образом с помощью однофазного и двухфазного методов. Основное различие заключается в стадиях, необходимых для измерения. Однофазный метод включает однократную инкубацию и однократную магнитную сепарацию и отмывку, тогда как двухфазный метод включает двукратную инкубацию и однократную или двукратную магнитную сепарацию и отмывку.

Одностадийный метод

Одностадийный метод проходит следующие стадии: добавление пробы, добавление меченого антитела (антигена), инкубация и реакция, магнитная сепарация и отмывка, добавление субстрата и оптическое измерение. В принципе, конкурентный метод относится к категории одностадийных, хотя некоторые методы иммунного анализа двойных антител также принадлежат к одностадийным методам.

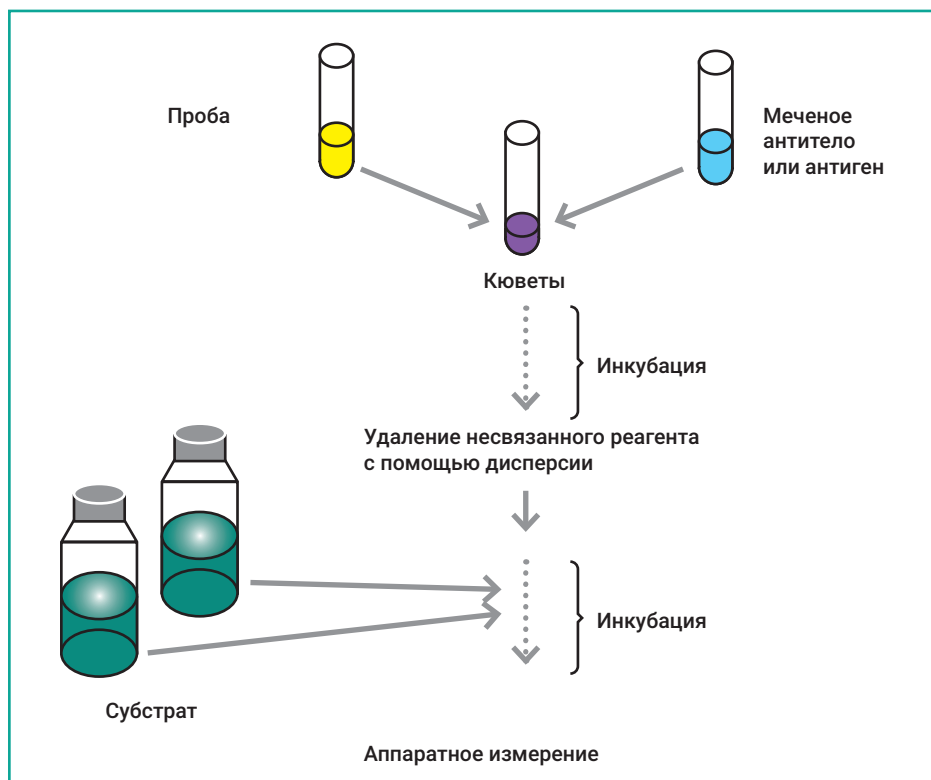


Рисунок А.3. Схема исследования одностадийного метода

Двухстадийный метод

Двухстадийный метод может включать один или два этапа магнитной сепарации и отмывки. Сэндвич-метод в общем случае принадлежит к категории двухстадийных методов.

Двухстадийный метод с одним этапом магнитной сепарации и отмывки проходит следующие стадии: добавление пробы, инкубация, в результате которой исследуемый анализ из пробы ковалентно связывается с антигеном (антителом) на твердой фазе, магнитная сепарация и отмывка, добавление меченого ферментом антитела (антигена), инкубация, добавление субстрата и оптическое измерение.

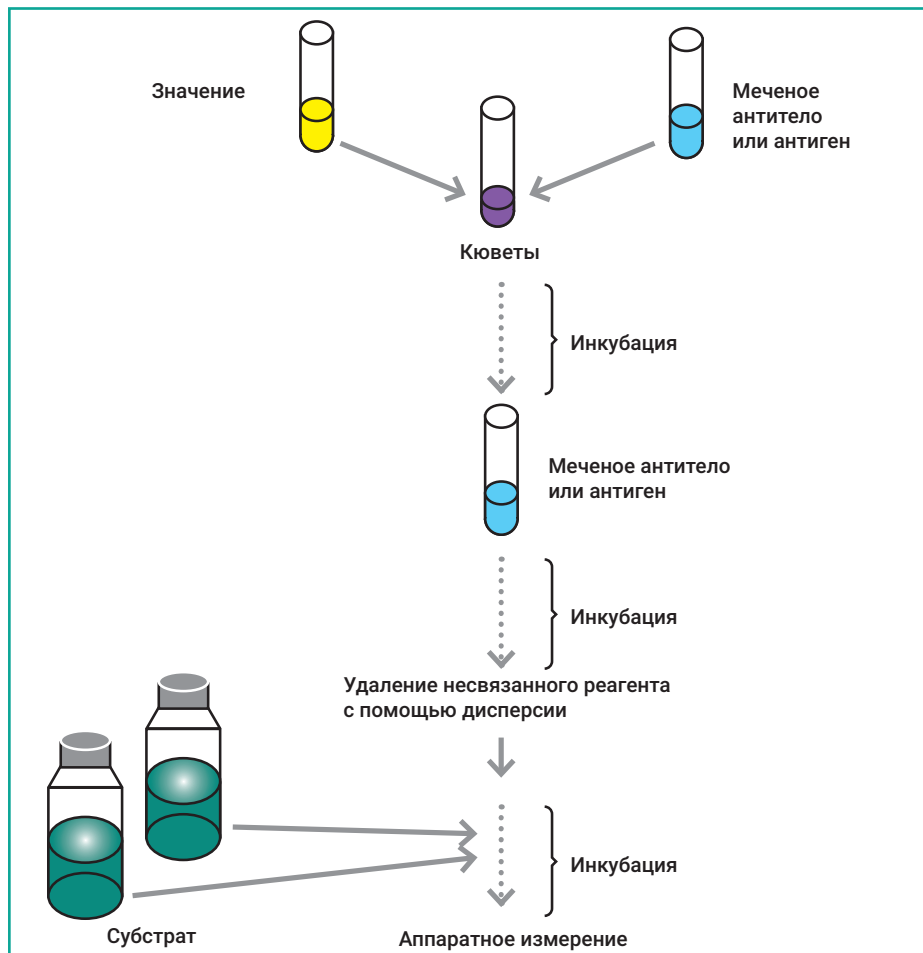


Рисунок А.4. Схема двухстадийного метода с одним этапом магнитной сепарации и отмывки

Двухстадийный метод с двумя этапами магнитной сепарации и отмывки проходит следующие стадии: добавление пробы, инкубация, в результате которой исследуемый анализ из пробы ковалентно связывается с антигеном (антителом) на твердой фазе, магнитная сепарация и отмывка, добавление меченого антитела (антигена), инкубация, магнитная сепарация и отмывка, добавление субстрата и оптическое измерение.

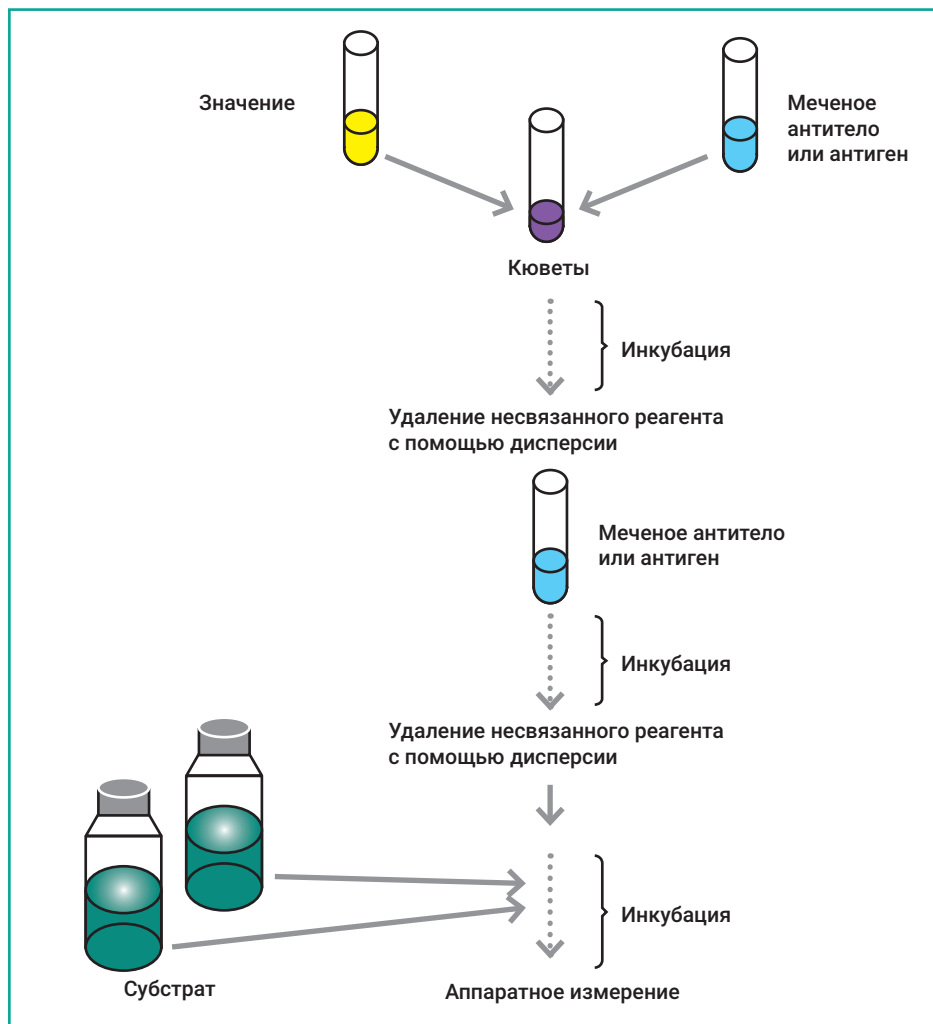


Рисунок А.5. Схема двухстадийного метода с двумя этапами магнитной сепарации и отмывки

Расчеты для вариантов ИХЛА/СLIA

В анализаторе предусмотрены две математические модели калибровки: количественная и качественная.

Количественная (4PLC): анализатор выполняет калибровку по 1–3 точкам и настройку эталонной калибровочной кривой для получения результатов калибровки; в соответствии с результатами калибровки ОСЕ пробы преобразуется в величину концентрации.

Расчет для количественного анализа (количественная модель калибровки и расчеты)

Анализатор выполняет калибровку по 1–3 точкам и настройку эталонной калибровочной кривой для получения результатов калибровки.

Эталонная калибровочная кривая формируется отдельно для каждой партии реагента и строится по формуле калибровки в форме 4PLC (логическая кривая с 4 параметрами), где CPS – число фотонов и С – концентрация.

Метод включает 4 параметра: P1, P2, P3 и P4.

Разные уровни концентрации калибратора и CPS для нескольких анализаторов выстраиваются по нелинейному регрессионному алгоритму, определяя параметры для формулы калибровки 4PLC, формируя эталонную калибровочную кривую в комплекте калибратора.

Настройка эталонной калибровочной кривой: выполнение калибровки только по 1–3 точкам и использование алгоритма адаптации, указанного для каждого химанализа, с целью адаптации параметров эталонной калибровочной кривой 4PLC и получения адаптированных результатов калибровки.

Качественная (COI): анализатор выполняет калибровку по 1–2 точкам и преобразует число относительных световых единиц калибратора в пороговое значение по заранее заданной формуле; результат интерпретируется как положительный или отрицательный путем сравнения числа ОСЕ пробы с пороговым значением.

Качественный анализ по одной точке: пороговое значение определяется на основе ОСЕ калибратора в одной точке; результат интерпретируется как положительный или отрицательный путем сравнения числа ОСЕ пробы с пороговым значением.

Сигнал калибратора в одной точке (Cal CPS) преобразуется в пороговое значение по следующей формуле:

Пороговое значение = $a \cdot \text{Cal CPS} + b$,

где a и b – параметры, указанные для разных химических анализов.

Качественный анализ по двум точкам: пороговое значение определяется на основе ОСЕ калибратора в двух точках; результат интерпретируется как положительный или отрицательный путем сравнения числа ОСЕ пробы с пороговым значением.

Сигналы калибратора в двух точках (Cal1 CPS и Cal2 CPS) преобразуются в пороговое значение по следующей формуле:

Пороговое значение = $a \cdot \text{Cal1 CPS} + b \cdot \text{Cal2 CPS} + c$,

где a, b и c – параметры, указанные для разных химических анализов.

Приложение 2.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ (ИХЛА/CLIA) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К SARS-COV-2

В масштабах популяции [471] и в условиях с высоким уровнем распространенности COVID-19 [472, 473, 474, 475] проведено исследование эффективности трех автоматизированных серологических тест-систем: Mindray CL-900i anti-SARS-CoV-2 IgG («Шэньчжэнь Миндрей Био-медикал Электроникс Ко., Лтд.») [476], BioMérieux Vidas III («БиоМерье», «Марси-л'Этуаль», Франция) [477] и Roche Elecsys® Anti SARS-CoV-2 («Роше», Швейцария) [478], – для определения антител IgG при оценке общего количества случаев инфицирования (перенесенная или текущая инфекция) SARS-CoV-2.

Тест-система Mindray CL-900i использует парамагнитные микрочастицы, покрытые рекомбинантными антигенами нуклеокапсида (N) и шиповидного белка (S) для определения анти-SARS-CoV-2-антител класса IgG [476]. Анализатор автоматически вычисляет концентрацию аналита в каждом образце сыворотки в соответствии с общей калибровочной кривой. Результаты отображаются в единицах ед/мл. Результаты тестирования оценивали в соответствии с инструкциями производителя тест-системы: положительный результат по границе значения оптической плотности $\geq 10,0$ против значения отрицательного результата $< 10,0$ [476, 479].

Тест-система BioMérieux Vidas III использует двухэтапный сэндвич-вариант фермент-связанного флуоресцентного анализа на анализаторе VIDASIII® для обнаружения анти-SARS-CoV-2-антител класса IgG [477]. Антитела IgG в образце сыворотки связываются с S1 субдоменом рекомбинантного шиповидного белка (содержащим рецептор-связывающий домен S1-RBD) вируса SARS-CoV-2, нанесенного на твердую фазу. Затем добавляются антитела против человеческого IgG, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Интенсивность флуоресценции, производимая субстратом, измеряется при длине волны в 450 нм. Интенсивность

сигнала пропорциональна уровню IgG антител. Граница значения оптической плотности вычислялась в соответствии с инструкциями производителя тест-системы [477, 480]. Отношение между относительной величиной флуоресценции (ОВФ), измеренной в образцах, и относительной величиной флуоресценции, полученной от калибратора, интерпретировалось как положительное, если величина значения составляла $\geq 1,0$ [477, 480].

Тест-система Roche Elecsys применялась в качестве эталона, использует рекомбинантный протеин – антиген нуклеокапсида (N) для определения IgG антител против SARS-CoV-2 [478]. Результаты тестирования Anti-SARS-CoV-2 оценивали согласно инструкциям производителя тест-системы: положительный результат по границе значения оптической плотности $\geq 1,0$ против отрицательного результата $< 1,0$ [478, 480].

Была установлена серопревалентность SARS-CoV-2:

- при использовании тест-системы CL-900i на уровне 42,9 % (169/394; 95 % ДИ 38,1-47,8 %);
- при использовании тест-системы Vidas III на уровне 40,6 % (160/394; 95 % ДИ 35,9-45,5 %);
- при использовании тест-системы Elecsys на уровне 42,4 % (167/394; 95 % ДИ 37,6-47,3 %).

При этом серопревалентность для всех образцов в исследовании составила 46,5 % (183/394; 95 % ДИ 41,6-51,4 %).

Ограничения:

1. все 3 тест-системы пропустили ≥ 69 % случаев участников исследования с положительными результатами ОТ-ПЦР на момент сбора образцов из-за недавнего заражения, поскольку между заражением и выработкой антител существует задержка в 1–4 недели [481, 482]. С учетом того, что исследование проводилось в популяции с прогрессирующей вспышкой заболеваемости, серологическое тестирование оказалось менее эффективным для оценки уровня распространения инфекции. По всей видимости, низкая чувствительность обусловлена высокой специфичностью теста в целях предупреждения ложноположительных результатов;
2. каждая тест-система пропускала участников с положительным результатом в ОТ-ПЦР. Несмотря на превосходное совпадение результатов в общем, около 10 % из всех исследуемых образцов демонстрировали несогласованные результаты между тремя тест-системами при обнаружении антител, что частично объясняется различиями в их чувствительности при диагностике свежих случаев инфицирования. В данном исследовании у большей части участников с противоречивыми результатами (74,3 %) были отрицательные результаты ПЦР-анализа в момент сбора образцов, поэтому мала вероятность, что они перенесли инфекцию недавно. Предел, до которого ложноположительные результаты объясняют некоторые из противоречивых результатов,

неизвестен, хотя три производителя сообщили о фактически превосходной специфичности для каждой из этих тест-систем [478, 477, 483,484];

3. в ходе серологического исследования как минимум 20 % от общего числа случаев инфекции оставались невыявленными. Эта проблема решилась оценкой результатов ОТ-ПЦР и данных серологических анализов. Использование только серологических анализов менее эффективно, особенно в условиях быстрого изменяющейся эпидемической ситуации.

Следует учесть, что в данном исследовании эффективность (чувствительность и специфичность) каждой из этих 3 тест-систем для определения антител сравнивалась между ними и с ОТ-ПЦР, а не с нейтрализующими тестами, принятыми за золотой стандарт при определении серопозитивности. Ранее сообщалось, что специфичность тест-системы Elecsys – 99,98 %, а чувствительность – 98,80 % на 14-й день после установки диагноза по результатам ПЦР-теста [478], причем позже валидационное исследование, проводимое Министерством здравоохранения Англии, сообщило о ее других показателях: специфичности – 100 % и чувствительности – 83,9 % [483]. Для тест-системы CL-900i специфичность и чувствительность сообщались как 94,9 % и 82,2 % соответственно [484], для тест-системы Vidas III – 99,9 % и 88,6 % соответственно [477].

Выявленные ограничения диктуют необходимость интерпретации результатов серологических анализов совместно с результатами ОТ-ПЦР.

В другом исследовании [485] проводилась оценка аналитических и клинических характеристик высокопроизводительной иммунохемилюминесцентной тест-системы Mindray CL-1200i («Шэньчжэнь Миндрей Био-медикал Электроникс Ко.», Шэньчжэнь, Китай; дистрибьютор в Италии компания Medical System, Генуя, Италия), предназначенной для определения антител классов IgM/IgG вируса SARS-CoV-2, распознающих полноцепочечный рекомбинантный белок нуклеокапсида № и рецептор-связывающий домен шиповидного белка S. Данная аналитическая система отличается высокой пропускной способностью (до 180 тестов/час), первые результаты можно получить уже через 25 минут. Производителем заявлено, что вычисленная клиническая чувствительность для IgM и IgG антител составляет 89,66 % и 100 % соответственно, в то время как специфичность для IgM и IgG – 93,32 % и 94,92 % соответственно.

В ходе этого исследования также показано, что эти серологические тесты не совсем пригодны для ранней диагностики COVID-19, т. к. специфические антитела начинают обнаруживаться через 9–12 дней после начала симптомов. При этом нельзя забывать, что сероконверсия наступает значительно быстрее у пациентов со средней/тяжелой степенью тяжести течения COVID-19, чем у пациентов с умеренной симптоматикой [486]. Кроме того, процент пациентов, имеющих обнаруживаемый уровень специфичных антител и стабильности гуморального иммунного ответа, с течением времени может зависеть от целевого антигена. Определяемые антитела к трехмерному шиповидному белку S (рецептор-связывающему домену RBD) и к нуклеокапсидному белку № вируса обеспечивают

более длительное обнаружение специфических антител, что хорошо соотносится с длительностью присутствия нейтрализующих антител (до 148 дней после начала симптома, с диапазоном от 113 до 186 дней) [487].

В итоге, тест-системы Mindray CL-1200i для определения антител классов IgM и IgG к SARS-CoV-2 показали превосходные результаты оценки точности и линейности, сравнимые с теми, что были заявлены производителем в инструкции. Клиническая эффективность по результатам оценки чувствительности также была весьма высокой, особенно через 12 дней после начала симптомов. Ограниченное наличие числа ложноположительных результатов не позволило достичь 100 % специфичности.

Приложение 3.

РОССИЙСКИЕ АВТОРИЗОВАННЫЕ / ОДОБРЕННЫЕ ВАКЦИНЫ

| №/№ | Название вакцины | Тип вакцины | Основной разработчик |
|-----|------------------|---|---|
| 1 | «Спутник V» | <p>Рекомбинантная аденовирусная вакцина (векторная: rAd26 и rAd5):</p> <ul style="list-style-type: none"> • компонент 1, действующее вещество: рекомбинантные аденовирусные частицы 26-го серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2; • компонент 2, действующее вещество: рекомбинантные аденовирусные частицы 5-го серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2; • вызывает выработку защитных антител к S-белку | <p>Научно-исследовательский институт имени Гамалеи,</p> <p>контрактные исследования и разработки лекарственных средств Acellena</p> |

| №/№ | Название вакцины | Тип вакцины | Основной разработчик |
|-----|------------------|---|--|
| 2 | Sputnik Light | <p>Рекомбинантная аденовирусная вакцина (векторная: rAd26):</p> <ul style="list-style-type: none"> • компонент 1, действующее вещество: рекомбинантные аденовирусные частицы 26-го серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2; • вызывает выработку защитных антител к S-белку | <p>Научно-исследовательский институт имени Гамалеи, контрактные исследования и разработки лекарственных средств Acellena</p> |
| 3 | CoviVac | <p>Коронавирусная инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная вакцина:</p> <ul style="list-style-type: none"> • действующее вещество: • очищенная концентрированная суспензия коронавируса SARS-CoV-2, штамм AYDAR-1, полученный путем репродукции в перевиваемой культуре клеток линии Vero, инактивированный бета-пропиолактоном; • вызывает выработку полноценного антигенового ответа | <p>Федеральный научный центр исследований и разработок иммунных и биопрепаратов им. Чумакова</p> |

| №/№ | Название вакцины | Тип вакцины | Основной разработчик |
|-----|------------------|--|--|
| 4 | EpiVacCorona | <p>Пептидная вакцина:</p> <ul style="list-style-type: none"> действующее вещество: пептидный антиген № 1 белка S вируса SARS-CoV-2; пептидный антиген № 2 белка S вируса SARS-CoV-2, пептидный антиген № 3 белка S вируса SARS-CoV-2; все 3 пептидных антигена белка S вируса SARS-CoV-2 химически синтезированы; в препарате отсутствуют: вирус, ДНК, РНК; вызывает выработку защитных антител к S-белку | Федеральное бюджетное научно-исследовательское учреждение «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» |

Сравнительные характеристики российских вакцин

| | «Спутник V» | «Спутник Light» | «ЭпиВак-Корона» | «КовиВак» |
|--|-------------|-----------------|-----------------|-----------|
| Количество доз | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Эффективность в предотвращении умеренных и тяжелых заболеваний | 91,6 % | 79,4 % | н/д | н/д |
| Продолжительность защиты | 2 года | н/д | 1 год | н/д |
| Возраст | 18+ | 18-60 лет | 18+ | 18-60 лет |

Методические рекомендации №35

**ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА
ПРИ COVID-19**

Корректурa: В. В. Уманская
Верстка: А. В. Усанов

Подписано в печать 15.10.2021 г.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 10,38.
Тираж 30 экз.
Заказ № 104.

Отпечатано в ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ».
115088, Москва, ул. Шарикоподшипниковская, д. 9
Тел.: 8 (495) 530-12-89
www.niioz.ru



МОСКВА
2 0 2 1