

УДК 571.27

COVID-19 в России: клинические и иммунологические особенности пациентов первой волны

Т. В. Бобик¹, Н. Н. Костин¹, Г. А. Скрябин¹, П. Н. Цабай¹, М. А. Симонова¹, В. Д. Кнорре^{1*}, О. Н. Стратиенко², Н. Л. Алешенко², И. И. Воробьев¹, Е. Н. Хурс³, Ю. А. Мокрушина¹, И. В. Смирнов¹, А. И. Алехин², А. Э. Никитин², А. Г. Габиров¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: vera.knorre@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2020

Принята к печати 16.02.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11374

РЕФЕРАТ Пандемия, вызванная распространением SARS-CoV-2, стала причиной более 2 млн летальных исходов, поразила более 100 млн человек на всех континентах. Россия не стала исключением, и отечественное здравоохранение мобилизовало значительные ресурсы для борьбы с инфекцией. В работе проанализированы результаты функционального анализа 155 пациентов Московского региона, проходивших обследование в Центральной клинической больнице Российской академии наук в период первой волны пандемии (февраль–июль 2020 года). Критерием включения стал положительный ПЦР-тест и наличие типичной рентгенологической картины вирусной пневмонии в виде «матового стекла» при компьютерно-томографическом исследовании. Клинический корреляционный анализ проводили по четырем группам пациентов: не находившихся на ИВЛ (1), находившихся на ИВЛ (2) и тех из них, кто впоследствии выздоровел (3) или скончался (4). Учитывали также отягощающие патологии (сахарный диабет, метаболические синдромы, гипертоническая болезнь и другие нозологии). Иммунологический статус пациентов (уровень иммуноглобулинов классов М, А, G и их подклассов, а также тотальный ответ иммуноглобулинов) определяли с использованием оригинального набора для ИФА, включающего в качестве антигенов фрагменты RBD-SD1 и NTD S-белка, а также N-белок, полученные в прокариотической системе из клеток *Escherichia coli*. В качестве антигена, представляющего конформационные эпитопы RBD, использовали рекомбинантный RBD (RBD CHO), полученный в эукариотической системе из клеток CHO. Установлено, что уровень иммуноглобулина А является самым ранним серологическим критерием развития инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, и обуславливает лучшие показатели чувствительности и диагностической значимости ИФА по сравнению с уровнем иммуноглобулина класса М. Показано, что скорость сероконверсии «ранних» М и А антител, специфичных к N-белку, сравнима со скоростью сероконверсии антител, специфичных к конформационным эпитопам RBD. В то же время сероконверсия иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку вируса SARS-CoV-2, значительно опережает этот показатель для антител другой специфичности. Согласно полученным данным, сильную иммуногенность RBD-фрагмента в большей степени обеспечивают конформационные эпитопы, в то время как линейные эпитопы RBD и NTD обладают наименьшей иммуногенностью. Анализ частот встречаемости SARS-CoV-2-специфичных иммуноглобулинов разных классов позволил установить необходимость одновременного определения RBD- и N-специфичных антител для увеличения чувствительности ИФА. Анализ распределения содержания подклассов иммуноглобулинов в сыворотках крови серопозитивных индивидов выявил равномерную индукцию специфичных к N-белку подклассов G1–G4 иммуноглобулина G и A1–A2 иммуноглобулина А в группах с различной степенью тяжести COVID-19. В случае S-антигенов основными подклассами антител при иммунном ответе являются G1, G3 и A1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА серологический анализ больных COVID-19, SARS-CoV-2-специфичные подклассы антител.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИФА – иммуноферментный анализ; COVID-19 – коронавирусная болезнь 2019; NTD – N-концевой домен; RBD – рецепторсвязывающий домен; RBD-SD1 – рецепторсвязывающий домен-субдомен 1; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия, официально объявленная ВОЗ 11 марта 2020 года в связи с распространением новой коронавирусной инфекции (coronavirus disease 2019, COVID-19), стала вызовом для мирового медицинского и научного сообщества. К февралю 2021 года в мире коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) заразились более 100 млн человек и более 2 млн из них скончались. Инфекция довольно быстро распространилась и в регионах России. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации на 10 февраля, в стране заболевание перенесли в общей сложности более 4 млн человек, из которых более 80000 с летальным исходом.

Новый коронавирус SARS-CoV-2, принадлежащий к роду *Betacoronavirus*, – цитопатический вирус, содержащий одноцепочечную РНК, отнесенный ко II группе патогенности. Этот вирус инфицирует клетки, несущие на своей поверхности рецепторы ангиотензинпревращающего фермента типа II (ACE2), главным образом альвеолярные пневмоциты типа II и в меньшей степени другие эпителиальные клетки [1]. Инфицирование коронавирусом SARS-CoV-2 приводит к широкому спектру проявлений – от бессимптомного течения до тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заканчивающегося смертельным исходом. Согласно статистическому анализу, примерно у 80% пациентов заболевание протекает в легкой, не требующей госпитализации форме, с клиническими признаками острого инфекционного заболевания дыхательных путей с типичными катаральными симптомами и в большинстве случаев завершается спонтанным выздоровлением. Течение заболевания обычно напоминает ОРВИ, вызванные вирусами гриппа типа А и В, риновирусами, аденовирусами, сезонными коронавирусами, однако в ряде случаев инфицирование вирусом SARS-CoV-2 может приводить к очень быстрому формированию острого воспаления с развитием тяжелой двухсторонней пневмонии, геморрагической лихорадки и дисфункции органов. Течение заболевания по драматическому сценарию сопровождается развитием тяжелой пневмонии и наблюдается у 15% больных, а у примерно 5% пациентов развивается ОРДС и полиорганная недостаточность. Частота смертельных исходов различается в разных странах и колеблется по последним данным в диапазоне 1.04–8.5% подтвержденных случаев заболевания. За последний год предпринято множество попыток найти взаимосвязь между различными факторами (такими, как пол, возраст, раса, сопутствующие заболевания, различные индикаторы и маркеры

(включая генетические) и т.д.) и тяжестью заболевания [2–8].

Однако, несмотря на большой массив данных, накопленных за это время, большинство найденных корреляций остаются противоречивыми. В большинстве публикаций генетическую предрасположенность к развитию осложнений связывают со структурными особенностями ACE2, системы презентации антигена и генов, ответственных за систему врожденного иммунитета [9].

Гуморальные реакции служили основными маркерами тяжести заболевания при других вирусных инфекциях легких, включая инфекции SARS-CoV и вируса гриппа [10–13].

Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре структурных белка – шиповидный (S-белок), нуклеокапсидный (N-белок), белок оболочки (E) и мембранный белок (M) [14]. Белки S и N являются двумя основными антигенами коронавируса, которые индуцируют выработку иммуноглобулинов [15]. Антитела к N-белку часто индуцируются в относительно более высоком количестве, чем другие белки, которые служат основной мишенью для серологической диагностики [15, 16].

Рецепторсвязывающий домен (RBD), присутствующий в области S1 белка S, является основной мишенью нейтрализующих антител (NAb), а также применяется при конструировании вакцин [17–20].

Согласно приведенным данным (статистика ВОЗ), частота летальных исходов в России (1.89%) остается одной из самых низких в мире. Этот феномен еще требует детального исследования. Безусловно, определенную роль в этом могут играть факторы, связанные с организацией здравоохранения в Российской Федерации, однако есть все основания полагать, что объяснение феномена будет связано с демографическими факторами, факторами, связанными с группами риска и маркерами тяжести воспаления. Представляло интерес подробно охарактеризовать гуморальные реакции адаптивного иммунитета когорт пациентов российской популяции в ответ на коронавирусную инфекцию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Материалы**

В работе использовали коммерческие реактивы фирм Sigma, Bio-Rad, Thermo Scientific (США), Pharmacia (Швеция), Difco (Англия), Panreac (Испания) и «Реахим» (Россия).

Получение рекомбинантных белков, фрагментов S- и N-белков вируса SARS-CoV-2

Искусственно синтезированные фрагменты ДНК, кодирующие фрагменты RBD (330–538 а.о.),

RBD-SD1 (330–590 а.о.) и NTD (17–305 а.о.) S-белка и последовательность N-белка (1–420 а.о.) вируса SARS-CoV-2, были клонированы в плазмиды pET22b с использованием эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Корректность полученных конструкций подтверждали секвенированием.

Клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированные полученными генетическими конструкциями, культивировали в среде 2YT с ампициллином при 37°C и интенсивном перемешивании до достижения $ОП_{600} = 0.4$ о.е., после чего проводили индукцию 1 mM IPTG и культивировали в течение 6 ч при 30°C. Выделение и очистку рекомбинантных белков из телец включения проводили с использованием металл-хелатной хроматографии (HisTrap FF, GE Healthcare, США) в денатурирующих условиях.

Экспрессию и очистку рекомбинантного RBD (320–537 а.о.), полученного в эукариотической системе клеток CHO, проводили по ранее описанной методике [21].

Проведение ИФА

Сорбцию очищенных рекомбинантных RBD, RBD-SD1, NTD и N-белка, полученных в прокариотической системе *E. coli*, в лунки планшета проводили в буфере, содержащем 50 mM гидрокарбоната натрия, 4 M мочевины, pH 10.6. Для детекции специфичных к SARS-CoV-2 антител в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов Nunc MaxiSorp (Nunc, США) вносили смесь антигенов RBD-SD1, NTD и N в соотношении 40/20/40 нг на лунку или каждый полученный антиген (100 нг) и инкубировали при 4°C в течение 16 ч без перемешивания. По окончании инкубации удаляли раствор из лунок, промывали их дистиллированной водой и вносили блокирующий раствор (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20, 3% БСА). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре без перемешивания. По окончании инкубации удаляли блокирующий раствор, высушивали досуха при комнатной температуре и хранили при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

В опытах с биологическими образцами сыворотки разводили в соотношении 1 : 100 (для анализа суммарных иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку) или 1 : 10 (во всех остальных случаях) в промывочном растворе (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20), вносили в лунку и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин). Планшеты промывали 5 раз промывочным раствором, добавляли антитела к соответствующим классам и подклассам антител человека в растворе для разведения конъюгатов (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20,

0.1% БСА) и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин) [22]. После пятикратной промывки планшетов промывочным раствором добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в растворе для разведения конъюгатов и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин). После промывки планшетов промывочным раствором (5 раз) добавляли субстрат ТМБ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Реакцию останавливали 10% раствором фосфорной кислоты, измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Для корректной интерпретации результатов ИФА рассчитывали пороговое значение ОПкрит на основании значений ОП используемой панели сывороток здоровых доноров (ОП-ср), используя среднее значение оптической плотности в данных лунках по формуле:

$$\text{ОПкрит} = \text{ОП-ср} + 3 \times \text{стандартных отклонения.}$$

На основании полученного значения ОПкрит рассчитывали индекс позитивности для каждого исследуемого образца по формуле:

$$\text{ИПобр} = \text{ОПобр} / \text{ОПкрит.}$$

При ИПобр ≥ 1 образец сыворотки крови считали положительным (образец содержит антитела, специфичные к коронавирусу SARS-CoV-2), при ИПобр < 0.9 образец сыворотки крови считали отрицательным.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование базируется на клиническом материале, собранном в Центральной клинической больнице Российской академии наук в период апрель–май 2020 года. В общей сложности обследовано 155 пациентов с диагнозом COVID-19. Критериями включения в группу COVID-19-позитивных пациентов считали положительный ПЦР-тест и поражение легких по характеру «матового стекла», диагностированное на КТ. Нами проведен поиск статистически значимых отличий между течением заболевания в группах пациентов с различными половозрастными характеристиками, отличающихся наличием или отсутствием сопутствующих заболеваний. В качестве признака, опосредовано отражающего тяжесть протекания заболевания, использовали количество дней, проведенных в стационаре.

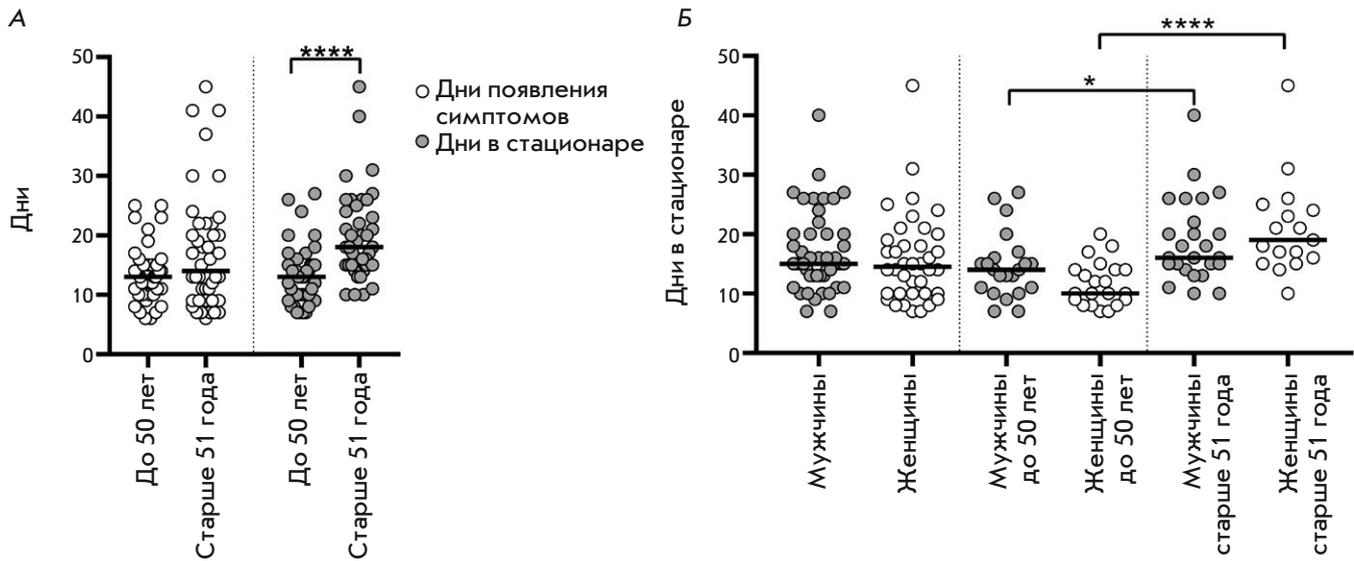


Рис. 1. Распределение количества дней, прошедших после появления симптомов, к моменту госпитализации (А), и дней, проведенных в стационаре (А, Б), среди пациентов различных возрастных групп

Анализ (рис. 1А) с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни показал, что количество дней, прошедших после появления симптомов до госпитализации, не отличается среди пациентов двух возрастных групп, также не выявлено корреляции между количеством дней и возрастом пациентов внутри двух возрастных групп. В то же время длительность госпитализации была выше в группе старше 51 года ($p < 0.0001$), что свидетельствует о более тяжелом течении болезни у пациентов старшего возраста. Анализ влияния пола на длительность госпитализации пациентов двух возрастных групп (рис. 1Б) выявил слабые различия между группами мужчин до 50 лет и после 51 года ($p = 0.0177$). Выявлено существенное различие ($p < 0.0001$) в длительности пребывания в стационаре женщин до 50 лет и старше 51 года. Не выявлено статистически значимых отличий в длительности госпитализации пациентов разного пола внутри двух возрастных групп и вне зависимости от возраста. Выявленные зависимости подтверждали корреляционным анализом; величина коэффициента корреляции Спирмена (r) была статистически значимой в группе женщин – $r = 0.65$, и незначительной в группе мужчин – $r = 0.31$. Дисперсионный анализ зависимости времени госпитализации от линейной комбинации факторов возраста и пола показал, что пол не является значимым фактором ($p = 0.719$), тогда как возраст, напротив, влияет на длительность госпитализации ($p < 0.0001$), причем в группе женщин данная зависимость была значительнее, чем в группе мужчин ($p < 0.0001$ и $p = 0.0278$ соответственно). Таким образом, можно утверждать, что наблюдаемое отличие в длительности

госпитализации пациентов разных возрастных групп существенно обусловлено именно различием между женщинами более старшего (после 51 года) и более младшего (до 50 лет) возрастов.

Согласно опубликованным данным [4, 5, 23, 26], такие сопутствующие заболевания, как гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение, являются факторами риска тяжелого течения COVID-19. Мы исследовали влияние этих сопутствующих заболеваний на длительность госпитализации пациентов. Нами проведен анализ длительности пребывания в стационаре трех групп пациентов: 1) с гипертонической болезнью, сахарным диабетом или ожирением (ГСО), 2) с другими сопутствующими заболеваниями, 3) без сопутствующих заболеваний.

Результаты анализа на основе непараметрического критерия Манна–Уитни выявили значимое превышение ($p = 0.01$) длительности госпитализации пациентов группы с такими сопутствующими заболеваниями, как гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение, по сравнению с группой без сопутствующих заболеваний (рис. 2А). Однако дальнейший анализ показал, что возрастная медиана пациентов этих групп сильно различалась – 62 и 43 года соответственно. После выравнивания медианы между группами путем исключения из выборок пациентов максимального и минимального возраста соответственно, достоверного отличия в длительности госпитализации между группами не выявлено (рис. 2Б). Сравнение длительности госпитализации пациентов двух возрастных групп, имеющих ГСО, и пациентов без сопутствующих заболеваний (рис. 2В) указывает на отсутствие

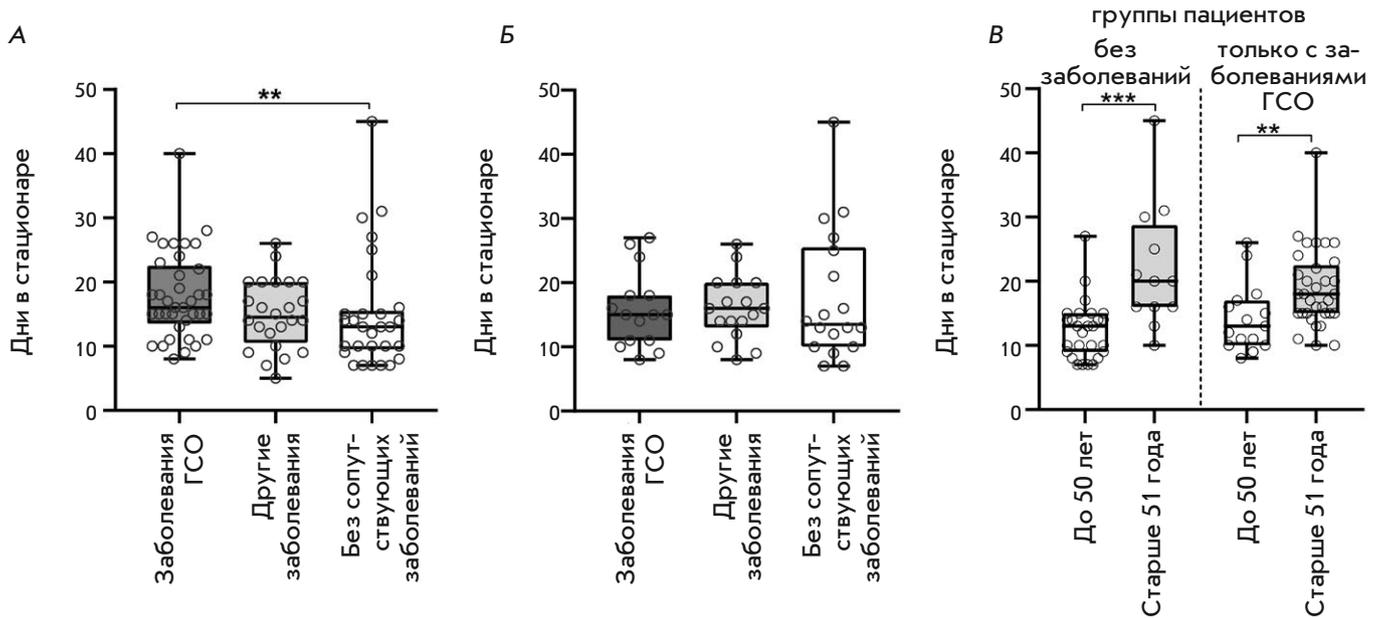


Рис. 2. Распределение количества дней, проведенных на стационарном лечении пациентами с/без сопутствующих заболеваний (А–В) и пациентов разных возрастных групп (В). А – группы пациентов без учета возраста; Б – группы пациентов с одинаковой возрастной медианой. В – сравнение средних значений длительности госпитализации пациентов возрастных групп, с/без сопутствующих заболеваний. ГСО – гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение

влияния рассматриваемых заболеваний. Влияние возраста статистически значимо как в группе пациентов, не имеющих сопутствующих заболеваний ($p = 0.0001$), так и в группе с указанными заболеваниями ($p = 0.0076$). При этом время госпитализации пациентов одинаковых возрастных групп, отличающихся наличием/отсутствием сопутствующих заболеваний, не отличалось статистически значимо. Таким образом, в исследованной когорте пациентов не обнаружено влияния сопутствующих заболеваний на тяжесть протекания COVID-19. Возможно, ранее опубликованные данные о существовании корреляции между тяжестью заболевания и наличием ряда сопутствующих заболеваний не учитывали возрастной дисбаланс в сравниваемых группах.

Для выявления различий в некоторых гематологических характеристиках в группах пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 когорту госпитализированных пациентов разделили на не нуждавшихся и нуждавшихся в ИВЛ. Результаты клинических исследований пациентов, нуждавшихся в ИВЛ, анализировали или суммарно, или выделяя две группы в зависимости от исхода заболевания (выздоровление или летальный исход). С помощью непараметрического критерия Манна–Уитни выявлено значимое ($p < 0.0001$) увеличение количества лейкоцитов у пациентов более возрастной группы (старше 51 года) по сравнению с группой до 50 лет (рис. 3А).

Эти данные соответствуют результатам других исследований [25–27].

Повышение количества лейкоцитов выявлено также у пациентов, находившихся на ИВЛ ($p = 0.006$), что согласуется с ранее полученными данными, согласно которым лейкоцитоз ассоциирован с тяжелым течением COVID-19 и высоким риском летального исхода [25, 28, 29]. Однако не обнаружено значимых различий между количеством лейкоцитов в группах пациентов, выздоровевших после терапии ИВЛ и скончавшихся, следовательно, некорректно рассматривать увеличение уровня лейкоцитов в качестве прогностического признака, определяющего исход заболевания. Тем не менее, ряд исследователей предлагает использовать в качестве прогностического маркера тяжести заболевания лейкоцитоз в комплексе с лимфопенией, точная природа которой остается неизвестной. Лимфопения по разным данным наблюдается в 40–80% случаев COVID-19 [30–32] и в значительной степени выражена у больных в критическом состоянии [5, 33]. Однако, несмотря на множество работ, указывающих на тесную связь между лимфопенией и тяжестью заболевания, в нашей когорте не обнаружено значимых различий в содержании лимфоцитов в группах больных с разной степенью тяжести COVID-19. Многие исследователи предлагают рассматривать в качестве прогностического признака С-реактивный белок (СРБ) [3, 36], вы-

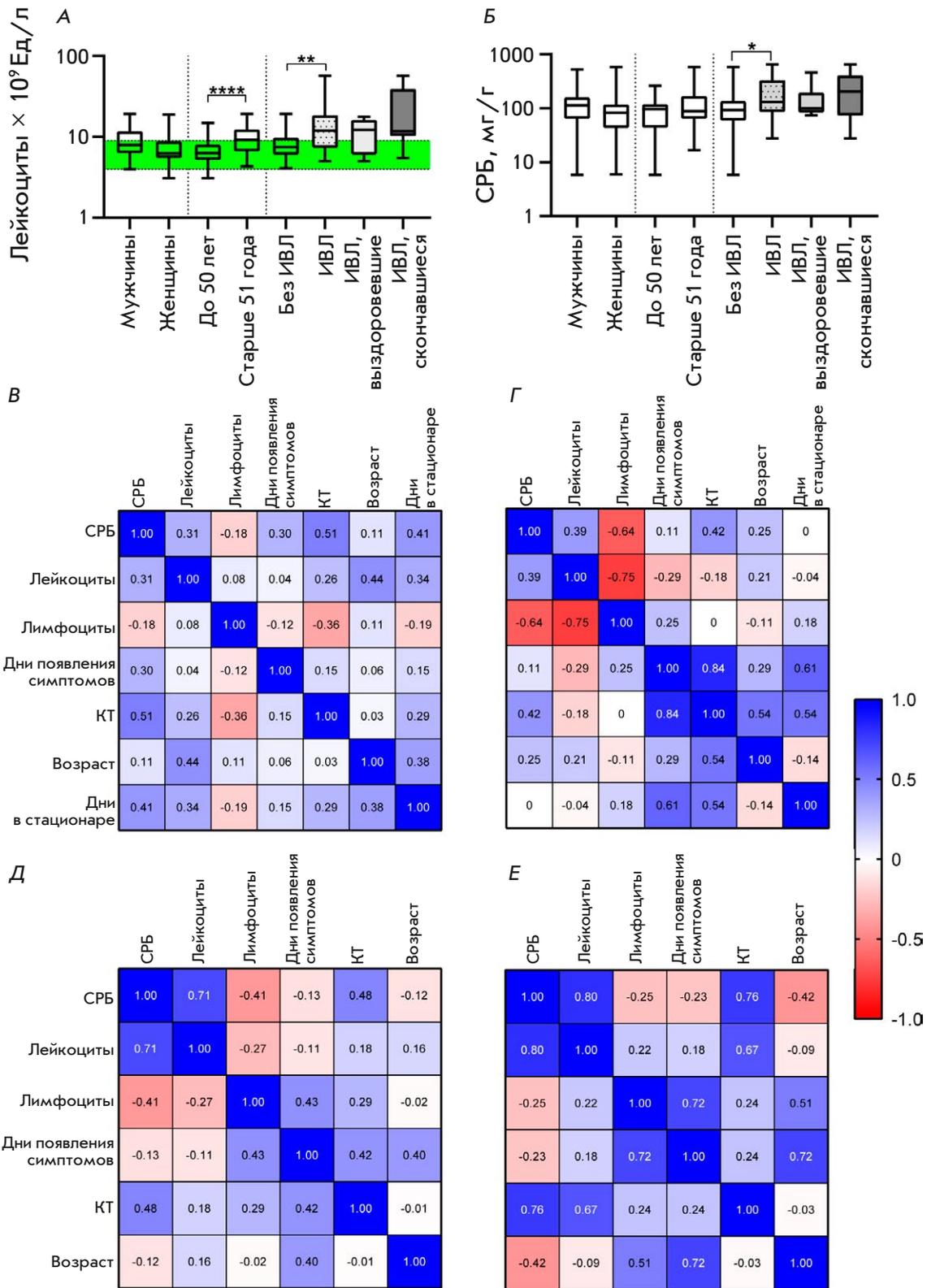


Рис. 3. Распределение количества лейкоцитов (А) и С-реактивного белка (Б) внутри групп пациентов разных возрастов, пола и течения заболевания. Зеленым отмечен коридор нормальных значений. В–Е – корреляционные зависимости для групп пациентов, не нуждавшихся в ИВЛ (В), нуждавшихся в ИВЛ ($n = 16$) (Д), с последующим выздоровлением ($n = 7$) (Г) или смертью ($n = 9$) (Е)

сокий уровень которого ассоциирован с ухудшением течения заболевания. В ряде работ [3, 5, 37] с высокой степенью значимости показано существенное увеличение содержания СРБ в крови пациентов в критическом состоянии. Однако некоторые исследователи [38] обнаруживают слабое отличие в содержании СРБ при различном сценарии течения болезни и даже отсутствие различий [39]. Среди групп исследуемой нами когорты слабое, но статистически значимое отличие ($p = 0.04$) средней концентрации СРБ обнаружено только между группами пациентов, в терапии которых использовали или не использовали ИВЛ (рис. 3Б).

Корреляционный анализ внутри четырех групп пациентов: 1 – не находившихся на ИВЛ (рис. 3В); 2 – находившихся на ИВЛ (рис. 3Д); 3 – тех из них, кто впоследствии выздоровел (рис. 3Г); или (4) скончался (рис. 3Е), выявил во всех группах корреляцию (от умеренной до сильной) между уровнем СРБ и степенью поражения легких, тяжесть которого оценивали по данным КТ. Показано, что при воспалительных заболеваниях, в том числе пневмониях разного генеза, концентрация СРБ коррелирует с уровнем воспаления и не подвержена влиянию таких факторов, как возраст, пол, физическое состояние пациента. СРБ может использоваться для диагностики COVID-19, поскольку чувствительность диагностики с использованием только результатов КТ составляет 76.4%, а СРБ может выявить воспаление на ранних стадиях пневмонии [40].

Также в группах пациентов, находящихся на ИВЛ, обнаружена значимая корреляция между количеством лейкоцитов и СБР, умеренная в случае дальнейшего выздоровления и сильная в случае летального исхода, что может свидетельствовать об интенсивном воспалительном процессе.

Возможное отражение двух принципиально разных исходов COVID-19 у тяжелых пациентов, находящихся на ИВЛ, можно наблюдать через призму корреляционных зависимостей. У выздоровевших в дальнейшем пациентов наблюдается сильная корреляция ($r = 0.84$) между количеством дней после появления симптомов и тяжестью поражения легких. Возможно, из-за ослабления раннего противовирусного иммунитета у таких больных вирус SARS-CoV-2 приобретает на время персистирующий характер и постепенно увеличивает степень поражения легочной ткани, пока из-за симптомов, связанных с повреждениями легких, больного не госпитализируют. Последующая терапия, включающая ИВЛ, помогает в конечном итоге преодолеть вирусную инфекцию.

В настоящее время активно продолжаются исследования гуморальных реакций адаптивного иммунитета при коронавирусной инфекции SARS-CoV-2,

направленные на установление связи между иммунологическими реакциями организма и разными сценариями течения заболевания, а также влияния на них различных факторов (пол, возраст, сопутствующие заболевания и др.). Противоречивость данных, полученных за последний год, делает необходимым дальнейшее их накопление и масштабный анализ. Мы сравнили качественные и количественные параметры В-клеточного иммунного ответа у различных групп пациентов с диагнозом COVID-19. Динамику иммунного ответа оценивали методом ИФА образцов сывороток крови 155 человек с подтвержденным диагнозом COVID-19, 105 из которых были госпитализированы в различные сроки после появления симптомов. В качестве антигенов использовали смесь рекомбинантных белков, фрагментов S-белка SARS-CoV-2 (RBD-SD1 и NTD) и рекомбинантный N-белок, полученные в прокариотической системе *E. coli* и адсорбированные в лунки планшета в денатурированном состоянии.

Результаты проведенного исследования (рис. 4А), выраженные в виде распределения рассчитанных индексов позитивности (ИП) образцов в зависимости от дней, прошедших после появления симптомов, выявляют различия в динамике появления антител, специфичных к использованным фрагментам вируса SARS-CoV-2, зависящие от времени после появления симптомов. Для иммуноглобулинов классов М, G и А медиана значений индекса позитивности, превышающая пороговое значение (ИП = 1), достигается к 6 дню после появления симптомов. Максимальные значения в случае иммуноглобулинов класса А определяются на 11–14 день, иммуноглобулинов класса М – к 15–20 дню, к иммуноглобулинам класса G – после 20 дня, что соответствует данным, полученным с использованием других тест-систем [8, 41]. Максимальная чувствительность ИФА-определения антител класса G с помощью разработанной нами тест-системы достигала 95.5% в диапазоне 15–20 дней после появления симптомов (рис. 4Б). В случае антител классов М и А максимальная чувствительность – 81.8 и 96.8%, наблюдалась в диапазоне 15–20 и 11–14 дней после появления симптомов соответственно и далее снижалась, оставаясь заметно выше в случае иммуноглобулинов А. Снижение чувствительности определения антител классов М и А методом ИФА может быть объяснено постепенным снижением содержания этих антител в кровотоке в более поздние сроки наблюдения [42, 43]. Наибольшая чувствительность ИФА (более 93.8%) и специфичность (98.6%) определения антител, специфичных к вирусу SARS-CoV-2, на протяжении всего исследуемого периода достигалась при суммарном определении иммуноглобули-

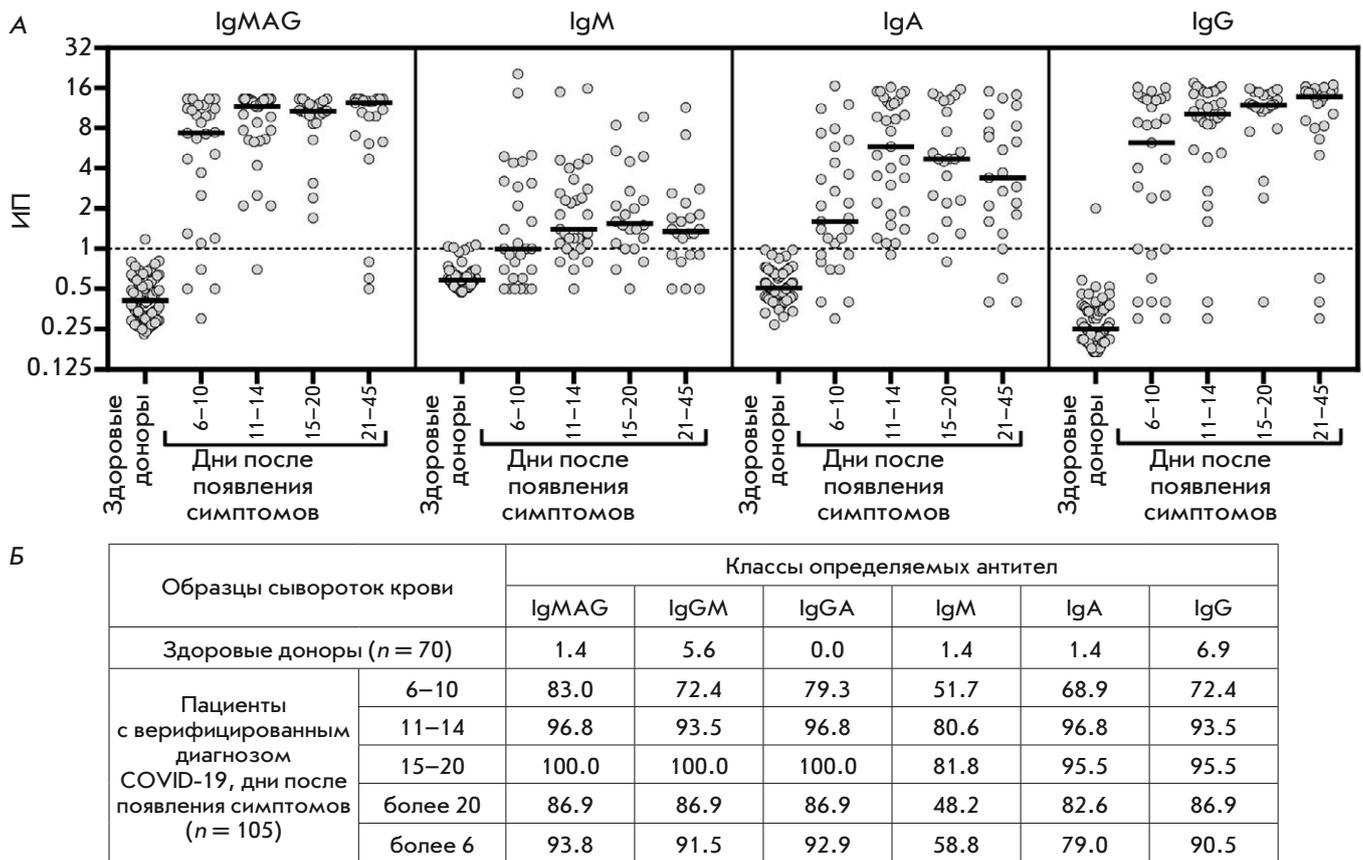


Рис. 4. Результаты серодиагностического тестирования методом ИФА образцов сывороток крови здоровых доноров и лиц с подтвержденным диагнозом COVID-19, в различные периоды после появления симптомов. **А** – индивидуальные значения индексов позитивности исследуемых образцов, рассчитанные при определении антител М, А и G, специфичных к SARS-CoV-2, по отдельности или одновременно. В качестве антигенов использовали смесь рекомбинантных белков, фрагментов RBD-SD1 и NTD S-белка SARS-CoV-2, и рекомбинантный N-белок. Индекс позитивности образца рассчитывали по отношению сигнал образца/среднее значение сигнала для образцов здоровых доноров (n = 70) + 3 стандартных отклонения. Пороговое значение (ИП = 1) отмечено пунктирной линией. **Б** – количество образцов, превышающих пороговое значение для одного или более указанных классов антител, специфичных к SARS-CoV-2, выраженное в %

нов классов М, G и А. Чувствительность определения антител классов М, А и G была несколько ниже и составила более 58,8, 79 и 90,5% соответственно. Для сравнения диагностической ценности тестов при выбранных значениях пороговых уровней применили ROC-анализ. Показатель AUC при анализе IgA составил 0,93 (95% CI: 0,90–0,96), при анализе IgM – 0,87 (95% CI: 0,83–0,92), при анализе IgG – 0,95 (95% CI: 0,93–0,98). Поскольку антитела классов М и А имеют схожую динамику появления и исчезновения в кровотоке, а абсолютные значения индексов позитивности образцов и рассчитанная чувствительность и диагностическая значимость ИФА в случае антител класса А значительно выше, чем для антител класса М, то можно утверждать, что для диагностики COVID-19 более оправдано определение иммуноглобулинов класса А.

С целью определения вклада каждого из антигенов в чувствительность ИФА в различные временные промежутки после появления симптомов мы оценивали уровень антител, специфичных к каждому из антигенов, отдельно. Анализ проводили, используя в качестве антигенов фрагменты RBD-SD1 и NTD S-белка, а также N-белок, полученные в прокариотической системе *E. coli* и адсорбированные в лунки планшета в денатурированном состоянии. Аналогичным образом полученный фрагмент RBD (RBD *E. coli*) использовали для оценки вклада SD1-специфичных иммуноглобулинов в чувствительность ИФА. В качестве антигена, представляющего конформационные эпитопы RBD, использовали рекомбинантный RBD (RBD CHO), полученный в эукариотической системе CHO. Результаты исследования (рис. 5А,В,Д) выявляют разную динамику

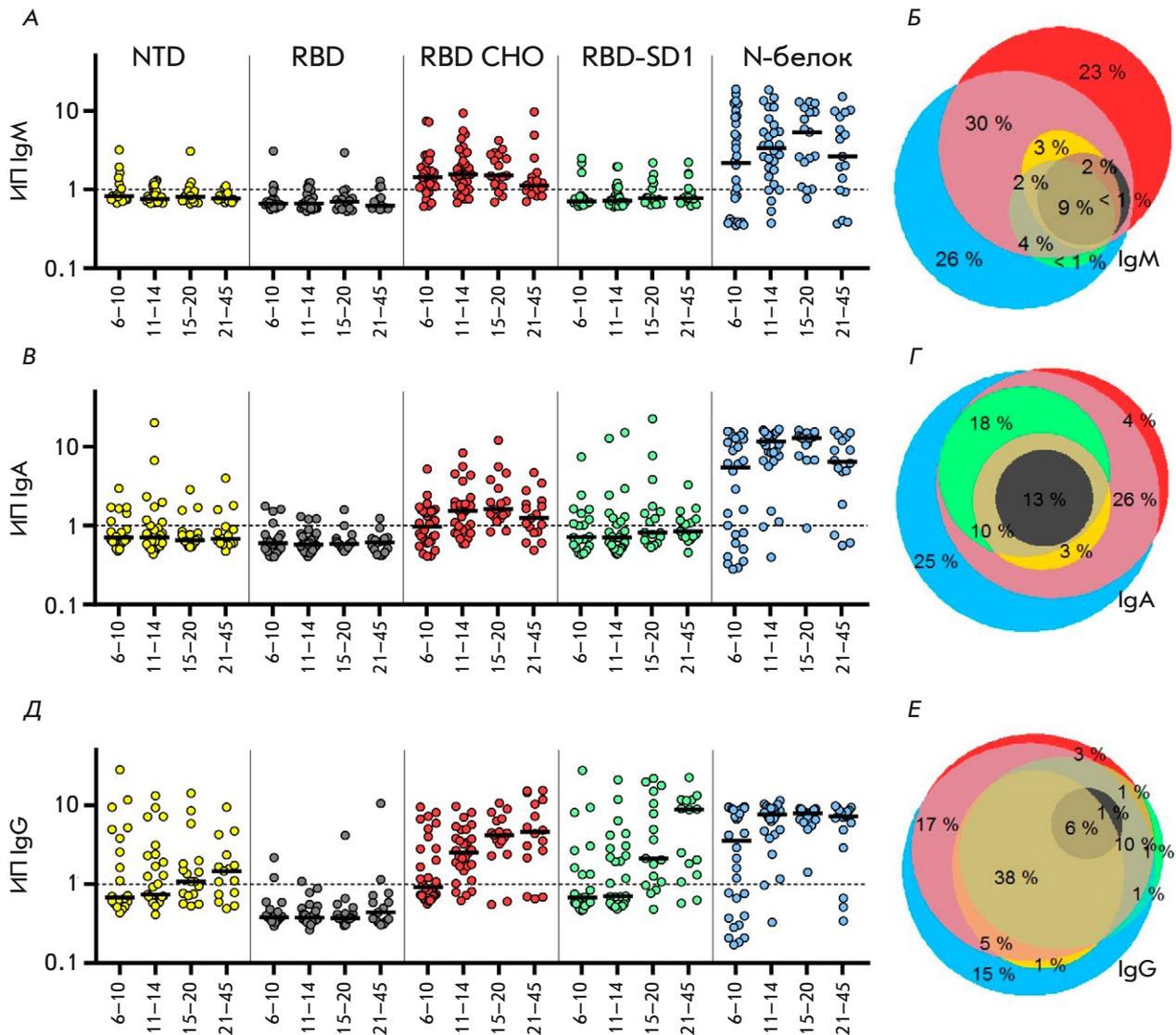


Рис. 5. Результаты серодиагностического тестирования методом ИФА образцов сывороток крови пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, госпитализированных в различные периоды после появления симптомов. А, В, Д – индивидуальные значения индексов позитивности образцов, рассчитанные при определении антител классов М (А), А (В) и G (Д), специфичных к фрагментам NTD, RBD, RBD-SD1 S-белка и N-белку вируса SARS-CoV-2. Б, Г, Е – диаграммы Венна, отражающие спектры антигенспецифичности иммуноглобулинов классов М (А), А (В) и G (Д) образцов

появления антител, зависящую от природы антигена и от времени после появления симптомов. Медианы значений индекса позитивности N- и RBD (CHO)-специфичных иммуноглобулинов классов М и А превышают пороговые значения к 6 дню после появления симптомов, достигая максимальных значений к 11–14 дню в случае RBD (CHO)-специфичных антител класса М и к 15–20 дню в других случаях, и снижаются после 3 недель наблюдения. В случае антигенов, представляющих линейные эпитопы S-белка (RBD (*E. coli*), RBD-SD1 и NTD), количество серопозитивных пациентов в каждом временном диа-

пазоне не превышало 10%, что не позволило медианам значений индекса позитивности иммуноглобулинов, специфичных к этим антигенам, превысить пороговое значение. Скорость сероконверсии иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку вируса SARS-CoV-2, значительно выше скорости сероконверсии антител другой специфичности, медиана значений уровня N-специфичных антител значимо превышает пороговое значение уже к 6 дню после появления симптомов, достигая максимума на второй неделе. В то же время медиана значений уровня RBD (CHO)-специфичных конформационно-зависимых

антител превышает пороговое значение ко второй неделе после появления симптомов, достигая максимума в диапазоне 21–45 дней.

Для антител класса G, специфичных к антигенам NTD и RBD-SD1, содержащих линейные эпитопы, превышение порогового значения достигается только на третьей неделе после появления симптомов. Таким образом скорость сероконверсии ранних антител классов M и A несколько выше в случае антител, специфичных, главным образом, к конформационным эпитопам фрагмента RBD, чем для N-специфичных антител. И наоборот, скорость сероконверсии антител класса G убывает в ряду N-, конформационно-зависимых RBD (CHO)- и конформационно-независимых RBD-SD1/NTD-специфичных антител. Согласно полученным данным (рис. 5), наибольшей иммуногенностью обладает N-белок, что описано ранее [44], тогда как линейные эпитопы RBD и NTD имеют наименьшую иммуногенность. Таким образом, сильную иммуногенность RBD-фрагмента, известную ранее [45], в большей степени обеспечивают конформационные эпитопы. Линейные эпитопы субдомена SD1 обладают сильной, но медленно развивающейся иммуногенностью, что может быть особенно важным в свете данных о существовании нейтрализующих антител, специфичных именно к линейному эпитопу, расположенному в этой области [45]. Установлено, что спектры антигенспецифичности различаются в случае иммуноглобулинов классов M, A и G (рис. 5Б,Г,Е). Количество серопозитивных индивидов, в крови которых обнаруживаются антитела, специфичные только к одному «сильному» иммуногену, уменьшается в ряду иммуноглобулинов классов M, A и G и составляет 49, 29 и 19% от общего числа серопозитивных индивидов соответственно. Эти данные свидетельствуют о необходимости использования как минимум двух антигенов при проведении ИФА для диагностики COVID-19 с целью увеличения ее чувствительности, особенно на ранней стадии развития болезни.

Опубликованные к настоящему моменту данные, указывающие на влияние возраста на развитие В-клеточного иммунного ответа (в частности, на скорость сероконверсии и величину титра иммуноглобулинов) у больных COVID-19, остаются противоречивыми. В ряде исследований у пожилых пациентов наблюдали более высокий титр антител всех классов [8, 46, 47], в то же время опубликованы работы, в которых не выявлена связь между возрастом и В-клеточным ответом [48, 49]. Не выявлено влияния половой принадлежности пациентов на количество специфичных антител к SARS-CoV-2 [47, 48].

Мы сравнили содержание иммуноглобулинов классов M, A и G в крови пациентов разных возрастно-половых групп из когорты госпитализирован-

ных в разные временные промежутки после появления симптомов. С этой целью использовали ИФА и смесь рекомбинантных белков, фрагментов RBD-SD1 и NTD S-белка SARS-CoV-2, и рекомбинантный N-белок в качестве антигенов. Сравнение значений ИП в каждом временном промежутке с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни не выявило значимых различий в скорости сероконверсии между исследуемыми группами (рис. 6).

Для выявления отличий в уровне антител классов M, A и G, специфичных к разным фрагментам вируса SARS-CoV-2, у пациентов с разной степенью тяжести COVID-19, в когорту пациентов, не нуждавшихся и нуждавшихся в ИВЛ (среднее значение времени до госпитализации 21.2 дня), дополнительно включили группу индивидов ($n = 50$), перенесших заболевание в легкой форме вне стационара. Поскольку уровень антител в крови зависит от времени, прошедшего с момента появления симптомов, для корректного сравнения группу госпитализированных составили пациенты, госпитализированные через 15–45 дней (среднее значение 21.8 дней) после появления симптомов.

Анализ частоты встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам классов M или A, специфичных к одному или более используемых антигенов, выявил значительное уменьшение частоты в группе с легкой формой заболевания по сравнению с частотой госпитализированных пациентов, серопозитивных по каждому из антигенов (рис. 7А). В этой группе наблюдается также снижение частоты встречаемости иммуноглобулинов класса G, специфичных к линейным эпитопам RBD, NTD и RBD-SD1, тогда как частота встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам класса G, специфичных к RBD (CHO) и N-белку, не изменилась. В группе пациентов, находящихся на ИВЛ, также снижена частота индивидов, серопозитивных по одному или более классам антител рассматриваемых специфичностей. Однако подобное снижение обусловлено существенным снижением количества серопозитивных пациентов в подгруппе скончавшихся, тогда как в подгруппе выздоровевших и в группе госпитализированных эти характеристики сходны.

Анализ уровня антител классов M, A и G рассматриваемых специфичностей в серопозитивных сыворотках крови с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни не выявил статистически значимого влияния тяжести заболевания на уровень SARS-CoV-2-специфичных антител. Полученные результаты противоречат ряду данных, согласно которым в крови тяжелобольных повышено содержание иммуноглобулинов различных классов, а в группе па-

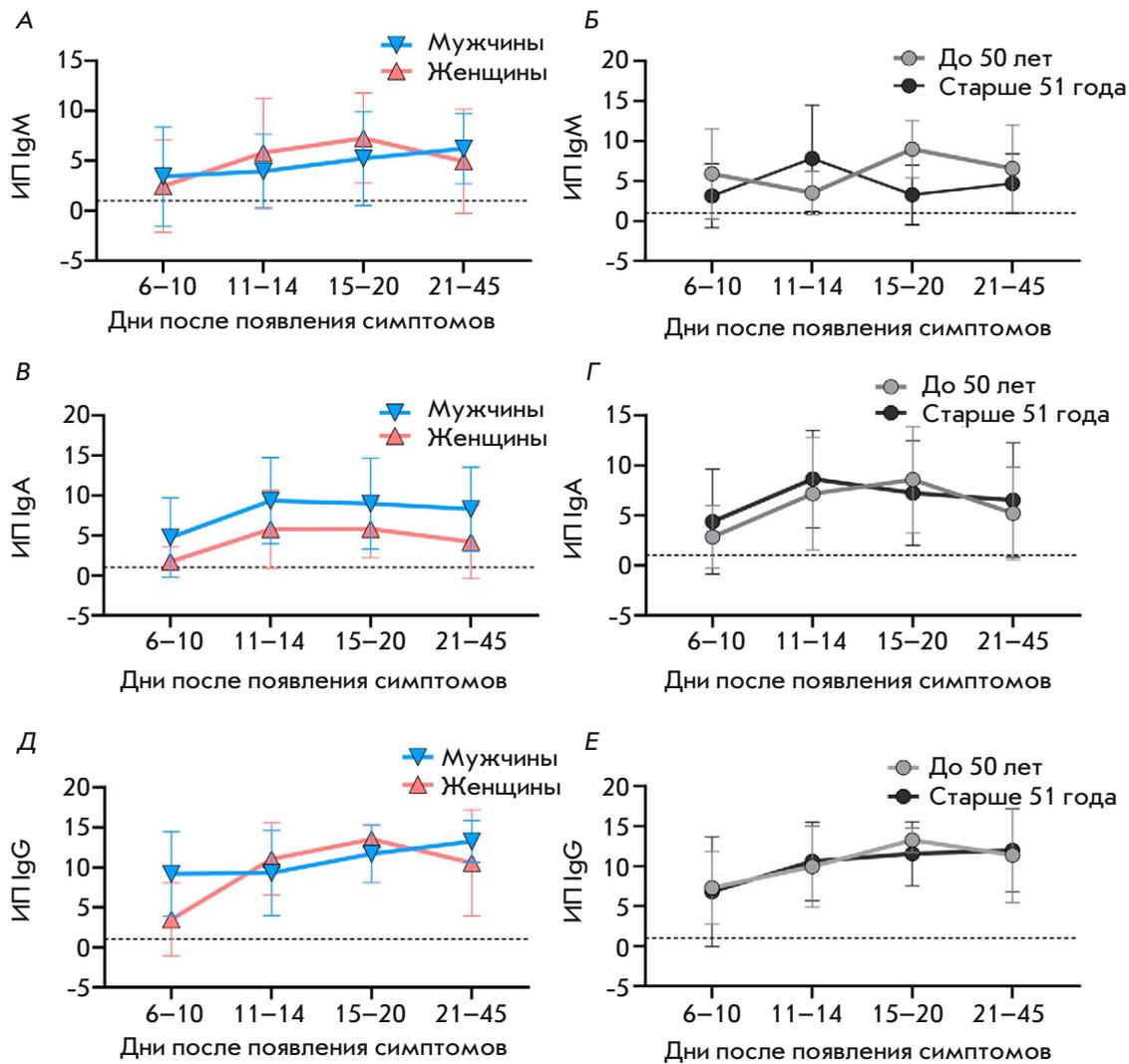


Рис. 6. Распределение индексов позитивности образцов крови пациентов в зависимости от дней после появления симптомов в группах мужчин и женщин (А, В, Д) и группах пациентов разного возраста (до 50 лет и после 51 года) (Б, Г, Е), рассчитанных при определении иммуноглобулинов классов М (А, Б), А (В, Г) и G (Д, Е), специфичных к SARS-CoV-2

циентов с бессимптомным течением болезни или с ее слабыми проявлениями снижено содержание антител [5, 8, 48, 50].

Анализ соотношения частот встречаемости подклассов иммуноглобулинов А и G в сыворотках соответствующих серопозитивных образцов (рис. 7Б,В) выявляет равномерную индукцию подклассов G1–G4 иммуноглобулина G и подклассов A1–A2 иммуноглобулина А, специфичных к N-белку, в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19, в то время как при иммунном ответе на S-антиген основными подклассами являются G1, G3 и A1. При более тяжелом течении болезни частота встречаемости антител G1, специфичных к S-антигенам, уменьшалась, а A2, наоборот, увеличивалась. Однако корреляции между уровнем SARS-CoV-2-специфичных антител исследуемых подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено.

дующих подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено.

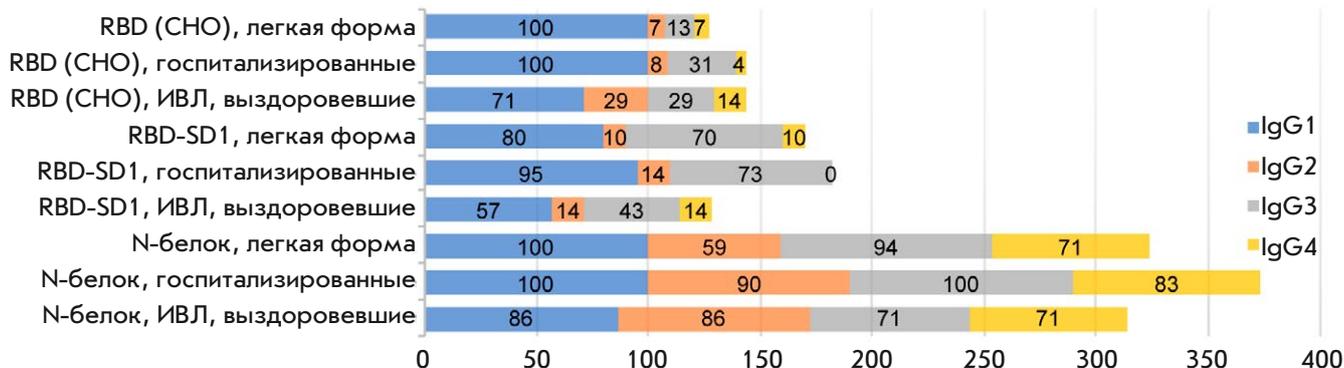
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно утверждать, что с использованием разработанного в настоящем исследовании диагностического набора для ИФА, основанного на рекомбинантных антигенах, фрагментах белков вируса SARS-CoV-2, нами с достаточной долей достоверности выявлено преимущество иммуноглобулинов класса А в качестве раннего иммунологического критерия развития заболевания. Спектр специфичности иммуноглобулинов, индуцируемых SARS-CoV-2 у каждого индивида, зависит от времени, после инфицирования, и изменяется в ряду иммуноглобулинов М, А, G от узкого к широкому. Нами также показана нерав-

A

Тяжесть протекания болезни	IgM					IgA					IgG				
	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N
Легкая форма	5	0	19	5	19	0	2	35	16	40	23	5	88	56	84
Госпитализация	15	15	74	26	79	18	6	77	44	85	59	9	82	77	88
ИВЛ	6	13	38	6	75	25	19	44	25	75	25	0	50	38	69
ИВЛ, выздоровевшие	14	29	43	14	100	43	29	86	43	86	43	0	86	57	86
ИВЛ, скончавшиеся	0	0	33	0	56	22	11	11	11	67	11	0	22	11	56

Б



В

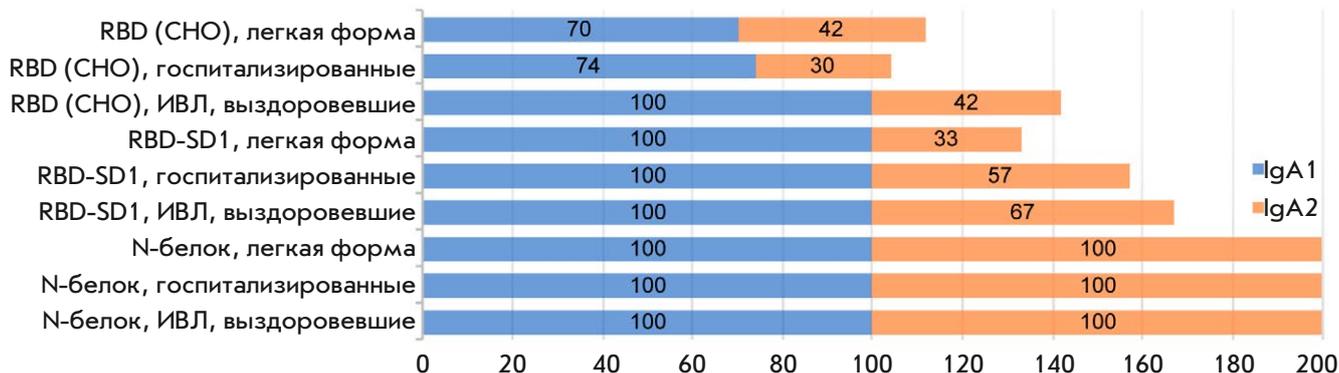


Рис. 7. Изменение частоты встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам различных классов и подклассов, специфичных к антигенам SARS-CoV-2, в группах пациентов с различной степенью тяжести COVID-19. А – частота встречаемости (%) пациентов, серопозитивных по иммуноглобулинам классов М, А и G, специфичных к антигенам NTD, RBD, RBD-SD1 и N-белку в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19. Б – частота встречаемости (%) пациентов, серопозитивных по подклассам иммуноглобулинов G и A (B), специфичных к антигенам RBD (CHO), RBD-SD1 и N-белку, в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19

номерная индукция подклассов иммуноглобулинов, зависящая от природы антигена. N-белок индуцирует иммуноглобулины G1–G4 и A1–A2 в равном соотношении, тогда как основными подклассами при иммунном ответе на S-антиген являются G1, G3 и A1. Соотношение между N-специфичными подклассами остается практически неизменным в группах пациентов с разной тяжестью COVID-19, но при более тяжелом течении болезни частота

встречаемости S-специфичных антител изотипа G1 уменьшается, а A2, наоборот, увеличивается. Однако корреляции между уровнем SARS-CoV-2-специфичных антител исследуемых классов и подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-74-30019 и ICGEB CRP/RUS18-01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiuyuan Ou, Yan Liu, Xiaobo Lei, Pei Li, Dan Mi, Lili Ren, Li Guo, Ruixuan Guo, Ting Chen, Jiabin Hu, Zichun Xiang, et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 1. № 1. P. 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
2. Xiaofan Liu, Hong Zhou, Yilu Zhou, Xiaojun Wu, Yang Zhao, Yang Lu, Weijun Tan, Mingli Yuan, Xuhong Ding, Jinjing Zou, et al. // *J. Infect.* 2020. V. 81. № 1. P. e95-e97. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.008. Epub. 2020 Apr. 17.
3. Ahnach M., Zbiri S., Nejari S., Ousti F., Elkettani C. // *J. Med. Biochem.* 2020. V. 39. P. 1-8.
4. Berek A., Aziz A., Islam M.S. // *Heliyon.* 2020. V. 6. P. e05684.
5. Chuan Qin, Luoqi Zhou, Ziwei Hu, Shuoqi Zhang, Sheng Yang, Yu Tao, Cuihong Xie, Ke Ma, Ke Shang, Wei Wang, et al. // *China Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 10. 1093/cid/ciaa248.
6. Lavillegrand J.R., Garnier M., Spaeth A., Mario N., Hariri G., Pilon A., Berti E., Fieux F., Thietart S., Urbina T., et al. // *Ann. Intensive. Care.* 2021. V. 11. P. 9.
7. Yamada T., Wakabayashi M., Yamaji T., Chopra N., Mikami T., Miyashita H., Miyashita S. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 509. P. 235.
8. Huan Ma, Weihong Zeng, Hongliang He, Dan Zhao, Dehua Jiang, Peigen Zhou, Linzhao Cheng, Yajuan Li, Xiaoling Ma, Tengchuan Jin. // *Cell. Mol. Immunol.* 2020. V. 17. P. 773-775.
9. Debnath M., Banerjee M., Berk M. // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 7. P. 8787-8795. doi: 10.1096/fj.202001115R.
10. Mei-Shang Ho, Wei-Ju Chen, Hour-Young Chen, Szu-Fong Lin, Min-Chin Wang, Jiali Di, Yen-Ta Lu, Ching-Lung Liu, Shan-Chwen Chang, Chung-Liang Chao, et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2005. V. 11. № 11. P. 1730-1737. doi: 10.3201/eid1111.040659.
11. Li Guo, Xi Zhang, Lili Ren, Xuelian Yu, Lijuan Chen, Hongli Zhou, Xin Gao, Zheng Teng, Jianguo Li, Jiayu Hu, et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20. № 2. P. 192-200. doi: 10.3201/eid2002.131094.
12. Kelvin Kai-Wang To, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung, Anthony Raymond Tam, Tak-Chiu Wu, David Christopher Lung, Cyril Chik-Yan Yip, Jian-Piao Cai, Jacky Man-Chun Chan, Thomas Shiu-Hong Chik, et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2020. V. 20. № 5. P. 565-574. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
13. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays.* 2009. V. 31. № 11. P. 1161-1171. doi: 10.1002/bies.200900020.
14. Lili Ren, Ye-Ming Wang, Zhi-Qiang Wu, Zi-Chun Xiang, Li Guo, Teng Xu, Yong-Zhong Jiang, Yan Xiong, Yong-Jun Li, Xing-Wang Li, et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2020. V. 133. № 9. P. 1015-1024. doi: 10.1097/CM9.0000000000000722.
15. Kuldeep Dhama, Khan Sharun, Ruchi Tiwari, Maryam Dadar, Yashpal Singh Malik, Karam Pal Singh Wanpen Chaicumpa // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020. V. 16. № 6. P. 1232-1238. doi: 10.1080/21645515.2020.1735227.
16. Li Guo, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, De Chang, Fan Yang, Charles S Dela Cruz, Yingying Wang, Chao Wu, Yan Xiao, et al. // *Clin. Infect Dis.* 2020. V. 71. № 15. P. 778-785. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
17. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., et al. // *Lancet.* 2020. 396. V. 10. № 255. P. 887-897. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
18. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 384. № 5. P. 403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
19. van Doremalen N., Lambe T., Spencer A., Belij-Rammerstorfer S., Purushotham J.N., Port J. R., Avanzato V., Bushmaker T., Flaxman A., Ulaszewska M. // *bioRxiv.* 2020. V. 2020.05.13.093195. doi: 10.1101/2020.05.13.093195. Preprint
20. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46. № 1. P. 3-16. doi: 10.3892/ijmm.2020.4596.
21. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V., Dayanova L.K., Vorobiev I.I. // *PLoS One.* 2021. V. 16. № 2. P. e0242890. doi: 10.1371/journal.pone.0242890. eCollection 2021.
22. Durova O., Vorobiev I., Smirnov I., Reshetnyak A., Telegin G., Shamborant O., Orlova N., Genkin D., Bacon A., Ponomarenko N., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87-95. doi: 10.1016/j.molimm.2008.12.020.
23. Ahnach M., Zbiri S., Nejari S., Ousti F., Elkettani C. // *J. Med. Biochem.* 2020. V. 9. № 4. P. 500-507. doi: 10.5937/jomb0-27554.
24. Stefan N., Birkenfeld A.L., Schulze M.B. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021. V. 17. № 3. P. 135-149. doi: 10.1038/s41574-020-00462-1.
25. Kaoshang Zhao, Ruiyun Li, Xiaojun Wu, Yang Zhao, Tao Wang, Zhishui Zheng, Shaolin Zeng, Xuhong Ding, Hanxiang Nie. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020. V. 39. № 12. P. 2279-2287. doi: 10.1007/s10096-020-03976-8.
26. Riley L.K., Rupert J. // *Am. Fam. Physician.* 2015. V. 92. № 11. P. 1004-1011.
27. Shapiro M.F., Greenfield S. // *Ann. Intern. Med.* 1987. V. 106. № 1. P. 65-74. doi: 10.7326/0003-4819-106-1-65.
28. Mei Y., Weinberg S.E., Zhao L., Frink A., Qi C., Behdad A., Ji P. // *E. Clin. Med.* 2020. V. 26. P. 100475. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100475. eCollection 2020 Sep.
29. Takayuki Yamada, Mako Wakabayashi, Takahiro Yamaji, Nitin Chopra, Takahisa Mikami, Hirotaka Miyashita, Satoshi Miyashita. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 509. P. 235-243. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.008.
30. Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, et al. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10223. P. 497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
31. Barnaby Edward Young, Sean Wei Xiang Ong, Shirin Kalimuddin, Jenny G Low, Seow Yen Tan, Jiashen Loh, Oon-Tek Ng, Kalisvar Marimuthu, Li Wei Ang, Tze Minn Mak, et al. // *JAMA.* 2020. V. 323. № 15. P. 1488-1494. doi: 10.1001/jama.2020.3204.
32. Wei-Jie Guan, Zheng-Yi Ni, Yu Hu, Wen-Hua Liang, Chun-Quan Ou, Jian-Xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-Liang Lei, David S C Hui, et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 18. P. 1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
33. Yan Deng, Wei Liu, Kui Liu, Yuan-Yuan Fang, Jin Shang, Ling Zhou, Ke Wang, Fan Leng, Shuang Wei, Lei Chen, et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2020. V. 133. № 11. P. 1261-1267. doi: 10.1097/CM9.0000000000000824.
34. Sharifpour M., Rangaraju S., Liu M., Alabyad D., Nahab F.B., Creel-Bulos C.M., Jabaley C.S. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 11. P. e0242400. doi: 10.1371/journal.pone.0242400. eCollection 2020.
35. Fang Liu, Lin Li, Meng Da Xu, Juan Wu, Ding Luo, Yu Si Zhu, Bi Xi Li, Xiao Yang Song, Xiang Zhou. // *J. Clin. Virol.* 2020. V. 127. P. 104370. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370.
36. Zhang Yitao, Chen Mu, Zhou Ling, Cheng Shiyao, Xue Jiaojie, Chen Zhichong, Peng Huajing, Ou Maode, Cheng Kanglin, Ou Yang Mao, et al. // *Curr. Med. Res. Opin.* 2021.

- V. 4. P. 1–14. doi: 10.1080/03007995.2021.1876005. Online ahead of print.
37. Chaochao Tan, Ying Huang, Fengxia Shi, Kui Tan, Qionghui Ma, Yong Chen, Xixin Jiang, Xiaosong Li. // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. № 7. P. 856–862. doi: 10.1002/jmv.25871.
38. Takatoshi Higuchi, Tsutomu Nishida, Hiromi Iwahashi, Osamu Morimura, Yasushi Otani, Yukiyoshi Okauchi, Masaru Yokoe, Norihiro Suzuki, Masami Inada, Kinya Abe. // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93. P. 2141–2148. doi: 10.1002/jmv.26599.
39. Jialin Xiang, Jing Wen, Xiaoqing Yuan, Shun Xiong, Xue Zhou, Changjin Liu¹, Xun Min // *MedRxiv.* 2020. Preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.20034447>
40. Ling W. // *Med. Mal. Infect.* 2020. V. 50. № 4. P. 332–334. doi: 10.1016/j.medmal.2020.03.007.
41. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Tondeur L., Huon Ch., Guivel-Benhassine F., Staropoli I., Chazal M., Dufloo J., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. № 559. P. eabc3103. doi: 10.1126/scitranslmed.abc3103.
42. Lili Ren, Lulu Zhang, De Chang, Junwen Wang, Yongfeng Hu, Hong Chen, Li Guo, Chao Wu, Conghui Wang, Yingying Wang, et al. // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 780. doi: 10.1038/s42003-020-01526-8.
43. Bin Lou, Ting-Dong Li, Shu-Fa Zheng, Ying-Ying Su, Zhi-Yong Li, Wei Liu, Fei Yu, Sheng-Xiang Ge, Qian-Da Zou, Quan Yuan, et al. // *Eur. Respir. J.* 2020. V. 56. № 2. P. 2000763. doi: 10.1183/13993003.00763-2020.
44. Burbelo P.D., Riedo F.X., Morishima Ch., Rawlings S., Smith D., Das S., Strich J.R., Chertow D.S., Davey R.T., Cohen J. // *J. Infect. Dis.* 2020. V. 222. № 2. P. 206–213. doi: 10.1093/infdis/jiaa273.
45. Chek Meng Poh, Guillaume Carissimo, Bei Wang, Siti Naqiah Amrun, Cheryl Yi-Pin Lee, Rhonda Sin-Ling Chee, Siew-Wai Fong, Nicholas Kim-Wah Yeo, Wen-Hsin Lee, Anthony Torres-Ruesta, et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 2806. doi: 10.1038/s41467-020-16638-2.
46. Madariaga M.L.L., Guthmiller J.J., Schrantz S., Jansen M.O., Christensen C., Kumar M., Prochaska M., Wool G., Durkin-Celauro A., Oh W.H., et al. // *J. Intern. Med.* 2020. Oct 9; 10.1111/joim.13185. doi: 10.1111/joim.13185.
47. Garcia-Basteiro A.L., Moncunill G., Tortajada M., Vidal M., Guinovart C., Jiménez A., Santano R., Sanz S., Méndez S., Llupià A., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3500. doi: 10.1038/s41467-020-17318-x.
48. Nilsson C.J., Zurbuchen Y., Valaperti A., Schreiner J., Wolfensberger A., Raeber M.E., Adamo S., Weigang S., Emmenegger M., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021. V. 147. № 2. P. 545–557.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2020.10.040.
49. Juan Chen, Zhen-Zhen Zhang, Yao-Kai Chen, Quan-Xin Long, Wen-Guang Tian, Hai-Jun Deng, Jie-Li Hu, Xian-Xiang Zhang, Pu-Liao, Jiang-Lin Xiang, et al. // *Genes Dis.* 2020. V. 7. № 4. P. 535–541. doi: 10.1016/j.gendis.2020.03.008.
50. Lynch K.L., Whitman J.D., Lacanienta N.P., Beckerdite E.W., Kastner Sh.A., Shy B.R., Goldgof G.M., Levine A.G., Bapat S.P., Stramer S.L., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa979. doi: 10.1093/cid/ciaa979.