

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ИНФОРМАЦИОННО-РЕФЕРАТИВНЫЙ ЖУРНАЛ

- ❶ **ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**
- ❷ **РЕФЕРАТИВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**
- ❸ **ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ**
- ❹ **ПАТЕНТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**
- ❺ **НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ**

ООО "НПО "ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ"

№ **1(21)**
2021



ООО «НПО «Диагностические системы» является крупнейшим в России производителем иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний.

Разработка и производство диагностических наборов базируется на последних достижениях генной инженерии и иммунохимии.



Наборы
для бактериологических
исследований

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Вирусных гепатитов
ВИЧ-инфекции
COVID-19-инфекции
ToRCH-инфекций
Сифилиса
Гормонов
Онкомаркеров

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

№ 1 (21)

2021

ИНФОРМАЦИОННО-РЕФЕРАТИВНЫЙ ЖУРНАЛ

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТИВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	3
Общий раздел (социальная информация, статистика, эпидемиология)	3
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	5
Матвеева Е.М., Макарова И.А., Фисенко Н.С., Обрядина А.П. Оценка корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах "ДС-ИФА-АНТИ- SARS-CoV-2-G (S)", "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G -количественный" и в реакции нейтрализации	5
Новая коронавирусная инфекция COVID-19: актуальные вопросы в научных и практических аспектах	14
Михайлова Ю.В., Шальнова Е.Е., Кувшинов М.В. Особенности развития гуморального иммунного ответа на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2	14
Шальнова Е.Е., Михайлова Ю.В., Голубева И.Ф., Высоцкая А.Г. Лабораторные диагностические тесты для выявления SARS-CoV-2 и интерпретация результатов исследований	24
Шальнова Е.Е., Фисенко Н.С., Голубева И.Ф. Коронавирусная инфекция COVID-19: практические аспекты клинического использования антиковидной плазмы	35
Шальнова Е.Е., Поляков С.Ю., Высоцкая А.Г. Вакцины против COVID-19: основные подходы к созданию и исследования по оценке безопасности, иммуногенности и эффективности	45

Учредитель: ООО Научно производственное объединение "Диагностические системы"

Главный редактор Шальнова Е.Е.

Адрес редакции

РОССИЯ, 603022, Н. Новгород, ул. Барминская, 9 Б

Тел./факс (831) 434-86-83, 467-82-18

E-mail: see@npods.ru; www.npods.ru

Зарегистрировано Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия

Регистрационное свидетельство ПИ №ФС 77-22849 от 30 декабря 2005 г.

Сдано в набор 15.11.2021

Подписано в печать 17.12.2021

Тираж 1500 экземпляров.

Отпечатано в ИП "Панин А.А.", 603138, Н, Новгород, ул. Строкина, д.8, оф.124

Распространяется бесплатно. Коммерческое использование запрещено.

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Бурков А.Н. (д.м.н., профессор),
Почетный член Редакционного совета

Обрядина А.П. (д.б.н.)

Пименов В.К. (к.б.н.)

Кувшинов М.В. (к.м.н.)

Фисенко Н.С.

Бочкова Г.Б. (к.т.н.)

Михайлова Ю.В. (к.б.н.)

Шальнова Е.Е.

Голубева И.Ф.

Поляков С.Ю.

Плаксына Н.Б.

Уважаемые читатели!

Настоящий выпуск корпоративного информационно-реферативного журнала "Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний" посвящен некоторым актуальным аспектам этиологической диагностики, лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Вся информация номера представлена в традиционно структурированном формате.

Так, в общем разделе "Социальная информация, статистика, эпидемиология" приведены статистические данные о распространённости инфекции COVID-19 в различных регионах мира и в Российской Федерации за 2021 год, особый акцент сделан на показателях заболеваемости и летальности, количестве лабораторных диагностических исследований, а также на показателях охвата населения вакцинацией против COVID-19 в России.

В рубрике "Оригинальные статьи" представлена статья сотрудников нашей компании "Оценка корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)", "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G -количественный" и в реакции нейтрализации". В работе приведены результаты исследований, в ходе которых была выявлена статистически значимая корреляция между титрами/концентрацией антител в указанных тест-системах и вируснейтрализующих антител (ВНА) в антиковидной плазме; установлены критерии значений ОП (КП), титров и концентрации специфических IgG для отбора образцов антиковидной плазмы, содержащей ВНА в титрах $\geq 1/80$ и $\geq 1/160$. Полученные авторами результаты убедительны и представляют несомненный научный и практический интерес.

На страницах нашего журнала вы сможете ознакомиться с дайджестами публикаций отечественных и зарубежных авторов, посвящённых оценке гуморального иммунного ответа на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, использованию различных лабораторных методов для этиологической диагностики COVID-19, исследованиям эффективности применения антиковидной плазмы для терапии этой инфекции, клиническим испытаниям по оценке безопасности, эффективности и иммуногенности вакцин против COVID-19.

В дайджесте публикаций об особенностях развития гуморального иммунного ответа при COVID-19, наибольший интерес, на наш взгляд, представляют результаты исследований, подчеркивающих важное практическое значение детекции антител к отдельным антигенам SARS-CoV-2 для оценки иммунитета, а также работы по изучению его в формировании в различных популяционных группах и у переболевших COVID-19 в различных клинических формах.

Другой дайджест посвящён обзору научных работ в области лабораторной диагностики COVID-19; использованию тестов на основе различных методов - как прямых (тестов на основе методов амплификации нуклеиновых кислот для выявления РНК SARS-CoV-2 и тестов на основе методов

иммунохимического анализа (ИХА) для выявления антигена вируса), так и непрямых методов серологической диагностики (тестов на основе ИХА для обнаружения антител к SARS-CoV-2), особенностям конструкции тестов в зависимости от использования в качестве диагностической мишени S- и N-белков SARS-CoV-2 и формату учёта получаемых результатов при выявлении антител. Представлен также ряд работ, касающихся оценки сходимости результатов, алгоритма тестирования и интерпретации результатов исследований, возможных причин получения ложных результатов. Научно-обоснованные данные многих исследований нашли отражение в руководствах и методических рекомендациях, выпущенных Всемирной организацией здравоохранения и регулирующими органами других стран (в том числе и России) по лабораторной диагностике этой инфекции с использованием различных видов тестов и интерпретации получаемых результатов анализов, что имеет большое значение для практического здравоохранения в современных условиях.

В дайджесте публикаций, касающихся исследований по оценке эффективности использования антиковидной плазмы для терапии COVID-19, приводится обзор продуктов крови, применяемых для создания пассивного иммунитета, обсуждаются практические аспекты получения и применения гипериммунной плазмы доноров-реконвалесцентов, перенёвших COVID-19, приводятся доказательства возможности её клинического использования.

В условиях продолжающейся пандемии COVID-19 наиболее приоритетной целью всего мирового сообщества является массовая иммунизация населения против COVID-19 для формирования коллективного иммунитета. Поднимаемая проблема нашла своё отражение и в дайджесте публикаций, посвящённом вопросам вакцинопрофилактики против COVID-19 - представлен обзор основных типов вакцин, технологических платформ, используемых для их создания, и наиболее важных характеристик препаратов, зарегистрированных за рубежом и в России; освещены результаты клинических испытаний ряда российских вакцин против COVID-19, продемонстрировавших высокую эффективность, иммуногенность и безопасность; представлены также и результаты исследований зарубежных авторов, изучавших иммуногенность некоторых вакцин и формирование поствакцинального иммунитета в различных популяционных группах.

Таким образом, в настоящее время специалистами разных стран проводятся научные исследования и разработки в сфере медицины и здравоохранения, результаты которых активно используются при формировании комплекса мероприятий, направленных на борьбу с пандемией COVID-19.

Надеемся, что опубликованные в нашем издании материалы будут полезны специалистам лабораторной службы, врачам-клиницистам различных специальностей, научным работникам и окажутся востребованными в их профессиональной деятельности.

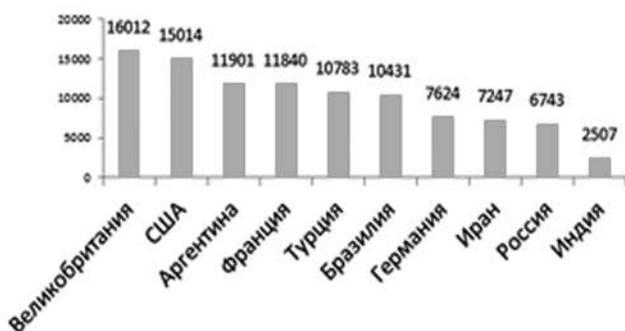
Общий раздел (социальная информация, статистика, эпидемиология)

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ COVID-19 В МИРЕ (по состоянию на 16.12.2021 г. *)

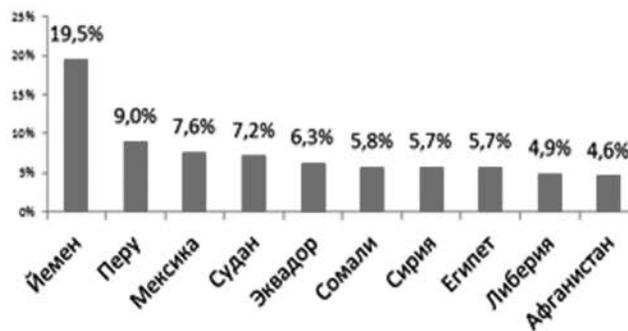
Регион	Кол-во случаев	Кол-во случаев на 100 тыс.	Прирост за сутки, случаев	Прирост на 100 тыс.	Прирост за сутки, %
ВСЕГО В МИРЕ	272191787	3558,0	725529	9,5	0,27%
Американский регион	99246113	5229,5	167800	8,8	0,17%
Европейский регион	94015100	4713,0	458209	23,0	0,49%
Восточно-Средиземноморский регион	16984374	1828,6	12154	1,3	0,07%
Западно-Тихоокеанский регион	10631970	1047,7	32602	3,2	0,31%
Юго-Восточная Азия	44778033	6244,3	12588	1,8	0,03%
Африканский регион	6536197	595,9	42176	3,8	0,65%

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ COVID-19 НА 100 ТЫС. НАСЕЛЕНИЯ И ЛЕТАЛЬНОСТЬ (%) В НАИБОЛЕЕ ПОРАЖЕННЫХ СТРАНАХ (среди государств с более чем 5000 случаев заболевания)*)

Заболеваемость на 100 тыс. населения

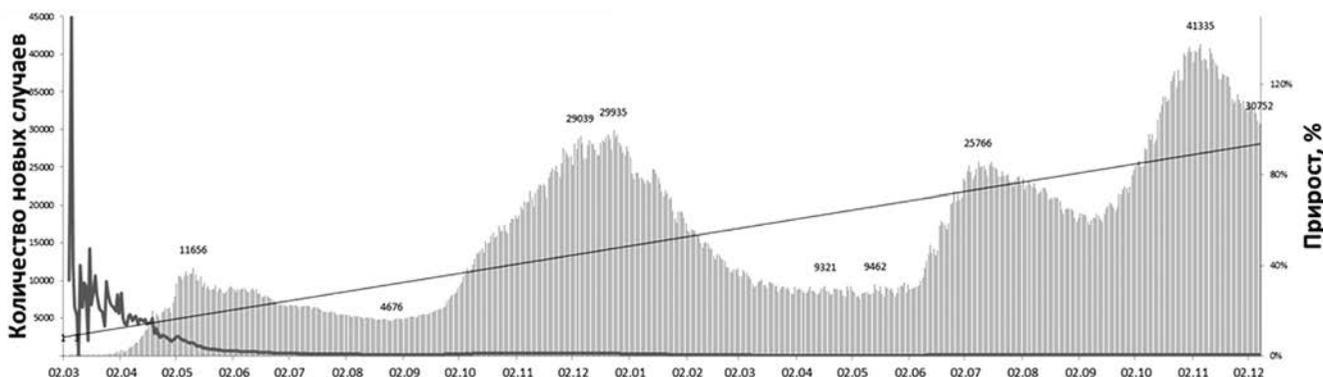


Страны с наибольшей летальностью



ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ *)

Всего в РФ: с 02.03.2020 по 16.12.2021		За сутки (по данным на 16.12.2021)	
Случаев заболевания	10 131 646	В 85 субъектах	28 486
			В 85 субъектах



*) Использованы материалы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора РФ) https://www.rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

СТРАНЫ С НАИБОЛЬШИМ ЧИСЛОМ ПРОВЕДЕННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА COVID-19 *

Страна	Количество тестов	Данные от:	В расчёте на 1 млн населения:
США	781366086	15.12.2021	2368081
Индия	658847816	15.12.2021	476554
Великобритания	380861666	15.12.2021	5714601
Россия	232800000	15.12.2021	1586387
Франция	175073861	13.12.2021	2542476
Китай	160000000	06.08.2020	113673
Италия	127717255	15.12.2021	2120900
Австрия	116145233	15.12.2021	13027511
Турция	112975302	15.12.2021	1358611
ОАЭ	105602052	15.12.2021	10807702

СТАТИСТИКА ПО ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ COVID-19 В РОССИИ НА 10.12.2021 Г. **

Население	146 025 000 чел.
Количество вакцинированных первым компонентом ¹⁾	74 189 385 чел.
Полностью вакцинировано ²⁾	67 260 355 чел.
Коллективный иммунитет ³⁾	55,7%

1) Число прививок первым компонентом, включая первичную и повторную вакцинации: "Гам-Ковид-Вак" (Спутник V), "Эпиваккорона", "КовиВак", а также вакциной "Спутник Лайт";

2) Число полных курсов вакцинации, включая первичную и повторную: "Гам-Ковид-Вак" (Спутник V), "Эпиваккорона", "КовиВак", а также вакциной "Спутник Лайт".

3) Рассчитывается в соответствии с эпидемиолого - математической моделью достижения коллективного иммунитета против новой коронавирусной инфекции в Российской Федерации.

*) Используются материалы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора РФ) https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono_virus/epid.php

**) официального сайта Правительства РФ <https://стопкоронавирус.рф>

Оценка корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)", "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" и в реакции нейтрализации

ООО НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород, Россия

Матвеева Е.М.,
Макарова И.А.,
Фисенко Н.С.,
Обрядина А.П.

Проведена работа по оценке корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" и "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" производства ООО "НПО "Диагностические системы" (г. Нижний Новгород), и в реакции нейтрализации (РН). В качестве объектов исследования использовали 49 образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов COVID-19 с установленным титром вируснейтрализующих антител (ВНА) для каждого образца.

По результатам исследования была установлена статистически значимая корреляция между титром антител класса G к SARS-COV-2 в иммуноферментном анализе (ИФА) и титром ВНА, а также значениями оптической плотности (ОП), коэффициента позитивности (КП) в ИФА и титром ВНА в плазме крови доноров при использовании тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)". Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,948 и 0,837 соответственно, при уровне значимости $p < 0,0001$. Чувствительность и специфичность тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" при тестировании образцов от потенциальных доноров гипериммунной плазмы составили 100% и 85,7% соответственно, по критерию титра антител ≥ 1600 , и 100% и 91,4% по критериям ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)

Установлена статистически значимая корреляция между концентрацией антител класса G к SARS-COV-2 в тест-системе "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный" и титром ВНА в плазме крови доноров. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,854. Для этой тест-системы установлена концентрация антител класса G к RBD-домену Spike-белка, соответствующая ВНА в титре $\geq 1/160$, которая составила 150 ЕдС/мл (BAU/ml).

Ключевые слова: коронавирус SARS-COV-2, COVID-19, вируснейтрализующие антитела, корреляционная связь

Информация о кластере случаев пневмонии неясной этиологии в городе Ухань, Китайская Народная Республика, впервые поступила во Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) 31 декабря 2019 г. Изначально вирусу было присвоено временное название "новый коронавирус 2019 г. (2019-nCoV)". Позднее ВОЗ определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом - COVID-19, а Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) присвоил официальное название вирусу - SARS-CoV-2 [1]. В январе 2020 г. ВОЗ объявила вспышку эпидемии, связанной с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, а 11 марта 2020 г. объявила принявшее мировой

масштаб распространение болезни пандемией.

На сегодняшний день нет средств этиотропной терапии COVID-19 с доказанной эффективностью. Одним из возможных подходов к лечению новой коронавиральной инфекции, является применение плазмы крови выздоровевших от COVID-19 пациентов, которая содержит антитела к SARS-COV-2. В основе этого метода лежит концепция пассивной иммунизации. Плазма выздоровевших и гипериммунный иммуноглобулин успешно применялись для лечения инфекций, вызванных другими респираторными вирусами.

В ряде исследований показано, что антитела к спайк белку (S) коронавируса SARS-COV-2, в особенности к его рецептор-связывающему домену (RBD), обладают нейтрализующими

ВВЕДЕНИЕ

Статья
опубликована
COVID19-
PREPRINTS.
MICROBE.RU.
<https://doi.org/10.21055/preprints-3111942>
под лицензией
CC BY 4.0.

свойствами [2]. Именно этот белок является мишенью большинства стратегий вакцинации и терапии на основе антител. Однако показано, что нуклеокапсидный (N) протеин вируса также содержит эпитопы, к которым определяются нейтрализующие антитела [3,4,5]. В исследовании Grzelak L. et al. при оценке корреляции титров нейтрализующих антител с титрами ИФА, коэффициент корреляции Спирмена, r составил 0,9 и 0,88 с IgG к S-белку и IgG к N-протеину соответственно [3].

В настоящее время очевидна актуальность поиска доступного и эффективного метода отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2. Для ряда серологических тестов зарубежных производителей показана корреляционная связь с титрами ВНА [6,7]. Для тестов "Ortho Vitros anti-SARS-COV-2 IgG" (производства "Ortho Clinical Diagnostic", США) и "SARS-COV-2 IgG II Quant" ("Abbott Laboratories", США) проведены исследования по установлению дискриминационных уровней для отбора образцов плазмы,

содержащих ВНА [8, 9]. Для тестов отечественного производства, на сегодняшний день, такой информации мало. Временные методические рекомендации министерства здравоохранения Российской Федерации (ВМР МЗ РФ) "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)", версия 13.1 (09.11.2021) предписывают использовать плазму реконвалесцентов с титром ВНА 1:160, допускается также использование донорской плазмы с титром 1:80 [10].

Нами было проведено исследование образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших инфекцию COVID-19, с целью установления корреляционной связи между титрами ВНА и специфических антител, определяемых методом ИФА и определения уровня специфической активности антител в ИФА, который соответствует титру ВНА, рекомендованному ВМР МЗ РФ (версия 13.1 от 09.11.2021) для клинического применения антиковидной плазмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследования использовали следующие материалы:

- 49 образцов плазмы крови доноров, с установленной вируснейтрализующей активностью в тесте с использованием перmissive культуры клеток (PH) и содержащих вируснейтрализующие антитела (ВНА) в титрах от 1/20 до 1/640;

- 24 образца сыворотки крови доноров, отобранных до ноября 2019.

Использовались следующие тест-системы:

- Тест-система "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)", производства ООО "НПО "Диагностические системы", кат. № S-2442.

- Тест-система "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный", производства ООО "НПО "Диагностические системы", кат. № S-2562.

- Тест-система для определения вируснейтрализующих антител (суррогатный полуколичественный тест нейтрализации) COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай). Принцип действия теста - ингибирование связывания рекомбинантного RBD фрагмента спайк белка

SARS-CoV-2 с рекомбинантным ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) в присутствии нейтрализующих антител в исследуемой пробе.

Выявление антител класса G к SARS-COV-2 проводили методом ИФА с использованием тест-систем "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" и "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный". Постановку анализа осуществляли согласно инструкции по применению к указанным наборам реагентов.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Analyse-it. Для оценки нормальности распределения результатов использовали тесты Шапиро-Уилка и Андерсона-Дарлинга. Для оценки взаимосвязи между титрами ИФА и PH использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Чувствительность и специфичность тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" и при тестировании образцов от потенциальных доноров гипериммунной плазмы рассчитывали в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 53022.3-2008 [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования 49 образцов плазмы крови доноров - реконвалесцентов COVID-19 и 24 образца сыворотки крови доноров, отобранных до ноября 2019, были охарактеризованы в

наборе COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай). Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты исследования образцов сыворотки/плазмы крови в ИФА и в PH

№ образца	Результаты определения ВНА		"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)"			"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный"	
	PH, титр	Индекс нейтрализации, %	ОП	КП	титр	ОП	сЕд/мл
1	20	≥20	2,845	9,33	1600	0,464	32,5
2	20	≥20	1,353	4,44	100	0,503	35,8
3	20	≥20	1,419	4,65	100	0,893	74,3
4	40	>20	2,488	8,16	100	0,594	43,7

№ образца	Результаты определения ВНА		"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)"			"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный"	
	РН, титр	Индекс нейтрализации, %	ОП	КП	титр	ОП	сЕд/мл
5	40	≥20	4,056	13,3	3200	0,515	36,8
6	40	>20	1,232	4,04	100	1,279	127,6
7	40	>20	0,234	0,77	<100	0,798	63,8
8	40	≥20	3,621	11,87	3200	0,717	55,4
9	40	≥20	2,914	9,55	1600	0,961	82,4
10	40	≥20	3,63	11,9	1600	0,838	68,1
11	40	>20	2,388	7,83	100	1,364	141,9
12	80	>20	3,092	10,14	1600	1,56	179,3
13	80	≥20	3,759	12,32	3200	1,534	173,9
14	80	>20	3,753	12,3	3200	1,321	134,5
15	80	≥20	3,72	12,2	3200	1,591	185,7
16	80	≥20	3,471	11,38	3200	1,401	148,5
17	80	>20	3,688	12,09	3200	0,997	86,9
18	80	≥20	3,99	13,08	3200	0,837	68,0
19	80	>20	3,213	10,53	1600	1,273	126,6
20	80	>20	3,469	11,37	3200	0,119	6,6
21	80	>20	3,171	10,4	1600	1,267	125,6
22	80	>20	3,176	10,41	1600	1,531	173,3
23	80	≥20	3,279	10,75	1600	0,977	84,4
24	80	>20	3,721	12,2	12800	1,147	107,3
25	80	>20	3,576	11,72	3200	1,084	98,4
26	80	>20	4,072	13,35	6400	1,084	98,4
27	80	>20	3,199	10,49	1600	1,258	124,2
28	160	≥20	3,5	11,48	3200	2,298	385,7
29	160	>20	3,422	11,22	6400	2,177	343,6
30	160	>20	3,599	11,8	12800	1,43	153,8
31	160	>20	4,056	13,3	3200	1,8	234,0
32	160	>20	3,73	12,23	6400	2,753	578,1
33	160	≥20	3,366	11,04	3200	1,871	252,4
34	160	>20	3,653	11,98	12800	1,697	209,2
35	160	>20	3,467	11,37	12800	2,144	332,8
36	160	>20	3,996	13,1	12800	2,292	383,5
37	160	>20	4,023	13,19	12800	1,921	265,9
38	160	≥20	4,035	13,23	12800	2,25	368,6
39	160	≥20	4,003	13,12	12800	1,503	167,7
40	160	>20	3,539	11,6	3200	1,796	233,0
41	160	≥20	3,756	12,31	3200	1,451	157,7
42	160	>20	3,578	11,73	3200	2,454	445,3
43	320	≥20	3,831	12,56	12800	1,623	192,6
44	320	≥20	3,452	11,32	12800	2,273	376,7
45	320	≥20	3,99	13,08	12800	2,284	380,6
46	320	≥20	3,838	12,58	12800	1,925	267,0
47	320	≥20	3,724	12,21	12800	2,289	382,4
48	640	>20	3,529	11,57	12800	2,163	339,0
49	640	≥20	3,906	12,81	12800	2,625	518,2
50	<20	<20	0,021	0,07	<100	0,016	<5
51	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,023	<5
52	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,013	<5
53	<20	<20	0	0	<100	0,018	<5
54	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,016	<5
55	<20	<20	0,003	0,01	<100	0,022	<5

№ образца	Результаты определения ВНА		"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)"			"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный"	
	РН, титр	Индекс нейтрализации, %	ОП	КП	титр	ОП	сЕд/мл
56	<20	<20	0,004	0,01	<100	0,022	<5
57	<20	<20	0,009	0,03	<100	0,015	<5
58	<20	<20	0,01	0,03	<100	0,022	<5
59	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,014	<5
60	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,021	<5
61	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,016	<5
62	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,018	<5
63	<20	<20	0,003	0,01	<100	0,018	<5
64	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,018	<5
65	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,021	<5
66	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,01	<5
67	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,016	<5
68	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,015	<5
69	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,013	<5
70	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,021	<5
71	<20	<20	0,01	0,03	<100	0,017	<5
72	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,021	<5
73	<20	<20	0,007	0,02	<100	0,018	<5

Все образцы, содержащие ВНА были определены как положительные в "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" и "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный", и как содержащие нейтрализующие антитела в тесте ингибирования COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA.

Для исследования корреляционной связи между титрами/концентрацией антител в

образцах крови доноров, полученных в ИФА и в РН, использовали программу Analyse-it. Сначала проводили исследование выборки на нормальность распределения. Для этих целей использовали тесты Шапиро-Уилка и Андерсона-Дарлинга. Затем оценивалась корреляционная связь между исследуемыми показателями.

Результаты для тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" представлены в таблицах 2-7.

Таблица 2

Результаты исследования нормальности распределения значений в выборках по данным ИФА и РН

	ИФА	РН
Тест Шапиро-Уилка		
W	0,75	0,70
Уровень значимости (p)	<0,0001	<0,0001
Пройден ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет
Тест Андерсон-Дарлинга		
A2	7,93	5,89
Уровень значимости (p)	<0,0001	<0,0001
Пройден ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет
Численность выборки	73	73

Так как распределение данных не является нормальным, для оценки связи между титрами в ИФА и РН использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Результаты представле-

ны в табл. 3. Корреляция показателей ОП (КП) и титра антител в ИФА с титрами ВНА проиллюстрирована на рис. 1, 2.

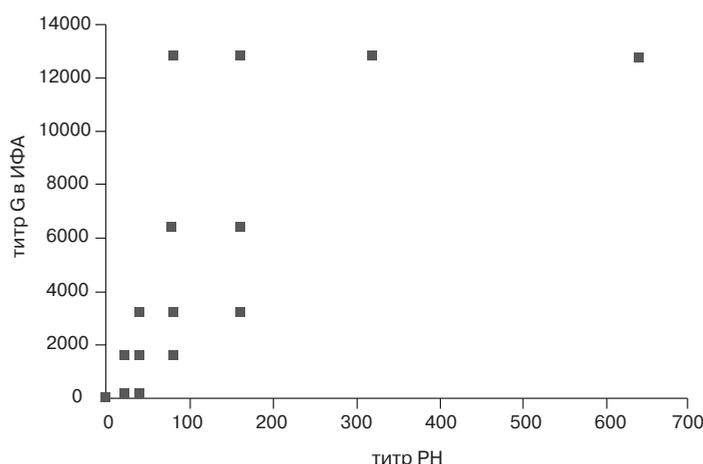


Рис. 1. Корреляция между титрами IgG и ВНА к SARS-CoV-2.

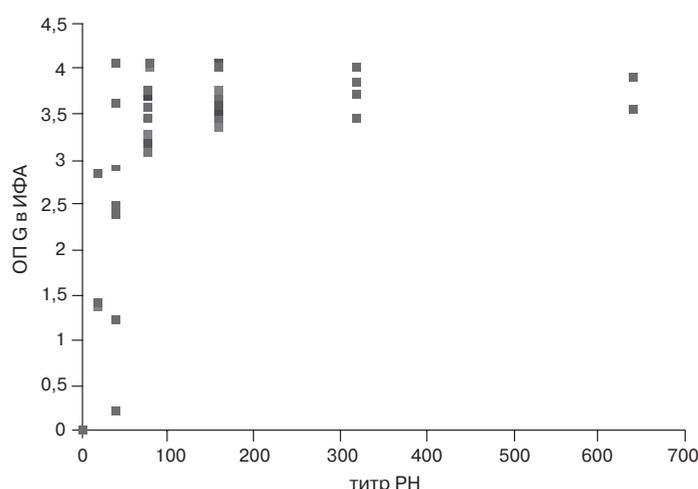


Рис. 2. Корреляция между ОП (КП) образцов, содержащих IgG и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

Таблица 3

Результаты корреляционного анализа методом Спирмена значений, полученных в ИФА и РН

Тест Спирмена	Титр в ИФА - титр в РН	ОП (КП) в ИФА - титр в РН
Коэффициент корреляции (r)	0,948	0,837
95% доверительный интервал	0,916-0,967	0,748-0,896
Уровень значимости (p)	< 0,0001	< 0,0001
Количество пар сравнения	73	73

Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,948 и 0,837 при уровне значимости $p < 0,0001$, что свидетельствует о статистически значимой корреляционной связи между титром IgG в ИФА и титром нейтрализующих антител, а также ОП (КП) в ИФА и титром нейтрализующих антител в плазме крови доноров.

При расчете чувствительности и специфичности тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора доноров антиковидной плазмы с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 (по критериям соответствующих титров антител, ОП (КП) и титров нейтрализующих антител)

рассматривали следующие параметры:

- Позитивный результат в ИФА - значение титра антител ≥ 1600 , ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)
- Негативный результат в ИФА - значение титра антител < 1600 и ОП $< 3,000$ (КП $< 9,6$)
- Позитивный результат в РН - значение титра нейтрализующих антител ≥ 80
- Негативный результат в РН - значение титра нейтрализующих антител < 80 .

Полученные аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" приведены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2 по критерию титра антител ≥ 1600

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 80	Негативный, < 80	
Позитивный, титр антител ≥ 1600	38	5	43
Негативный, титр антител < 1600	0	30	30
Всего	38	35	73
Чувствительность, %			100,0
Специфичность, %			85,7
Прогностическая ценность позитивного результата, %			88,4
Прогностическая ценность негативного результата, %			87,5

Таблица 5

Аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2 по критерию ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 80	Негативный, < 80	
Позитивный, ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)	38	3	41
Негативный, ОП $< 3,000$ (КП $< 9,6$)	0	32	32
Всего	38	35	73
Чувствительность, %			100
Специфичность, %			91,4
Прогностическая ценность позитивного результата, %			92,7
Прогностическая ценность негативного результата, %			92,1

При расчете чувствительности и специфичности ИФА тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора доноров антиковидной плазмы с высокой активностью антител к SARS-CoV-2, по приведенным ниже критериям соответствующих титров антител, ОП (КП) и титров нейтрализующих антител, рассматривали следующие параметры:

Позитивный результат в ИФА - значение

титра антител ≥ 3200 и ОП $\geq 3,300$ (КП $\geq 10,6$)

– Негативный результат в ИФА - значение титра антител < 3200 и ОП $< 3,300$ (КП $< 10,6$)

– Позитивный результат в РН - значение титра нейтрализующих антител ≥ 160

– Негативный результат в РН - значение титра нейтрализующих антител < 160 .

В табл. 6 и 7 приведены полученные аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)".

Таблица 6

Аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора плазмы крови с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 по критерию титра антител ≥ 3200

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 160	Негативный, < 160	
Позитивный, титр антител ≥ 3200	22	12	34
Негативный, титр антител < 3200	0	39	39
Всего	22	51	73
Чувствительность, %			100,0
Специфичность, %			76,5
Прогностическая ценность позитивного результата, %			64,7
Прогностическая ценность негативного результата, %			81,0

Аналитические характеристики "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" для отбора плазм крови с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 по критерию ОП $\geq 3,300$ (КП $\geq 10,6$)

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 160	Негативный, < 160	
Позитивный, ОП $\geq 3,300$ (КП $\geq 10,6$)	22	13	35
Негативный, ОП $< 3,300$ (КП $< 10,6$)	0	38	38
Всего	22	51	73
Чувствительность, %			100
Специфичность, %			74,5
Прогностическая ценность позитивного результата, %			62,9
Прогностическая ценность негативного результата, %			79,7

В ходе исследования продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)", что позволяет эффективно выявлять высокие уровни ВНА к SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови человека.

В тест-системе "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" концентрация антител класса G к вирусу SARS-CoV-2 выражена в единицах связывания (BAU/ml)/(ЕдС/мл) относительно Первого международного стандарта ВОЗ по

иммуноглобулину, содержащему антитела к SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/136 ("WHO International Standard First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136"). Для этой тест-системы была установлена концентрация антител к RBD-домену Spike-белка, соответствующая ВНА в титре $\geq 1/160$.

Результаты для тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" представлены в таблицах 8-9.

Таблица 8

Результаты исследования нормальности распределения значений в выборках по данным ИФА и РН

Тест Шапиро-Уилка	ИФА	РН
W	0,92	0,70
Уровень значимости (p)	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Прошел ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет

Так как распределение данных не является нормальным, для оценки связи между концентрацией антител (сЕд/мл) в ИФА и РН использовали коэффициент ранговой корреляции

Спирмена. Результаты представлены в табл. 9. Корреляция показателей концентрации IgG, сЕд/мл в ИФА с титрами ВНА проиллюстрирована на рис. 3.

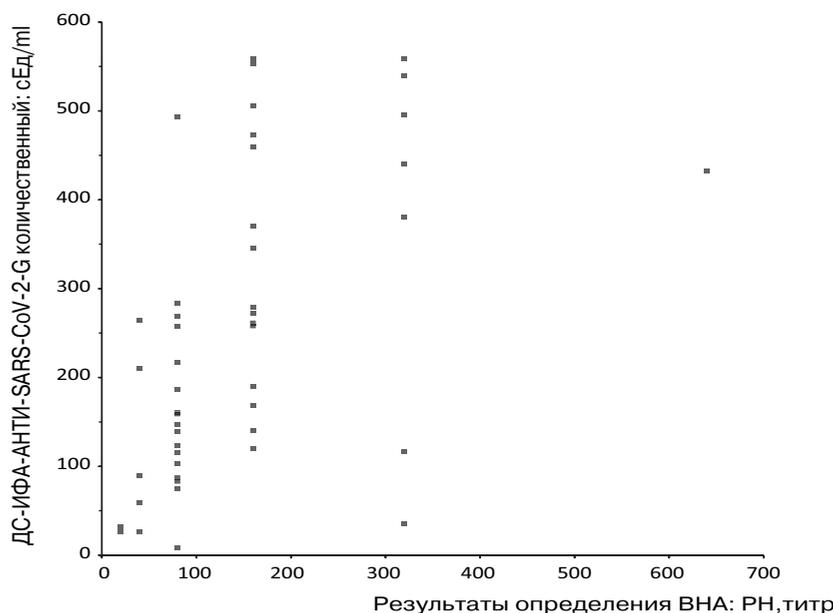


Рис. 3. Корреляция между концентрацией IgG, сЕд/мл в ИФА и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

Результаты корреляционного анализа методом Спирмена значений, полученных в ИФА и РН

Тест Спирмена	Концентрации IgG, сЕд/мл в ИФА - титр в РН
Коэффициент корреляции (r)	0,854
95% доверительный интервал	0,751-0,917
Уровень значимости (p)	< 0,0001
Количество пар сравнения	73

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании по оценке корреляционной зависимости между результатами исследований образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших инфекцию COVID-19, проведенных методом ИФА и в РН, была выявлена значимая корреляция между титрами/концентрацией антител в тест-системах "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)", "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный"

и ВНА. Титры антител в ИФА положительно коррелируют с титрами ВНА и ОП образца. Для эффективного отбора образцов антиковидной плазмы, содержащей ВНА в титрах $\geq 1/80$ и $\geq 1/160$ с использованием тест-систем "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" и "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" установлены критерии значений ОП (КП), титров и концентрации специфических IgG (табл. 10).

Таблица 10

Соответствие значений ОП (КП) и титров антител в ИФА титрам ВНА

Титр ВНА в РН	Значение ОП в ИФА	Значение КП в ИФА	Титр антител в ИФА	Концентрация IgG, ЕдС/мл
$\geq 1/80$	$\geq 3,000$	>9,6	$\geq 1/1600$	
$\geq 1/160$	$\geq 3,300$	>10,6	$\geq 1/3200$	≥ 150

Для тест-системы "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный" концентрация антител класса G, соответствующая ВНА в титре $\geq 1/160$ составляет ≥ 150 ЕдС/мл.

Продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности тест-системы

"ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)" производства ООО "НПО "Диагностические системы" при тестировании образцов биологического материала от потенциальных доноров гипериммунной плазмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2. Временные рекомендации ВОЗ от 11 сентября 2020 г. <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/2020/diagnostic-testing-for-sars-cov-2-interim-guidance,-11-september-2020>
2. Grigoryan L., Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin Immunol.* 2020 Aug; 50:101422
3. Sholukh A.M., Fiore-Gartland A., Ford E.S., Hou Y., Tse L.V., Lempp F.A. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralization assays for antibody monitoring in natural infection and vaccine trials. *medRxiv.* 2020 Dec 8; 2020. 12.07.20245431. doi: 10.1101/2020.12.07.20245431.Preprint
4. Flehmig B., Schindler M., Ruetalo N., Businger R., Bayer M., Haage A. et al. Persisting neutralizing activity to SARS-CoV-2 over months in sera of COVID-19 patients. *Viruses.* 2020 Nov 27;12(12):1357. doi: 10.3390/v12121357
5. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Tondeur L., Huon C. 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.* 2020 Sep 2; 12(559):eabc3103. doi: 10.1126/scitranslmed.abc3103. Epub 2020 Aug 17.
6. Luchsinger L.L. Ransegnola B., Jin D., Muecksch F., Weisblum Y., Bao W., et al. Serological analysis of New York City COVID19 convalescent plasma donors. *medRxiv* 2020 Jun 9: 2020. 06.08.20124792. doi: 10.1101 /2020. 06.08.20124792. Preprint.

7. Padoan A., Bonfante F., Pagliari M., Bortolami A., Negrini D., Zuin S, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine*. 2020 Dec;62:103101. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103101. Epub 2020 Nov 4.

8. Emergency Use Authorization (EUA) for the emergency use of COVID-19 convalescent plasma for the treatment of hospitalized patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), pursuant to Section 564 of the Act.3, August 23, 2020, the Food and Drug Administration (FDA) <https://www.clinicaltrials.gov/>

9. Материалы 36-го Конгресса Международного общества переливания крови (ISBT) от 16.12.2020.

10. Временные методические рекомендации министерства здравоохранения РФ "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 13.1 от 09.11.2021 г. - 235 с.

11. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. <http://docs.cntd.ru/document/120007256>

Тест-системы для выявления антител к коронавирусу SARS-CoV-2 производства ООО "НПО "Диагностические системы"

Наименование тест-системы краткое описание	Каталожный номер	Количество анализов	Срок годности
ДС-ИФА-Анти-SARS-CoV-2 Тест-система иммуноферментная для выявления антител к коронавирусу SARS-CoV-2 (COVID-19) методом иммуноферментного анализа <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2372	96	12 месяцев
ДС-ИФА-Анти-SARS-CoV-2 (S) Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к spike-белку коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19) методом иммуноферментного анализа <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2442	96	12 месяцев
ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-M Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса M (IgM) к коронавирусу SARS-CoV-2 (COVID-19) методом иммуноферментного анализа <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2412 S - 2414	96 480	12 месяцев
ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-СУММАРНЫЕ АНТИТЕЛА Тест-система иммуноферментная для выявления суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2 (COVID-19) методом иммуноферментного анализа <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2422	96	12 месяцев
ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-СПЕКТР Тест-система иммуноферментная для выявления спектра антител классов G, M и A к коронавирусу SARS-CoV-2 (COVID-19) методом иммуноферментного анализа <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2432	48	12 месяцев
ДС-ИФА-АНТИ-Анти-SARS-CoV-2-G-количественный Тест-система иммуноферментная для качественного и количественного определения антител класса G к SARS-CoV-2 <i>Подходит для ручной постановки и постановки на автоматических анализаторах</i>	S - 2562	96	12 месяцев

Новая коронавирусная инфекция COVID-19: актуальные вопросы в научных и практических аспектах

Михайлова Ю.В., Шальнова Е.Е., Кувшинов М.В.

Особенности развития гуморального иммунного ответа на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2

ООО "НПО "Диагностические системы", г. Нижний Новгород

Возбудителем нового инфекционного заболевания COVID-19, ставшего причиной пандемии глобального масштаба, является коронавирус 2-го типа, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2). Лабораторная диагностика COVID-19 основывается на выявлении РНК SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Наряду с этим, выявление антител к SARS-CoV-2 с использованием различных иммунохимических методов имеет несомненное значение - вспомогательное для диагностики текущей инфекции и основное - для оценки специфического гуморального иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2. Известно, что иммунологическая память является основой стойкого иммунного ответа после инфекции или вакцинации. Длительность сохранения иммунологической памяти у лиц, перенесших COVID-19 в тяжелой и среднетяжелой форме, остается мало изученной. Оценка потенциального иммунитета против инфекции, вызванной SARS-CoV-2, имеет большое значение для разработки комплекса мер по повышению безопасности здоровья населения и преодолению экономических и социальных последствий пандемии COVID-19.

Значение детекции антител к отдельным антигенам SARS-CoV-2 для оценки иммунитета при COVID-19

Как известно, формирование гуморального иммунного ответа на инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2, (сероконверсия) может указывать на приобретенный иммунитет после встречи с вирусом, а антитела к рецептор-связывающему домену spike-белка SARS-CoV-2 (RBD-S) являются вируснейтрализующими. Некоторые иммунохимические тест-системы предназначены для детекции антител исключительно к нуклеокапсидному белку (N-белок) SARS-CoV-2, используемому в качестве антигена; однако

остается неизвестным, коррелирует ли такой гуморальный иммунный ответ с ответом к RBD-S белка вируса и формированием протективного иммунитета к COVID-19.

Для оценки значимости различных пептидов вируса в развитии иммунного ответа Kathleen M.M. et al. (2020) из онкологического центра им. М.Д. Андерсона при Техасском университете (шт. Хьюстон, США) разработали количественный ИФА-тест для обнаружения циркулирующих антител к вирусу с использованием рекомбинантных RBD-S- и N-белков SARS-CoV-2 в качестве антигенов. В рамках исследования были протестированы 138 образцов сыворотки крови от 30 пациентов с лабораторно подтвержденным (по результатам ОТ-ПЦР) диагнозом COVID-19. В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови от 464 здоровых лиц, не болевших COVID-19, собранные в период с июня 2017 г. по июнь 2020 г. [1].

Авторы сравнивали результаты тестирования образцов при помощи тест-системы на основе N-белка в качестве антигена с результатами, полученными при использовании RBD-S в качестве антигена. Серологическое тестирование продемонстрировало неоднородность в обнаружении циркулирующих антител против вирусных белков. Антитела к N-белку были обнаружены в 3,6% образцов сывороток крови здоровых лиц, собранных во время пандемии в 2020 г., в то время как антитела к RBD-S были обнаружены только в 1,9% этих же образцов. В целом, антитела против N-белка выявлялись гораздо чаще, чем к RBD-S. Полученные данные отражают высокую степень гомологии N-белка вируса SARS-CoV-2 и других коронавирусов, поскольку N-белок содержит ряд общих консервативных последовательностей. Количественное определение антител класса G (IgG) к двум различным белкам вируса показало среднюю степень корреляции (коэффициент корреляции Спирмена $r=0,5716$) (рис. 1).

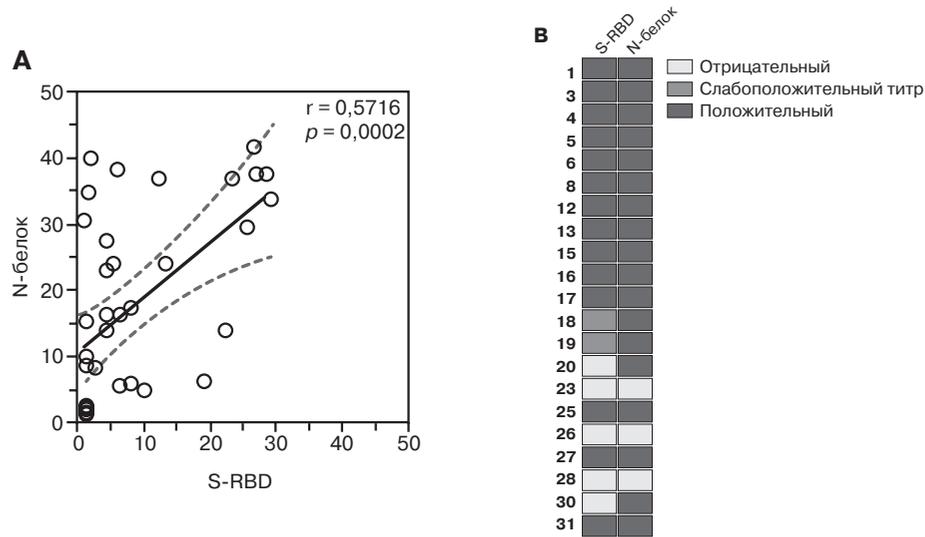


Рис. 1. Сероконверсия у пациентов с COVID-19 и клинические исходы [1].

Примечание. (А) Корреляция (коэффициент корреляции Спирмена (r) между содержанием антител к RBD-S и N-белков SARS-CoV-2 при исследовании последнего или единственного образца сыворотки крови пациентов (37 образцов сыворотки крови от 21 пациента с наличием анти-SARS-CoV-2).

(В) Результаты тестирования последнего или единственного образца сыворотки крови каждого пациента по отдельным белкам вируса.

Чтобы определить, является ли сероконверсия индикатором присутствия антител с нейтрализующей способностью, авторы измерили титры специфических IgG, которые способны блокировать проникновение в клетку псевдовируса везикулярного стоматита, экспрессирующего на своей поверхности S-белок SARS-CoV-2. В ходе исследования у 11 реконвалесцентов COVID-19 обнаружены нейтрализующие антитела к N-белку и RBD-S SARS-CoV-2.

При исследовании образцов сыворотки крови от здоровых лиц, собранных до пандемии COVID-19 (2017-2019 гг.) антитела к RBD-S SARS-CoV-2 не обнаружены, но в 1,6% случаев получен позитивный результат анализа для образцов, собранных в 2020 г. Антитела к N-белку SARS-CoV-2 выявлены примерно в 1% случаев при исследовании образцов от 2017-2019 гг. и в 3,57% образцов, собранных в 2020 г. Обнаружение антител к N-белку SARS-CoV-2 вируса не всегда коррелирует с присутствием нейтрализующих антител к RBD-S. Приблизительно в 86% случаев обнаруженные вируснейтрализующие антитела направлены против RBD-S-белка SARS-CoV-2, и только в 74% случаев - против N-белка вируса. Авторы данной работы предостерегают коллег от использования диагностикумов для определения антител только к одному N-белку при проведении массового серологического тестирования для оценки популяционного иммунитета к COVID-19, и рекомендуют определять антитела к RBD-домену S-белка вируса [1].

Дальнейшее изучение защитных свойств иммунитета при COVID-19 было направлено на исследование сроков формирования и кинетики специфических антител к SARS-CoV-2. Коллектив авторов из Университета Сетон-Холл, США (Manners C. et al., 2020) собрал и проанализировал литературные данные, касающиеся исследования кинетики антителообразования при инфицировании SARS-CoV-2, продолжительности и корреляции иммунного ответа по сравнению с развитием иммунологических реакций на другие коронавирусы. При изучении устойчивости иммунной защиты от повторного инфицирования SARS-CoV-2 исследователи провели сравнительный анализ с данными

предыдущих исследований, полученными для SARS-CoV, поскольку оба коронавируса имеют самое близкое генетическое сходство [2].

Так, исследование клинических образцов крови от 98 пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом (ТОРС/SARS, атипичная пневмония), вызванным коронавирусом SARS-CoV и от 75 пациентов, находящихся на стадии выздоровления (реконвалесцентов ТОРС), полученных во время вспышки 2002 года, позволило авторам (Mo H. et al., 2006, Китай) установить сроки циркуляции специфических антител. Было установлено, что IgG детектировались в период от 7 дня заболевания до 720 дня: титр IgG резко увеличился на 15-й день, достигнув пика на 60-й день, и оставался высоким до 180-го дня, а затем начал постепенно снижаться к 720-му дню. В образцах сыворотки крови от реконвалесцентов ТОРС были обнаружены вируснейтрализующие IgG, которые сохранялись у большинства пациентов до 720-го дня, при этом их титр к 720 дню снизился в 100 раз [3].

В другом исследовании было установлено, что у 56% пациентов, переболевших ТОРС, антитела к SARS-CoV выявлялись через три года после заражения (Wu L.P. et al., 2007). Полученные результаты позволили авторам данных работ предположить, что титр нейтрализующих антител, которые начинают появляться в крови в течение двух недель после инфицирования, коррелирует с продолжительностью иммунитета; после инфекции SARS-CoV высокий уровень этих антител может сохраняться до двух лет.

При проведении исследований по оценке гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 у пациентов с инфекцией COVID-19, специалисты из Китая Zhao J. et al. (2020) смогли обнаружить IgM и IgG к RBD-S вируса (анти-RBD (S)-антитела) на 14 день от начала заболевания - анти-RBD IgM у 73% и анти-RBD IgG у 54% участников исследования ($n=173$). У большинства пациентов сероконверсия IgM (94,3%) и IgG (79,8%) произошла в течение 15-39 дней после начала заболевания [4].

В рамках наблюдения за больными COVID-19 исследователи из Великобритании (Seow J. et al., 2020) изучали титры нейтрализующих антител в динамике (в течение трех месяцев после заражения). Исследовали образцы сыворотки крови от 65 человек с инфекцией COVID-19, подтвержденной ОТ-ПЦР, собранные последовательно в течение 94 дней после появления симптомов. Сероконверсия обнаружена в 95% случаев (детектированы IgM, IgA и IgG). Так, IgG к S-белку, RBD-S-белка и N-белку SARS-CoV-2 выявлены у 92,3%, 89,2% и 93,8% пациентов, соответственно. Частота положительных результатов при определении IgM была аналогична частоте выявления IgG - 92,3, 92,3 и 95,4% к S-, RBD-S- и N-белку соответственно. IgA к RBD-S- и N-белку вируса выявлены в 72,3 и 84,6% случаев, соответственно, а IgA к S-белку выявлялись с частотой аналогичной для IgM и IgG. У 3,1% обследованных пациентов не было выявлено антител ко всем трем антигенам вируса.

Одновременное определение IgG, IgA и IgM к S-, RBD-S- и N-белку вируса не позволило обнаружить

появление IgM и IgA к какому-либо определенному антигену вируса в более ранние сроки от начала заболевания (от появления первых симптомов). Динамическое наблюдение за изменениями процесса антителообразования в обследованной когорте продемонстрировало, что синхронная сероконверсия IgG, IgM и IgA наблюдалась в 51,6% случаев, при этом синхронная сероконверсия иммуноглобулинов всех трех классов к S-, RBD-S- и N-белкам наблюдалась в 58,1%. Сингулярная сероконверсия (отдельно по IgG, IgM и IgA) - составила по 9,7% для каждого класса иммуноглобулинов; при этом сингулярная сероконверсия к S- и N-белкам наблюдалась в 16,1% случаев. Титры IgM и IgA ко всем трем белкам вируса достигали максимальных показателей в период от 20 до 30 дня с момента появления симптомов, в последующем наблюдалось их снижение до недетектируемых значений к 60-ому дню заболевания, как и ожидалось, после завершения острой фазы инфекции (рис. 2). Напротив, титры IgG в большинстве случаев оставались высокими вплоть до 94 дня наблюдения.

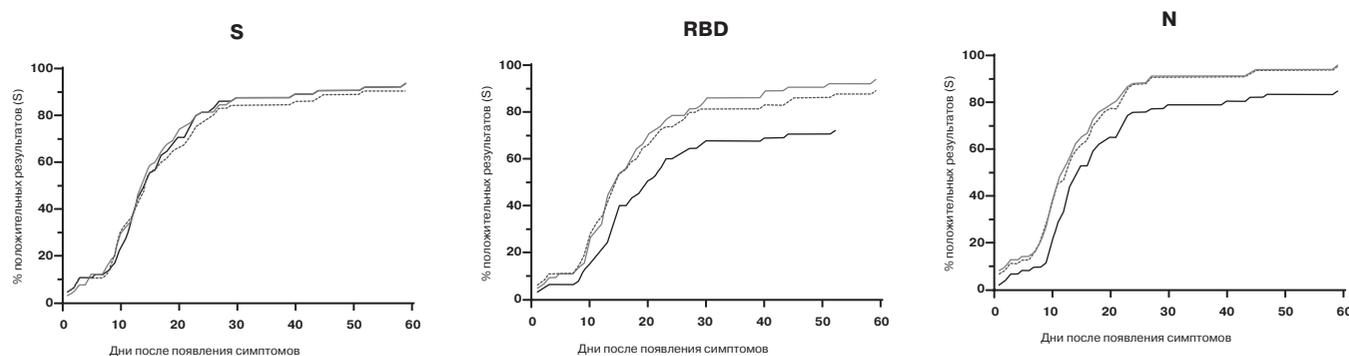


Рис. 2. Кинетика антител к антигенам SARS-CoV-2 в динамике [3].

Примечание. Процент положительных результатов на IgM, IgA или IgG к S-белку, RBD S-белка и N-белку вируса с момента появления симптомов (дни). Образец сыворотки считался положительным, если показатель ОП в четыре раза превышал фоновый уровень.

Способность выявляемых антител эффективно нейтрализовать SARS-CoV-2 авторы оценивали с использованием псевдовирусных частиц ВИЧ-1, экспрессирующих на своей поверхности белки коронавируса SARS-CoV-2, и рецепторов ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2/ACE2) на клеточной линии HeLa. Нейтрализующие антитела выявлялись уже через 8 дней после появления первых симптомов. Результаты данного исследования продемонстрировали, что кинетика реакции нейтрализующих антител типична для острой вирусной инфекции, снижение титров нейтрализующих антител наблюдается после начального пика, величина которого зависит от тяжести заболевания. Время до достижения пиковых значений титра нейтрализации (от 98 до 32 000) составило в среднем 23,1 дня. Исследование образцов сыворотки крови, собранных позднее 65 дня от появления симптомов, выявило снижение доли серопозитивных лиц с наличием нейтрализующих антител в высоком титре (более 2000) с 60,0 до 16,7%. Было показано, что в острый период болезни наибольшей нейтрализующей активностью

обладают специфические IgM и IgA направленные против RBD S-белка вируса. Авторы предположили, что тяжесть течения заболевания усиливает реактивность нейтрализующих антител, но не изменяет их кинетику. Исследование анти-SARS-CoV-2-позитивных образцов в динамике позволило более детально оценить кинетику и длительность реактивности нейтрализующих антител [5].

Коллектив авторов (Ripperger T.J. et al., 2020) из Университета штата Аризона (США) провел серологическое исследование для определения соотношения показателей гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2. Результаты исследования показали, что у людей, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19 в тяжелой форме (по сравнению с переболевшими в легкой форме) наблюдались повышенные титры вируснейтрализующих антител (ВНА) и выявлялись антитела к нуклеокапсиду (N) и рецептор-связывающему домену (RBD) spike (S)-белка. Возраст и пол пациентов не играли существенной роли. Во всех случаях, включая бессимптомные, сероконверсия наблюдалась

через 2 недели после получения положительных результатов ПЦР-исследования. Антитела к RBD и S2-субъединице S-белка и ВНА стабильно обнаруживались на протяжении 5-7 месяцев от начала заболевания, тогда как титры антител к N-белку постепенно снижались (рис.3) [6].

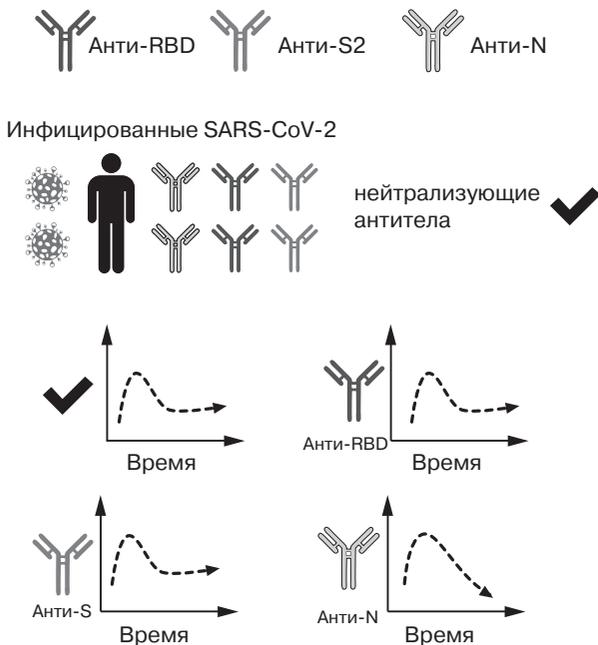


Рис. 3. Динамика антителообразования к отдельным антигенам SARS-CoV-2 [6].

Тестирование 5882 образцов выявило только 1 образец с серореактивностью как к RBD S-белка, так и к S2-субъединице S-белка, но с отсутствием нейтрализующей активности. Этот нюанс не мог быть обнаружен при использовании тестов для определения только антител к RBD S-белка, или только к S2-субъединице S-белка. На основании этого американские исследователи пришли к выводу о необходимости применения нескольких независимых серологических тестов для минимизации ложноположительных результатов и повышения точности результатов тестирования и проанализировали опубликованные ранее данные исследований других авторов [6].

Рассматривали возможность проведения ортогонального тестирования с использованием двух независимых тестов с разными антигенами в составе иммуносорбента. Так, Amanat F. et al. (2020, США) в своем исследовании после ИФА-теста для определения антител к RBD-S в качестве подтверждающего (иммунологического теста 2-ого уровня) использовали ИФА-тест, основанный на полном размере S-белка. Отмечено, что применение иммунологических тестов 2-ого уровня повышает чувствительность анализа и является вполне обоснованным, в первую очередь, в популяциях с высоким уровнем серопревалентности к SARS-CoV-2, а RBD является структурным доменом S-белка вируса SARS-CoV-2 и не отличается от него в антигенном отношении. На основании вышеизложенного авторы предположили, что ложноположительный результат тестирования на антитела к RBD с большой до-

лей вероятности может быть получен и в ИФА-тесте, основанном на S-белке вируса. Поэтому авторы сначала проверили возможность использования в качестве подтверждающего теста количественное определение уровня антител к нуклеокапсиду, принимая во внимание тот факт, что ряд производителей коммерческих серологических тест-систем используют именно N-белок, иммобилизованный на планшетах (Bryan A. et al., 2020; Burbelo P.D. et al., 2020).

Далее исследователи проанализировали антителы к N-антигену по сравнению с ответом к RBD, используя при проведении валидации образцы сыворотки крови от здоровых лиц, собранные до 2019 г. (до начала циркуляции SARS-CoV-2). Реактивность антител (сила сигнала в анализе) к N-белку SARS-CoV-2 была значительно ниже, чем к RBD. Более того, пять образцов от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 показали очень слабую реактивность антител к N-белку на уровне отрицательного контроля. Авторы сделали вывод о низкой эффективности использования N-белка в качестве антигена и продолжили исследование с использованием в качестве антигенной мишени S2-субъединицы S-белка для подтверждения серопозитивности. Расположение RBD на S1-субъединице S-белка делает S2-субъединицу S-белка антигенно отличающейся (Bosch B.J. et al., 2003; Li F., 2016; Wrapp D. et al., 2020).

Установлена сильная корреляция между титром IgG к S2-субъединице S-белка вируса и уровнем нейтрализующих антител, что согласуется с литературными данными о существовании S2-специфических ВНА (расшифровка уже была выше) к SARS-CoV и SARS-CoV-2 (Duan J. et al., 2005; Song E. et al., 2020).

Тестирование 272 образцов сыворотки крови из контрольной группы показало, что реактивность отрицательных образцов против RBD и S2 практически не имела перекрестных результатов, образцы с высоким сигналом в ИФА для одного антигена редко показывали аналогичный фон для другого. Исходя из полученных в ходе исследования данных, авторы приняли решение использовать комбинированное выявление антител к RBD- и S2-субъединице S-белка в качестве точного показателя перенесенной ранее инфекции COVID-19.

При помощи усовершенствованного ИФА-теста на основе комбинации из RBD- и S2- S-белка в составе иммуносорбента (для исключения ложноположительных результатов) исследователи повторно протестировали 5882 исходных образца. Из 13 образцов, не содержащих ВНА, но показавших высокую реактивность к RBD, в 12 из них оказались неактивными к S2-S-белка. Напротив, остальные 60 образцов с наличием нейтрализующих антител к RBD продемонстрировали высокую реактивность и к S2-S-белка. Пять из 9 образцов с реактивностью к RBD-S-белка ниже порогового значения, но при этом сохраняли вируснейтрализующую способность, показали высокие значения уровня антител к S2-субъединице S-белка.

Полученные данные показывают, что включение в алгоритм исследования на наличие антител к вирусу SARS-CoV-2 подтверждающего тестирования с использованием S2-S-белка в составе ИФА-теста значительно увеличивает предсказательную ценность положительного результата серологического анализа на территориях с низкой серопревалентностью к SARS-CoV-2.

Кроме того, авторами установлена корреляция между тяжестью заболевания и титром специфических IgG к RBD-S и N-белку вируса. Уровень ВНА также был выше у переболевших COVID-19 в тяжелой форме по сравнению с теми, кто перенес инфекцию в легкой форме.

Учитывая данные ряда других исследований (Ibarrondo F.J. et al., 2020; Long QX. et al., 2020; Seow J. et al., 2020) о быстром снижении титра специфических антител у реконвалесцентов COVID-19, перенесших заболевание в легкой форме, Ripperger T.J. et al. (2020) оценивали длительность сохранения антител к отдельным антигенам SARS-CoV-2 и динамику иммунного ответа. Срок наблюдения составил 226 дней от начала заболевания.

Сравнительный анализ титров IgG к RBD-S, S2-субъединице S-белка и N-белку вируса показал вариабельность реактивности антител с течением времени. Титры специфических IgG к N-белку снижались на более ранних сроках от начала заболевания, по сравнению с реактивностью к RBD- и S2-субъединице S-белка. У 40% пациентов специфические антитела к N-белку SARS-CoV-2 снизились до недетектируемого уровня в течение первых 2-3 месяцев заболевания. Установлено также, что длительная персистенция ВНА в крови реконвалесцентов COVID-19 (в течение 5-7 месяцев после инфицирования) характерна в основном для нейтрализующих антител к RBD- и S2- S-белка вируса.

На основании полученных данных авторы предостерегают от использования тестов для определения антител только к N-белку SARS-CoV-2 для оценки иммунитета у отдельных индивидуумов или уровня серопревалентности в популяционных исследованиях. В то же время в исследовании подчеркивается тот факт, использование нескольких независимых серологических тестов позволяет повысить точность определения антител в популяциях с низким уровнем серопревалентности к SARS-CoV-2 и выявить различия в кинетике антител к отдельным антигенам вируса [6].

Аналогичные исследования были выполнены коллективом американских специалистов (Wajnberg A. et al.) медицинского центра "Mount Sinai" (Нью-Йорк, США) в 2020 г. проводивших скрининговое тестирование на наличие антител к SARS-CoV-2 в рамках набора добровольцев в качестве потенциальных доноров антиковидной плазмы крови для лечения больных COVID-19. Авторы использовали собственный ИФА-тест "Mount Sinai ELISA", предназначенный для выявления антител к S-белку SARS-CoV-2, чувствительность которого составила 92,5%, специфичность - 100%, положительная прогностическая ценность - 100% и отрицательная прогностическая ценность - 99,6%. В исследовании приняли участие 72401 человек, из которых у 30082 человек выявлены антитела к S-белку вируса в титре 1:80 и выше. В ИФА-тесте "Mount Sinai ELISA" были получены дискретные значения титров антител - 1:80, 1:160, 1:320, 1:960 или $\geq 1:2880$. Титры 1:80 и 1:160 были отнесены к категории "низких", 1:320 - "умеренных", а 1:960 и $\geq 1:2880$ - "высоких". Из 30082 положительных образцов в 690 (2,29%) случаях титр антител составил 1:80; в 1453 (4,83%) - 1:160; в 6765 (22,49%) - 1:320; в 9564 (31,79%) - 1:960; и в 11 610 (38,60%) образцах - $\geq 1:2880$ (рис. 4). Таким образом, в абсолютном большинстве образцов обнаружены антитела в умеренных и высоких титрах.

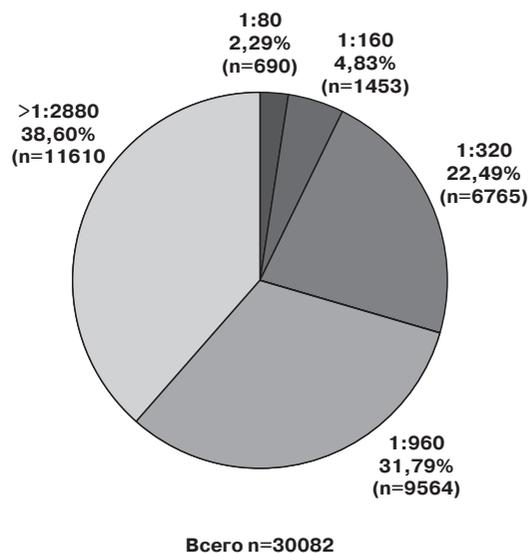


Рис. 4. Распределение образцов с различными титрами антител к S-белку SARS-CoV-2 [7].

Устойчивый ответ IgG к S-белку вируса наблюдался на протяжении, по меньшей мере, 5 месяцев после перенесенной инфекции. Авторы изучали стабильность титров антител к S-белку SARS-CoV-2 у 121 донора плазмы - образцы для исследования собирали трижды на 30, 82 и 148 день после появления симптомов. В соответствии с более ранними наблюдениями авторов о том, что сероконверсия в легких случаях COVID-19 может занять больше времени для развития, в данном исследовании также отмечено первоначальное увеличение титров у лиц с исходным титром 1:320, 1:160 или 1:80 с 30-го по 82-й день наблюдения с последующим снижением титра антител. Титры в этих группах снизились примерно до уровня 30-го дня только на 148-й день. У большинства обследованных лиц с изначально высоким титром антител ($\geq 1:2880$ и 1:960) происходило плавное снижение титра антител в крови к 148 дню исследования.

Кроме того, было показано, что титры антител к S-белку в значительной степени коррелируют с титрами нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 дикого типа. Если рассматривать любую нейтрализующую активность выше фонового уровня, установленного для анализа микронейтрализации для количественного определения нейтрализующих антител, то по результатам данного исследования было обнаружено, что нейтрализующей активностью обладают примерно 50% сывороток с титрами антител в диапазоне 1:80 - 1:160, в 90% случаев - с титрами 1:320 и все сыворотки с титрами антител в диапазоне от 1:960 до $\geq 1:2880$. По результатам исследования авторы пришли к выводу, что у подавляющего большинства (более 90%) людей, перенесших инфекцию COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме, образуются нейтрализующие антитела в детектируемых количествах [7].

Исследователи Unanue L. et al. (2021) из Университетской больницы Сан-Себастьян (Доностия), Испания изучали особенности развития гуморального иммунного ответа

к SARS-CoV-2 у пациентов, переболевших COVID-19 в среднетяжелой и тяжелой форме. В исследование были включены 266 пациентов больницы, перенесших пневмонию в среднетяжелой/тяжелой степени тяжести и получивших стационарное лечение. У этих пациентов дважды в течение первых 8 месяцев после болезни проводили лабораторное исследование крови на наличие антител к SARS-CoV-2. На сроке 4 месяцев после выписки из стационара у 158 пациентов (59,4%) были обнаружены IgG и IgM, у 97 пациентов (36,5%) - только IgG, у 1 пациента (0,3%) - только IgM, в 2- случаях (0,7%) результаты исследований были неопределенными, и у 8 пациентов (3%) - отрицательными. Было показано, что среди 8 пациентов с отрицательным результатом анализа на антитела к вирусу 5 человек оказались иммунокомпрометированными больными, у остальных - инфекция протекала в легкой форме, и они были госпитализированы в стационар по другим причинам. Спустя 8 месяцев после перенесенной инфекции отмечено снижение доли серопозитивных лиц в обследованной когорте. Антитела класса G были обнаружены только у 153 пациентов (63,5%), IgG и IgM - у 84 пациентов (34,9%), в 1-м случае результат серологического теста на IgG (0,4%) оказался неопределенным, а в 2-х случаях (0,8%) - отрицательным (антитела не обнаружены).

Результаты исследования показали, что у значительной доли пациентов, переболевших COVID-19 в среднетяжелой и тяжелой форме, в течение 8 месяцев после болезни наблюдается персистенция антител. После перенесенной инфекции антитела не обнаруживаются лишь у небольшого процента пациентов, среди которых большую долю составляют иммунокомпрометированные лица [8].

Группа авторов из Германии Flehmig B. et al. в ноябре 2020 г. опубликовала результаты продольного исследования по оценке нейтрализующей активности антител к SARS-CoV-2, персистирующих в крови людей, переболевших COVID-19. В ходе исследования авторы изучали взаимосвязь между вирусной нагрузкой SARS-CoV-2, определенной методом ПЦР при исследовании назофарингеальных мазков, титрами антител IgA и IgG к RBD S-белка и N-белку, и вируснейтрализующей активностью антител к SARS-CoV-2, определенной при исследовании серологических образцов от пациентов, перенесших COVID-19 в среднетяжелой форме. Все пациенты в течение 6 месяцев получали курс медикаментозной терапии от COVID-19 в амбулаторных условиях. Наблюдалось снижение вирусной нагрузки до неопределяемого уровня спустя примерно 4 недели после постановки диагноза. Уровень IgA к RBD S-белка и, в меньшей степени, к N-белку достиг максимума через 3 недели от начала заболевания, после чего наблюдалось быстрое снижение уровня антител. Что касается динамики IgG, то на первых неделях заболевания отмечен рост уровня этих антител с выходом на плато примерно через 6 недель от начала заболевания. Высокие уровни специфических IgG обнаруживались в течение всего периода наблюдения. Максимальные значения вируснейтрализующей активности антител зарегистрированы в среднем на 4 неделе заболевания, после чего наблюдалось медленное снижение её показателей.

Авторами был сделан вывод о том, что установленная в исследовании взаимосвязь между вируснейтрализующей активностью антителам и серологическими показателями

гуморального иммунного ответа предполагает наличие протективного иммунитета даже у пациентов, перенесших COVID-19 в легкой клинической форме [9].

К настоящему времени в научной литературе представлены также публикации российских авторов, проводивших исследования в данном направлении.

В работе Черкасовой М.В. с соавт. (2021) оценивали результаты определения антител к SARS-CoV-2 с использованием наборов реагентов разных производителей ("ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-IgG" и "ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-IgM" (ООО НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород, Россия), "SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ" и "SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск, Россия) и иммунохроматографический экспресс-тест для детекции IgG/IgM к коронавирусу 2019-nCoV (KHP)), полученных при исследовании 268 образцов крови с неизвестным уровнем IgG и IgM к SARS-CoV-2. Сопоставление результатов выполняли с использованием описательной статистики и корреляционного анализа, значимым считали отличие при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты исследований представлены в виде медианы, 25-75 перцентиля (Me (IP)).

Частота выявления IgG в обследуемой когорте составила 85% при использовании набора реагентов производства "НПО "Диагностические системы" при уровне Me(IP) 10,85 [5,1; 12,9], 83% - при использовании теста "Вектор-Бест" при уровне 14,15 [8,65; 15,8] и 53% - экспресс-теста. Положительные результаты определения IgM были выявлены в 3,6% ("Диагностические системы", уровень 1,6 [1,1; 4,7]), в 28% ("Вектор-Бест", уровень 3,3 [1,8; 6,0]), в 13% (экспресс-тест). В ходе исследования была выявлена значимая положительная корреляция между результатами определения IgG, полученными при использовании наборов реагентов "Диагностические системы" и "Вектор-Бест" ($r=0,861$; $p < 0,01$). Значимых корреляций между результатами определения IgM разными наборами реагентов не выявлено. Результаты проведенного исследования позволили авторам данной работы сделать вывод о сопоставимости результатов определения IgG к SARS-CoV-2, полученных при использовании тест-систем производства "НПО "Диагностические системы" и "Вектор-Бест", что подтверждается значимой положительной корреляцией [10].

Научный коллектив НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва (Шустов В.В. с соавт., 2021) провел исследование по оценке динамики напряженности специфического постинфекционного иммунитета к SARS-CoV-2 в течение 8 месяцев после клинического выздоровления. На наличие IgG к SARS-CoV-2 были исследованы серологические образцы 100 пациентов, перенесших COVID-19 (средний возраст $44,2 \pm 11,2$; доля женщин - 58%); исследование проводили с использованием системы на основе ИХЛА. Авторы установили достоверное снижение уровня IgG более, чем в 2 раза (с $88,6 \pm 44,5$ Ед/мл; $p < 0,05$ до $34,0 \pm 27,1$ Ед/мл; $p < 0,05$) у большинства пациентов через 8 месяцев с момента выздоровления. У 6% (6 человек) уровень антител опустился ниже порогового значения, заявленного в используемом тесте (на момент выздоровления уровень IgG у этих пациентов не превышал 50 Ед/мл).

По результатам анализа полученных данных авторами был сделан вывод о том, что у пациентов с титром антител ниже 50 Ед/мл IgG могут не выявляться через 8 месяцев после выздоровления [11].

Результаты проведенных многочисленных исследований имеют большое значение при выборе широко распространенных серологических тестов для детекции антител и определения уровня антителообразования с целью оценки иммунного ответа к SARS-CoV-2 и эффективности защиты от повторного заражения SARS-CoV-2. Так, в крови пациентов с COVID-19 были обнаружены В-клетки памяти, экспрессирующие IgG к S- и RBD-S, которые могут быть активированы для быстрой продукции нейтрализующих антител при повторном проникновении в организм SARS-CoV-2, в целях предотвращения реинфекции. Это позволяет предположить, что для обеспечения долговременной защиты от новой коронавирусной инфекции потребуется применение бустерных доз вакцин в будущем.

Изучение гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 в различных популяционных группах

Gudbjartsson D.F. et al. (2020) из Исландии провели исследование по оценке популяционного иммунитета к COVID-19 и определению серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения страны. Авторы работы исследовали образцы сыворотки крови от 30 576 жителей Исландии на наличие антител к SARS-CoV-2 - при помощи шести различных тестов определяли антитела к SARS-CoV-2: суммарные Ig (M, G и A) к N-белку вируса определяли при помощи теста производства "Roche"; суммарные антитела к RBD S1-субъединицы S-белка (анти-S1-RBD) ("Wantai"); IgM и IgG к N-белку ("EDI/Eagle"); и IgG и IgA к S1-S-белка (IgG анти-S1 и IgA анти-S1) ("Euroimmun"). Позитивным считался образец, положительный в обоих тестах на суммарные антитела [12].

В ходе исследования на наличие антител к SARS-CoV-2 протестировали 2102 образцов сыворотки крови от 1237 пациентов с COVID-19, подтвержденной положительным результатом ПЦР-тестирования, собранных на разных сроках (до 4 месяцев) после постановки диагноза, от 4222 контактных по COVID-19 и от 23452 человек с неизвестным анамнезом (данные о возможном инфицировании отсутствовали).

В результате проведенного исследования антитела к SARS-CoV-2 были обнаружены у 91,1% реконвалесцентов COVID-19 (1107 человек из 1215 обследованных). У этих лиц отмечено нарастание титров специфических антител в течение 2 месяцев после постановки диагноза; уровень этих антител (по результатам обоих тестов на суммарные антитела) оставался на плато до конца исследования. Частота обнаружения антител к SARS-CoV-2 среди контактных лиц составила 2,3% и 0,3% среди лиц с неизвестным анамнезом по COVID-19.

По оценкам авторов уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди исландцев составил 0,9%, а смертности от этой инфекции - 0,3%. Кроме того, антитела к SARS-CoV-2 обнаружены только у 56% лиц с ПЦР-подтвержденной инфекцией COVID-19, у 14% контактных, помещенных в карантин (ПЦР-тестирование либо не проводилось, либо получен отрицательный результат) и у 30% лиц с бессимптомной инфекцией [12].

Ранний гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 в когорте больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19 описан коллективом исследователей из Китая (Long Q.X. et al., 2020). В ходе исследования по оценке потенциальных возможностей использования тестов на антитела к SARS-CoV-2 были лабораторно обследованы 54 пациента с подозрением на COVID-19 и 64 контактных лица.

Сероконверсия IgG и IgM нарастала постепенно и параллельно с развитием клинических симптомов заболевания. Средние сроки появления специфических антител к SARS-CoV-2 составили 13 дней от момента появления симптомов, максимальных значений титры антител (как IgG, так и IgM) достигли в течение 6 дней после сероконверсии. В целом, специфические IgG были детектированы у 100% пациентов через 17-19 дней после появления симптомов инфекции, в то время как IgM были выявлены у 94,1% обследованных лиц только через 20-22 дня от начала заболевания. Более высокие титры специфических антител выявляли у пациентов, переболевших COVID-19 в тяжелой форме ($p=0,001$).

Обследование лиц с подозрением на COVID-19 при наличии отрицательных результатов ПЦР-теста показало, что у 7,7% из них обнаруживались специфические антитела к SARS-CoV-2 в разном титре. Среди контактных лиц с бессимптомным течением инфекции в 4,3% случаев результат ПЦР-теста оказался отрицательным; диагноз у этих лиц был подтвержден положительными результатами серологического тестирования (7 из 162 PHK-отрицательных образцов).

Авторы пришли к выводу, что применение серологических тестов может оказаться полезным для определения антител у лиц с подозрением на COVID-19 при наличии отрицательных результатов ПЦР-теста. Лабораторное исследование на наличие в крови IgM к SARS-CoV-2 позволяет судить о текущей или недавно перенесенной инфекции, а по наличию и уровню IgG в можно судить о факте инфицирования в прошлом и определить наличие специфического иммунного ответа [13].

Наиболее уязвимой профессиональной группой по наличию высокого риска заражения COVID-19 являются медицинские работники как звено, первично реагирующее на возникновение инфекции. Вопросы иммунологической защищенности и мониторинг состояния здоровья медицинских работников представляют особый интерес в условиях пандемии.

Состояние гуморального иммунитета в группе повышенного риска инфицирования было изучено Сизовой Е.П. с соавт. (2021). Для проведения исследования были отобраны 345 медицинских работников различных специальностей, которые могли контактировать с пациентами с диагнозом новой коронавирусной инфекции, и 72 человека, составившие группу сравнения (инженеры, IT-персонал, бухгалтеры), не работающие в больницах. У испытуемых с применением ИФА тест-систем отечественного производства исследовали уровень IgG к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2. Наличие антител оценивали по уровню индекса позитивности (ИП), представляющего собой отношение оптической плотности образца к пороговому значению методики.

Результаты исследования показали, что средний уровень ИП у медицинских работников был достоверно выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). У медицинских сестер наличие антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 выявлялось достоверно чаще, чем среди врачей ($42,2 \pm 3,6\%$ против $31,0 \pm 3,7\%$, $p < 0,05$) и в группе сравнения ($42,2 \pm 3,6\%$ против $27,8 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$). Кроме того, у медсестер отмечались более высокие значения ИП по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$).

По мнению авторов, полученные результаты указывают на высокую распространенность диагностически значимого ИП, а более высокие уровни ИП у медсестер по сравнению с врачами и группой сравнения, вероятно, являются результатом длительного контакта с пациентами с COVID-19. Наличие IgG у $37,1 \pm 2,6\%$ медицинских работников может быть следствием как перенесенной инфекции, так и бессимптомного носительства, что требует дальнейшего изучения. Однако, авторы считают, что в текущей эпидемической ситуации обнаружение антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 можно использовать для реализации профилактических стратегий среди медицинских работников [14].

Другое исследование по оценке гуморального ответа на SARS-CoV-2 у медицинских работников проведено исследователями из Казани (Россия). Исаева Г.Ш. с соавт. (2020) исследовали образцы сыворотки крови от 348 медицинских работников из 10 медицинских организаций г. Казани. Все лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) были стратифицированы на три группы в зависимости от риска инфицирования: к 1 группе отнесены ЛПУ с предполагаемым "высоким риском инфицирования" (перепрофилированные многопрофильные стационары для оказания медицинской помощи больным с COVID-19); к 2 группе (с предполагаемым "умеренным риском") - станция скорой помощи и территориальная поликлиника; к 3 группе (с предполагаемым "низким риском") - специализированная диагностическая поликлиника.

На момент исследования и за последующие 3 мес. у обследованных медицинских работников симптомы ОРВИ отсутствовали, а результаты исследований мазков из носоглотки на наличие РНК SARS-CoV-2 были отрицательными.

Определение IgG проводили при помощи отечественной ИФА-тест-системы. Серопревалентность по IgG к вирусу SARS-CoV-2 для различных медучреждений г. Казани варьировала в пределах $6,1-23,3\%$ и в среднем составила $16,4\%$: в первой группе - $3,3-30,3\%$ (средняя $16,4\%$), во второй группе - $15,0-27,5\%$ (средняя - $23,3\%$), в третьей группе - $6,1\%$. По мнению авторов, широкое варьирование уровня серопревалентности в группах медицинских работников разных ЛПУ может свидетельствовать о разном уровне интенсивности профессиональных контактов и эффективности противоэпидемических мероприятий в этих учреждениях. Исследователи отметили, что несмотря на большую вероятность контакта медицинских работников с больными SARS-CoV-2, связанного с выполнением профессиональных обязанностей, и ожидаемое превышение показателей серопревалентности в когорте медицинских работников в сравнении с популяцией жителей Республики Татарстан, величина серопозитивности в группе медицинских работников в целом коррелировала с уровнем популяционного иммунитета в регионе ($31,1\%$).

Авторы подчеркнули, что наличие среди медицинских работников высокой доли серопозитивных лиц, перенёвших бессимптомную форму SARS-CoV-2-инфекции, подтверждает высокую интенсивность скрыто протекающего эпидемического процесса, что необходимо учитывать при организации профилактических мероприятий, в том числе вакцинации [15].

Аналогичные исследование проведены Barrufet P. et al. (Каталония, Испания, 2021) с использованием теста на основе иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА-теста). Проведено лабораторное обследование медицинских работников ($n=1894$) через 4 месяца после первой волны COVID-19 (октябрь 2020). Уровень серопревалентности составил $14,2\%$, что незначительно превышало данный показатель в обследованной когорте на момент начала вспышки (июнь 2020) - $11,81\%$. На протяжении исследования серологический профиль антител характеризовался снижением частоты выявления IgM и IgA до $66,7\%$, в то время как выявляемость IgG оставалась на уровне $93,0\%$. Наиболее высокий уровень серопревалентности отмечен среди старших медсестер ($19,9\%$), младшего медицинского персонала ($16,8\%$) и врачей ($16,2\%$) [16].

Особенности формирования гуморального иммунного ответа в зависимости от тяжести течения инфекции

В условиях пандемии COVID-19 особую актуальность приобретают исследования по изучению особенностей формирования иммунного ответа к SARS-CoV-2 у переболевших различными клиническими формами этой инфекции, что имеет важное значение для понимания степени их участия в формировании популяционного иммунитета и оценки индивидуальной невосприимчивости к SARS-CoV-2 в последующем. Многие авторы проводят сравнительный анализ зависимости титра специфических антител и сроков сероконверсии от тяжести течения заболевания.

Так, Li W. et al. (2020, Китай) при исследовании образцов сыворотки крови трех пациентов с ПЦП-подтвержденной инфекцией COVID-19 (один с тяжелой формой заболевания, а двое других - с легкой) сероконверсия IgG и IgA наблюдалась между 13 и 21 днем от начала заболевания. При этом, сероконверсия у пациента с тяжелым течением COVID-19 обнаружена раньше (на 13 день от появления симптомов) и с более высокой оптической плотностью (ОП), чем у лиц с легкой формой инфекции - примерно на 20 день и с меньшей ОП по результатам ИФА-теста (основанного на рекомбинантных белках) как к S-, так и к N-пептидам вируса [2].

В своей работе Платонова Т.А. с соавт. (2021), Россия, проанализировали сроки формирования специфических антител (IgA, IgM и IgG) к SARS-CoV-2 и продолжительность их сохранения у переболевших новой коронавирусной инфекцией. В исследование были включены 218 пациентов, которых обследовали в различные сроки от начала заболевания - первоначально в первые дни заболевания, а в последующем - повторно от одного до четырех раз (суммарно 321 точка контроля). Для оценки

продолжительности сохранения антител к SARS-CoV-2 у переболевших было организовано проспективное исследование, в котором приняли участие 368 человек. Обследование для определения специфических IgG проводили каждые 2-4 недели, в сроки от одного до восьми месяцев от начала клинических проявлений COVID-19. Суммарно - 919 точек контроля. Исследование на наличие IgM и IgG проводили с использованием тест систем на основе твердофазного ИФА.

В исследовании было показано, что у большинства обследованных лиц IgM и IgG начинали формироваться с 10-го дня болезни, тогда как IgA выявлялись с 5-го дня. При легких и бессимптомных формах коронавирусной инфекции IgG к SARS-CoV-2 в большинстве случаев не формировались, а уровни серопротекции коррелировали с тяжестью перенесенного заболевания. По мнению авторов работы, продолжительность сохранения IgG могла составлять не менее 8 месяцев, однако имели место единичные случаи их элиминации как после COVID-19 в форме ОРВИ, так и после перенесенной интерстициальной пневмонии. При сохраняющемся неблагоприятном по COVID-19 случае повторного заболевания среди лиц, сформировавших IgG (в том числе и утративших их через 4 - 5 месяцев после заболевания), в течение периода наблюдения не было зарегистрировано.

Авторы считают, что для полного понимания иммунного ответа к SARS-CoV-2 необходима оценка авидности IgG-антител или их способности к вируснейтрализации, а также изучение клеточного иммунитета у переболевших COVID-19, но не сформировавших антитела [17].

В сентябре 2020 г. Crawford K.H.D. et al. (США) опубликовали результаты исследования динамики изменений титров ВНА к S-белку SARS-CoV-2 у лиц, перенесших COVID-19. В исследовании приняли участие 34 пациента с лабораторно подтвержденной инфекцией. Все участники были разделены на три группы: стационарные пациенты (5 человек), амбулаторные пациенты (22 человека) и пациенты с бессимптомной формой инфекции COVID-19 (7 человек). Возраст обследованных пациентов варьировал от 18 до 79 лет, доля женщин составила 58,8%. Клинический материал для исследования забирали на 30, 60, 90 и 120 день с момента появления симптомов (или после первого положительного результата ПЦР-теста у бессимптомных лиц). Определение IgG к S-белку SARS-CoV-2 и к RBD-S проводили при помощи ИФА тест-систем коммерческого производства. Для оценки нейтрализующей активности антител использовали лентивирусные частицы, псевдотипированные оптимизированным S-белком.

У подавляющего большинства обследуемых (32 из 34) через месяц с момента появления симптомов определялись ВНА, что согласуется с данными проведенных ранее исследований. Однако в течение следующих месяцев уровень антител снижался, при этом динамика была индивидуальной. Согласно проведенным расчетам, через 90 дней среднее значение титра нейтрализующих антител (NT50) снизилось в 3,8 раза по сравнению с NT50 на 30-й день. Тем не менее, у большинства пациентов (27 из 34) даже в момент последнего забора крови все еще обнаруживались нейтрализующие антитела.

В последующем эта же группа исследователей (Crawford K.H.D. et al.) сравнила динамику изменения титра ВНА у людей, в разной степени тяжести переболевших COVID-19. Оказалось, что у пациентов, перенесших заболевание в тяжелой форме, титры ВНА изначально были выше, чем у переболевших в легкой форме, в том числе и через 30 и 60 дней наблюдения. Независимо от тяжести заболевания через 3-4 месяца от момента инфицирования титры ВНА в данных группах снизились до сравнимых значений. При этом, у пациентов с тяжелым течением COVID-19 в период с 30 по 90 день показатель NT50 снизился примерно в 18 раз, тогда как у участников из других групп регистрировалось лишь трехкратное его снижение. У лиц с бессимптомной формой инфекции титры антител во все моменты времени соответствовали аналогичным показателям у пациентов с наличием клинических симптомов, получавших амбулаторное лечение, что согласуется с данными более ранних исследований китайских коллег (Long Q-X et al., 2020).

Авторы пришли к выводу, что динамика титров ВНА может быть связана с тяжестью течения COVID-19. Так, при тяжелой форме инфекции в первое время после заражения происходит чрезмерное образование короткоживущих клеток, секретирующих антитела, с последующим резким падением титра ВНА. Однако при легкой форме заболевания снижение уровня нейтрализующих антител менее выражено. Важно подчеркнуть, что достаточно высокие титры ВНА наблюдались у большинства участников исследования даже через 3-4 месяца. Авторы работы предположили, что определенный уровень антител у переболевших COVID-19 может обеспечивать более длительный иммунитет [18].

В работе Балахонова С.В. с соавт. (2020), Россия, особое внимание уделено изучению формирования гуморального иммунитета при инapparантных (без клинических признаков), лёгких или стёртых формах COVID-19. В данном исследовании приняли участие 99 добровольцев с ПЦР-подтверждённым диагнозом COVID-19 и 50 условно здоровых лиц, имеющих на момент обследования отрицательные результаты ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2. Специфические антитела IgG и IgM к SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли с использованием отечественных ИФА тест-систем.

Полученные данные свидетельствуют об обнаружении специфических IgG в сыворотке крови людей на 2-3-й неделях после инфицирования и о достижении их максимального уровня на 20-21-й день болезни. Показатель сероконверсии составил 94,9%. Среднегеометрический титр антител при бессимптомной и лёгкой формах коронавирусной инфекции статистически не различался и составил 1:512 и 1:632 соответственно. Более высокие титры антител (1:1600) выявляли при среднетяжелой форме.

В заключение авторы пришли к выводу, что полученные результаты могут послужить основой для изучения динамики изменений показателей гуморального иммунного ответа у переболевших COVID-19 и определения длительности их постинфекционного иммунитета с целью прогнозирования развития эпидемической ситуации и обеспечения планирования специфической профилактики [19].

Специалисты из Китая Hou H. et al. (2020) провели исследование, в котором с использованием ИХЛА-теста определяли уровень IgM и IgG к SARS-CoV-2, в рамках которого были обследованы 338 пациентов с установленным диагнозом COVID-19.

Было показано, что уровень IgM нарастал в течение первой недели, достигнув пика через 2 недели после заражения SARS-CoV-2, а затем снижался до почти фоновых значений у большинства пациентов. IgG были детектированы через 1 неделю и выявлялись на высоком уровне в течение длительного периода. Показатели выявления IgM и/или IgG к SARS-CoV-2 существенно не различались в группах пациентов с легкой, среднетяжелой и тяжелой/критической формой заболевания.

В тяжелых и критических случаях уровень IgM был выше, чем в легких, в то время как уровень IgG в критических случаях был ниже, чем в случаях с легкой и среднетяжелой формами инфекции. По мнению авторов, это может быть связано с периодом высокой активности заболевания и/или нарушением иммунного ответа в критических случаях. Отмечен несколько более высокий уровень антител IgM у пациентов с угрожающим жизни состоянием, чем у реконвалесцентов, но уровень IgG в этих группах существенно не различался.

В заключение исследователи сделали вывод о том, что количественное определение IgM и IgG к SARS-CoV-2 имеет потенциальное значение для оценки тяжести заболевания и прогноза COVID-19 [20].

Приведенные выше данные исследований, показывают, у пациентов, переболевших COVID-19 в тяжелой форме, нейтрализующие антитела могут определяться в течение более длительного времени, чем у пациентов, перенесших инфекцию в легкой форме. Более высокая вирусная нагрузка может привести к более тяжелому течению болезни и, следовательно, вызвать усиленную продукцию специфических антител за счет увеличения концентрации вирусного антигена. Вместе с тем, перенесенная в легкой форме инфекция COVID-19 с недостаточной продукцией специфических антител потенциально может привести к реактивации инфекции; при этом не исключается вероятность более тяжелого течения заболевания у повторно инфицированных пациентов.

Литература

- Kathleen M.M., Dowlatshahi D.P., Dai J., Becker L.M., Hensel J., Snowden L.M., et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020 Sep 17; 5(18):e142386.
- Manners C., Bautista E.L., Sidoti H., Lopez O.J. Protective adaptive immunity against severe acute respiratory syndrome coronaviruses 2 (SARS-CoV-2). *Cureus*. 2020 Jun 1; 12(6): e8399.
- Mo H., Zeng G., Ren X., Li H., Ke C., Tan Y. et al. Longitudinal profile of antibodies against SARS-coronavirus in SARS patients and their clinical significance. *Respirology*. 2006 Jan; 11(1):49-53.
- Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71(16):2027-34.
- Seow J., Graham C., Merrick B., Acors S., Pickering S., Steel K.J.A. et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat. Microbiol*. 2020 Dec; 5(12):1598-1607.
- Ripperger T.J., Uhrlaub J.L., Watanabe M., Wong R., Castaneda Y., Pizzato H.A. et al. Orthogonal SARS-CoV-2 serological assays enable surveillance of low-prevalence communities and reveal durable humoral immunity. *Immunity*. 2020 Nov 17; 53(5):925-33.
- Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. Dec 4 2020; 370(6521):1227-30.
- Unanue L., Agueros A., Ateka O., Camara A., Sampedro E., Maure N. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 8 months after the moderate to severe infection. *ESCMID eLearning*. 2021; 332373; 4868.
- Flehmgig B., Schindler M., Ruetalo N., Businger R., Bayer M., Haage A. et al. Persisting neutralizing activity to SARS-CoV-2 over months in sera of COVID-19 patients. *Viruses*. 2020 Nov 27; 12(12):1357.
- Черкасова М.В., Козлова В.И., Сялянова Е.П. Сопоставление результатов определения антител к SARS-CoV-2 с использованием наборов реагентов разных производителей. Материалы научно-практических конференций VII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2021): сборник тезисов. М.: Издательство "У Никитинских ворот", 2021:170.
- Шустов В.В., Баженов А.И., Годков М.А. Изменение напряженности специфического иммунитета к SARS-CoV-2 в течение 8 месяцев после заболевания. Материалы научно-практических конференций VII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2021): сборник тезисов. М.: Издательство "У Никитинских ворот", 2021:173.
- Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020 Oct 29; 383(18):1724-34.
- Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J., Wu G.C., Deng K., Chen Y.K. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. *Nat Med*. 2020 Jun; 26(6):845-8.
- Сизова Е.П., Пяташина М.А., Ставропольская Л.В., Бадамшина Г.Г., Фатхутдинова Л.М. Изучение гуморального иммунитета у медицинских работников, находящихся в контакте с пациентами с COVID-19. Здоровье населения и среда обитания - *ЗНИСО*. 2021;(2):70-4.
- Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Агафонова Е.В., Тюрин Ю.А., Куликов С.Н., Гилязутдинова Г.Ф. и др. Оценка иммунитета к SARS-CoV-2 у медицинских работников Республики Татарстан в период пандемии COVID-19. Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2020): сборник тезисов VIII Конгресса с международным участием (25-27 ноября 2020 г., Москва). М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020:51-3.
- Barrufet P., Serra-Prat M., Palomera E., Ruiz A., Bolivar M., Tapias G. et al. Evolution of SARS-CoV-2 antibody responses (IgM+IgA versus IgG) during COVID-19 pandemic among healthcare workers at the Consorci Sanitari del Maresme (CSdM), Catalonia, Spain. *ESCMID eLearning*. 2021;332402;4927.
- Платонова Т.А., Голубкова А.А., Карбовничая Е.А., Смирнова С.С. Особенности формирования гуморального иммунитета у лиц с различными клиническими проявлениями COVID-19. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(2):297-323.
- Crawford K.H.D., Dingens A.S., Eguia R., Wolf C.R., Wilcox N., Logue J.K. et al. Dynamics of neutralizing antibody titers in the months after SARS-CoV-2 infection. *J Infect Dis*. 2021 Feb 3; 223(2):197-205.
- Балахонов С.В., Дубровина В.И., Чеснокова М.В., Войткова В.В., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д. и др. Изучение гуморального иммунного ответа при лёгкой и бессимптомной формах проявления COVID-19. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020; 5(5):26-30.
- Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F. et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunology*. 2020 May 6; 9(5):e01136.

Лабораторные диагностические тесты для выявления SARS-CoV-2 и интерпретация результатов исследований

ООО "НПО "Диагностические системы", г. Нижний Новгород

Пандемия новой коронавирусной инфекции, начавшаяся в 2019 году (COVID-19) продолжает стремительное шествие по планете, поражая население большей части разных стран мира. Постоянно пополняются знания о методах лабораторной диагностики инфекции; на современном этапе разрабатывается, производится и применяется на практике большое количество различных тест-систем для диагностики инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2).

Базой для создания диагностических тест-систем на основе высокотехнологичных молекулярно-биологических и иммунологических методов и для разработки возможных алгоритмов лабораторной диагностики инфекции COVID-19 послужили многочисленные научные исследования, проведенные специалистами разных стран мира. Несмотря на то, что исследования по изучению особенностей возбудителя и инфекционного процесса в настоящее время продолжают, научно-обоснованные данные многих исследований нашли отражение в руководствах и методических рекомендациях, выпущенных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и регулирующими органами других стран (в том числе и России) по лабораторной диагностике этой инфекции с использованием

различных видов тестов и интерпретации получаемых результатов анализов, что имеет большое значение для практического здравоохранения в современных условиях.

В настоящем обзоре представлены наиболее интересные и значимые публикации по результатам научных исследований в области лабораторной диагностики COVID-19.

Так, коллектив авторов из Индии и Японии (Sethuraman N. et al., июнь 2020) опубликовал статью, в которой представил алгоритм диагностики и особенности интерпретации результатов анализов, проводимых при помощи используемых в рутинной практике двух типов диагностических тестов - основанных на прямых и непрямых методах этиологической диагностики инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 (COVID-19). А именно: тестов на основе методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), в частности полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления РНК вируса, и тестов на основе иммуноферментного анализа (ИФА) для детекции IgM и IgG к SARS-CoV-2. Кроме того, исследователи проанализировали и описали, как результаты этих анализов могут изменяться с течением временем (рис. 1) [1].

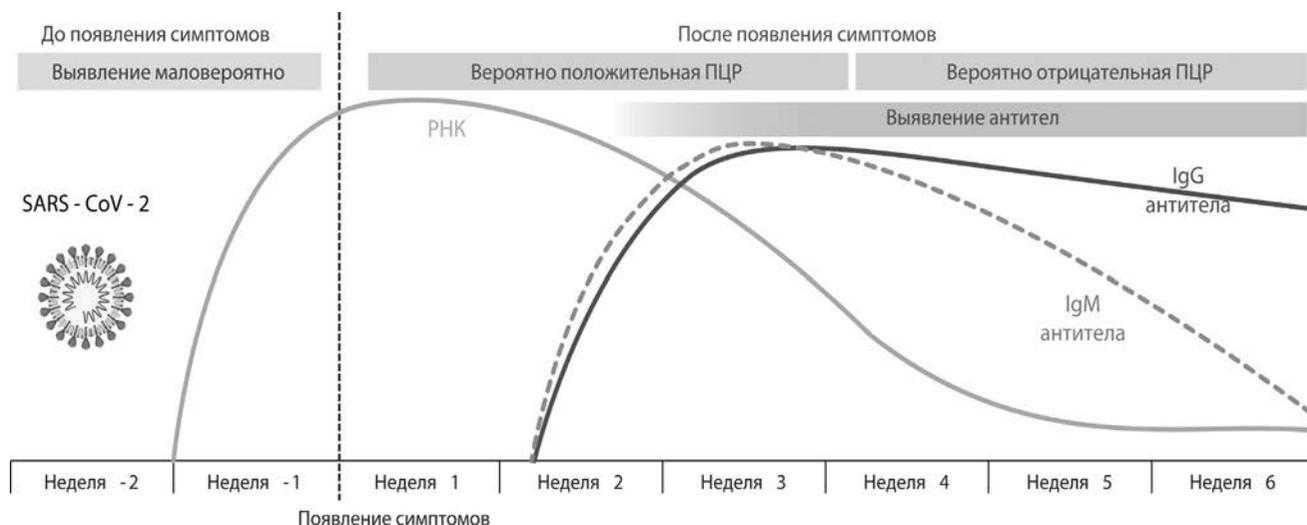


Рис. 1. Динамика результатов диагностических тестов для выявления маркеров инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, относительно начала появления симптомов [1].

I. Прямые методы лабораторной диагностики COVID-19

1. Выявление вирусной РНК при помощи ОТ-ПЦР

В настоящее время наиболее часто используемым и надежным тестом для диагностики COVID-19 является тест ОТ-ПЦР, выполняемый при исследовании назофарингеальных или орофарингеальных мазков или, с недавних пор, образцов слюны. Различные производители диагностикомов используют различные гены-мишени РНК вируса SARS-CoV-2, при этом большинство тестов нацелены на один или несколько генов оболочки (env), нуклеокапсида (N), спайк-белка (S), РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) и репликазы ORF1. По данным сравнительного исследования Nalla A.K. et al. (2020) чувствительность тестов к отдельным генам сопоставима, за исключением праймерного зонда RdRp-SARSr, который имеет немного более низкую чувствительность, вероятно, из-за несоответствия в обратном праймере (короткого фрагмента нуклеиновой кислоты комплементарного ДНК- или РНК-вируса) [2].

В исследовании Zheng S. et al. (2020) показано, что у большинства пациентов с симптоматической формой инфекции COVID-19 вирусная РНК в назофарингеальном мазке, определенная величиной порогового цикла (Ct) ПЦР для образца, обнаруживается уже в первый день появления симптомов и достигает пика в течение первой недели с момента их появления. Пороговый цикл - это количество циклов репликации, необходимых для получения флуоресцентного сигнала, при этом, чем ниже значения Ct, тем выше вирусная нагрузка (концентрация РНК SARS-CoV-2). Значение Ct менее 40 клинически оценивали как положительный результат ПЦР. "Позитивность" результата (концентрация РНК) начинала снижаться к 3-й неделе, и впоследствии вирусная нагрузка становилась неопределяемой. Сообщается, что у пациентов с тяжелым течением инфекции (в отличие от пациентов с легкой формой заболевания) уровень РНК SARS-CoV-2 выше, и положительный результат ПЦР у них может сохраняться более 3 недель после начала заболевания, тогда как у большинства пациентов с легким течением результат становится отрицательным [3]. При этом, подчеркивают исследователи, необходимо учитывать, что "положительный" результат ПЦР отражает только обнаружение вирусной РНК и не подтверждает наличие жизнеспособного вируса [4].

В ряде случаев вирусная РНК была обнаружена методом ОТ-ПЦР даже после 6-ой недели после первого положительного результата теста. Также в работе Wolfel R. et al. (2020) сообщалось о нескольких случаях положительных результатов исследования после двух последовательных отрицательных результатов ПЦР-тестирования, проведенного с интервалом в 24 часа [4]. Неясно, является ли это ошибкой тестирования, реинфекцией (повторным заражением) или реактивацией инфекции. В этом исследовании с участием 9 пациентов попытки изолировать вирус в культуре клеток после 8-го дня от начала заболевания не увенчались успехом, что соответствует информации о снижении инфекционности вируса после первой недели [4]. Отчасти именно поэтому в "стратегии, основанной на симптомах", разработанной Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США), указано, что медицинские работники могут вернуться к работе, если "с мо-

мента выздоровления, определяемого как отсутствие лихорадки (без использования жаропонижающих препаратов) и уменьшение выраженности респираторной симптоматики (например, кашля, одышки) прошло не менее 3 дней (72 часов); а с момента появления первых симптомов - не менее 10 дней" [5].

Сроки (продолжительность) выявления положительного результата ПЦР при исследовании назофарингеальных мазков и образцов других видов биоматериала отличаются. По данным Wolfel R. et al. (2020) "позитивность" ПЦР снижается медленнее при исследовании мокроты, и результат ПЦР может оставаться положительным после получения отрицательного ПЦР-результата исследования назофарингеального мазка [4]. В одном из исследований (Zheng S. et al., 2020) описано, что положительный результат ПЦР при исследовании фекалий наблюдался у 55 из 96 (57%) инфицированных пациентов и продолжал сохраняться в среднем от 4 до 11 дней после негативации результата ПЦР-исследования назофарингеального мазка, причем корреляция с тяжестью течения заболевания отсутствовала [3]. В исследовании Wolfel R. et al. (2020) было отмечено, что сроки выявления РНК вируса методом ПЦР в образцах мокроты и фекалий аналогичны.

В работе Wang W. et al. (2020) при обследовании 205 пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19 наиболее высокий процент положительных результатов ОТ-ПЦР был зарегистрирован при исследовании образцов бронхоальвеолярного лаважа (в 93% случаев), и меньший - при исследовании образцов мокроты (72%), мазков из носа (63%) и мазков из глотки (32%) [6]. Ложноотрицательные результаты (ЛОП) анализа были получены в основном из-за несоответствующего времени забора образцов от начала заболевания и ошибок в технике забора материала для лабораторных исследований, особенно мазков из носоглотки.

Специфичность большинства тестов ОТ-ПЦР может достигать 100%, (структура праймера специфична для последовательности генома SARS-CoV-2). Однако из-за технических ошибок и контаминации реагента не исключается возможность получения ложноположительных результатов (ЛПП) исследования.

Лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции в Российской Федерации (РФ) регламентирована приказом Министерства здравоохранения РФ № 198н и Методическими рекомендациями МРЗ.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19", утвержденным Главным санитарным врачом РФ 30.03.2020, а также Временными методическими рекомендациями Минздрава России "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), акт. версия 13.1 от 09.11.2021, содержащими "Инструкцию по проведению диагностики COVID-19 с применением методов амплификации нуклеиновых кислот". Для проведения исследований применяются зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ диагностические наборы в соответствии с инструкциями по их применению [7].

2. Выявление антигенов SARS-CoV-2

С середины 2020 г. на рынке появились диагностические экспресс-тесты для выявления антигенов (АГ-ДЭТ) коронавируса SARS-CoV-2. Эти тесты сконструированы на

основе иммунохимических методов анализа, таких как иммуноферментный (ИФА), иммунохемилюминесцентный (ИХЛА) и иммунохроматографический (ИХА). Клиническим материалом для тестирования на наличие антигенов SARS-CoV-2 являются назофарингеальные образцы, либо образцы слюны, которые исследуют для определения белков SARS-CoV-2 (например, нуклеокапсидного (N) антигена). Использование АГ-ДЭТ обеспечивает возможность более оперативной и дешевой диагностики COVID-19 по сравнению с тестами на основе МАНК. Обнаружение антигена к SARS-CoV-2 возможно в тот же период развития заболевания, что и РНК вируса - за 2 дня до и в течение 5-7 дней после появления симптомов. Анализ с использо-

ванием экспресс-тестов позволяет получить результат в кратчайшие сроки - за 10-30 мин. Однако, по данным ряда исследований, существенным ограничением применения АГ-ДЭТ является их меньшая аналитическая чувствительность по сравнению с тестами на основе МАНК (особенно у пациентов с бессимптомной инфекцией) [8, 9]. Авторами двух крупных систематических обзоров исследований (Dinnes J. et al., 2020; Brummer L.E. et al., 2021) по оценке чувствительности и специфичности различных АГ-ДЭТ при проведении тестирования пациентов с выраженными симптомами и у пациентов с бессимптомной формой заболевания, были представлены обобщенные данные по эффективности этих тестов (табл. 1).

Таблица 1

Краткий обзор эффективности АГ-ДЭТ для выявления SARS-CoV-2 по результатам исследований, выполненных согласно инструкциям по применению [8,9].

Категория обследованных	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
Все субъекты	72,0% (56,5-83,5%)	99,2% (98,5-99,5%)
Пациенты с симптомами COVID-19	75,1% (57,3-87,1%)	99,5% (98,7-99,8%)
Пациенты без симптомов COVID-19	48,9% (35,1-62,9%)	98,1% (96,3-99,1%)

В исследованиях нескольких авторов (Shrestha B. al., 2020; Kerneis S. al., 2021; Schuit E. al., 2021; Tulloch J. al., 2021) было показано, что при обследовании бессимптомных лиц, через несколько дней после контакта с инфицированными пациентами, АГ-ДЭТ продемонстрировали эффективность, сопоставимую с их эффективностью для лиц с симптоматической инфекцией, но более низкую, чем в случае тестирования с использованием МАНК. Полученные результаты не противоречили описанной динамике вирусной нагрузки [10, 11].

Тесты АГ-ДЭТ демонстрируют максимальную эффективность при тестировании образцов от лиц с высокой вирусной нагрузкой (значения $Ct \leq 25-30$, $\sim 1 \times 10^{5/6}$ копий РНК/мл), которая отмечается за 2-3 дня до и в течение первых 5-7 дней после возникновения симптомов заболевания [11]. В связи с чем такие лица с наибольшей вероятностью способствуют дальнейшему распространению заболевания [12]. Многие виды АГ-ДЭТ способны выявлять более 90% больных с высокой вирусной нагрузкой в первые дни после появления симптомов, и достоверность результатов исследований с использованием АГ-ДЭТ наиболее высока в регионах с уровнем заболеваемости COVID-19 $\geq 5\%$ [14].

Согласно одному из последних систематических обзоров исследований из Кокрейновской базы данных (Cochrane Database of Systematic Reviews, CDSR), чувствительность АГ-ДЭТ тестов на образцах с более высокой вирусной нагрузкой ($Ct \leq 25$) составила 94,5% (в сравнении с 40,7% для образцов с более низкой вирусной нагрузкой) [8]. По данным Brummer L.E. et al. (2021), максимальная эффективность АГ-ДЭТ установлена при исследовании мазков из верхних дыхательных путей (75,5% для образцов из передней части носовой полости или середины носовой раковины, и 71,6% для образцов из носоглотки) по сравнению с другими видами образцов [9]. Вместе с тем, в указанных работах были отмечены высокие показатели

специфичности АГ-ДЭТ - общая специфичность по результатам исследований в отношении соблюдения инструкций по применению производителей тестов составила 99,6% (Dinnes J. et al., 2020) при суммарной специфичности 99,0% для всех тестов за исключением двух (Brummer L.E. et al., 2021). Наличие или отсутствие симптомов заболевания не оказывало влияния на показатель специфичности, тем не менее авторы подчеркивают, что при очень низкой распространенности активной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, прогностическая ценность положительного результата будет низкой. Поэтому в зависимости от степени выраженности симптомов или клинического анамнеза и варианта возможного инфицирования, по мнению специалистов, следует рассмотреть возможность выполнения контрольного тестирования.

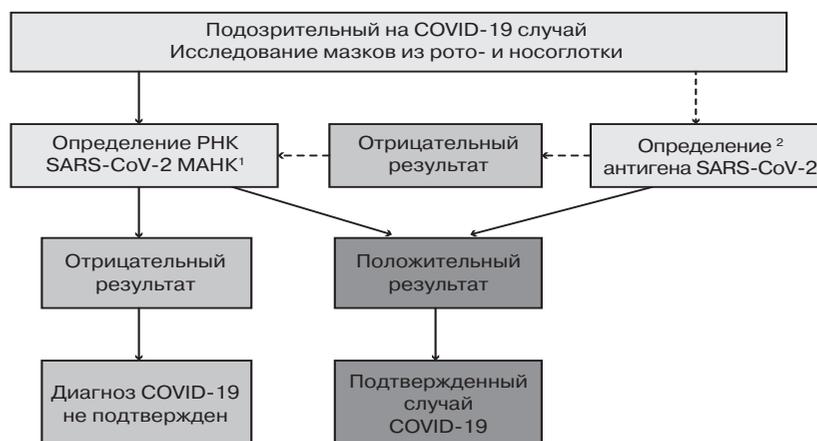
На современном этапе ВОЗ рекомендует использовать АГ-ДЭТ, отвечающие минимальным характеристикам чувствительности $\geq 80\%$ и специфичности $\geq 97\%$.

Полученные результаты опубликованных научных исследований с использованием одобренных к применению Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) различных АГ-ДЭТ тестов всесторонне изучаются и анализируются экспертами ряда международных медицинских организаций (таких, например, как CDC, IDSA) и ВОЗ; их данные используются при подготовке практических рекомендаций. Полный перечень рекомендаций по практическому применению АГ-ДЭТ тестов содержится в документе ВОЗ "SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests: an implementation guide" (Диагностические экспресс-тесты для определения антигенов SARS-CoV-2: руководство по практическому применению) [13]. Рекомендации ВОЗ систематически обновляются - 06 октября 2021 г. опубликованы временные рекомендации ВОЗ "Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection" (Определение антигенов в диагностике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2) [14].

Для проведения исследований в России применяются зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ диагностические наборы в соответствии с инструкциями по их применению. На сегодняшний день зарегистрированные в России тест-системы для выявления антигенов SARS-CoV-2 представлены в Государственном реестре медицинских изделий, опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора (www.roszdravnadzor.ru) [7].

стрированные в России тест-системы для выявления антигенов SARS-CoV-2 представлены в Государственном реестре медицинских изделий, опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора (www.roszdravnadzor.ru) [7].

Алгоритм этиологической диагностики у пациентов с подозрением на COVID-19 [7]



Обозначения:

¹ МАНК - методы амплификации нуклеиновых кислот

² Определение антигена SARS-CoV-2 методами иммунохроматографии или другими иммунохимическими методами

II. Непрямые методы лабораторной диагностики COVID-19

1. Обнаружение антител к SARS-CoV-2

Инфекция COVID-19 также может быть обнаружена косвенно, при определении гуморального (антительного) иммунного ответа к SARS-CoV-2. Согласно Временным методическим рекомендациям Минздрава РФ (версия 13.1 от 09.11.2021 г.) «выявление антител к SARS-CoV-2 имеет вспомогательное значение для диагностики текущей инфекции и основное для оценки иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию. Тестирование на антитела к вирусу SARS-CoV-2 рекомендовано использовать:

- в качестве дополнительного метода диагностики острой инфекции (с учетом серонегативного периода) или при невозможности исследования мазков МАНК, в том числе при госпитализации в стационар по поводу соматической патологии;

- для установления факта перенесенной ранее инфекции;
- для отбора потенциальных доноров иммунной плазмы» [7].

В свою очередь, эксперты зарубежных профессиональных медицинских организаций, таких как Американское общество инфекционных болезней (IDSA) и CDC (США), определили три потенциальных показания для тестирования на антитела к SARS-CoV-2:

- для подтверждения диагноза COVID-19 в случае отрицательного результата ПЦР при наличии симптомов и/или эпидемиологического анамнеза заболевания, если прошло менее 2 нед. с момента появления симптомов;

- при выяснении причин поздних осложнений (в частности, мультисистемного воспалительного синдрома у детей и подростков, ассоциированного с COVID-19);

- а также при проведении сероэпидемиологических исследований распространенности COVID-19 в популяции [15, 16].

При этом достоверность имеющихся доказательств в пользу проведения серологических исследований для диагностики заболевания или эпидемиологических целей была оценена как умеренная или очень низкая.

В связи с чем тестирование на антитела к SARS-CoV-2 не рекомендовано:

- для оценки наличия защитного иммунитета (в том числе у вакцинированных лиц и для оценки необходимости вакцинации у непривитых);
- для установления факта наличия или отсутствия острой инфекции, определения периода наибольшей заразности больного.

1.1. Тест-системы для выявления антител к SARS-CoV-2 и формат учета получаемых результатов

В настоящее время для выявления антител (IgA/IgM, IgG, суммарные антитела) к SARS-CoV-2 используют иммунохимические тест-системы (ИХТ) на основе ИФА, ИХЛА и ИХА, которые позволяют получать качественные, полуколичественные (коэффициент позитивности) и количественные результаты исследований. Эффективность тест-систем на основе иммунохимических методов зависит от стадии инфекционного процесса, состояния иммунной системы пациента, а также от характеристик применяемых диагностических наборов. Решение о тестировании на антитела к SARS-CoV-2 принимается лечащим врачом индивидуально, исходя из клинической целесообразности [7]. При принятии решений важно учитывать, что результаты исследований при помощи тестов для качественного выявления антител могут указывать только на факт наличия или отсутствия антител IgA/IgM и IgG к SARS-CoV-2 в образце и представляются в виде заключения «положительно» или «отрицательно». При использовании полуколичественных тестов результат выражается с указанием коэффициента позитивности (КП),

который отражает относительное количество соответствующих антител в образце и показывает во сколько раз уровень антител в образце превышает пороговый уровень их распознавания. КП является универсальным показателем, применяемым в ИФА-тестах с полуколичественной оценкой результатов. Этот показатель позволяет отслеживать динамику уровня антител в крови человека по результатам исследования образцов, взятых в разное время, и таким образом уточнять иммунный статус пациента.

Для определения концентрации (уровня, титра) иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 используют наборы реагентов для количественного определения антител, а результаты исследований представляют с использованием условных единиц измерения BAU/мл (binding antibody units, "единицы связывающих антител"), которые были приняты ВОЗ в качестве международного стандарта (First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin (Human) (NIBSC code: 20/136) [7]. После введения ВОЗ с целью гармонизации исследований с использованием указанного Первого международного стандарта для количественного определения антител SARS-CoV-2, у производителей появилась возможность разрабатывать тест-системы на его основе, а у исследователей и специалистов лабораторной службы - возможность сравнивать значения результатов тестов разных производителей и разных лабораторий. Количественная оценка уровня антител к SARS-CoV-2 может быть информативным методом для оценки динамики иммунного ответа после болезни или вакцинации.

Для проведения серологических исследований в России используют зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ наборы реагентов, которые представлены в Государственном реестре медицинских изделий, опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора (www.roszdravnadzor.ru) [7]. Все исследования проводят в соответствии с инструкциями производителей к наборам реагентов.

Серологическая диагностика особенно важна для пациентов с легкой и среднетяжелой формой COVID-19, у которых признаки заболевания могут появиться не сразу, а спустя некоторое время (примерно две недели) после начала заболевания. Кроме того, серологическая диагностика становится важным инструментом для оценки распространенности COVID-19 в популяции и выявления лиц, обладающих иммунитетом и потенциально "защищенных" от заражения, а в ряде случаев - для оценки поствакцинального иммунного ответа.

Наиболее чувствительным и ранним серологическим маркером COVID-19 являются общие антитела (классов IgM/IgG) к SARS-CoV-2, уровень которых в крови начинает повышаться со второй недели появления симптомов (Lou B. et al., 2020) [17]. Несмотря на то, что при помощи ИФА-теста IgM и IgG обнаруживаются уже на 4 день после появления симптомов, наиболее высокий уровень антител наблюдается на 2 и 3 неделе болезни.

Например, по данным To K.K. et al. (2020) и Xiang F. et al. (2020), у всех пациентов (участников этих исследований) сероконверсия IgM и IgG регистрировалась на 3 - 4 неделе от начала клинических проявлений заболевания - у 23 пациентов (по данным To K.K. et al., 2020) и 85 пациен-

тов (по данным Xiang F. et al., 2020) [18, 19]. В дальнейшем было обнаружено, что концентрация IgM начинает снижаться и достигает наиболее низкого уровня к 5 неделе и почти исчезает к 7 неделе, в то время как уровень IgG сохраняется и после 7 недели заболевания (Xiao A.T. et al., 2020) [20]. В исследовании Guo L. et al. (2020) с участием 140 пациентов максимальная чувствительность достигалась при использовании комплекса тестов - ПЦР-теста и ИФА-теста на IgM к N-белку, которая составила 98,6% против 51,9% при использовании только ПЦР-теста. Авторами было установлено, что в течение первых 5-6 дней заболевания уровень "позитивности" количественного ПЦР-теста (для определения РНК вируса) выше, чем ИФА-теста для выявления IgM, в то время как уровень "позитивности" ИФА-теста на IgM становится наиболее высоким после 5-6 дня болезни [21].

Специфичность ИФА тест-систем, предназначенных для выявления IgM и IgG к SARS-CoV-2 (в качестве вспомогательных средств диагностики COVID-19) составляет более 95%. В случаях серьезных оснований для подозрения на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, при отрицательном результате ПЦР теста, допускается исследование парных образцов сыворотки для выявления антител к вирусу. Результаты исследования образцов, один из которых получен в острый период заболевания, а второй спустя 2 недели, могут повысить точность диагностики - способствовать выявлению сероконверсии или повышению титра антител.

В настоящее время уже точно установлено, что с помощью ИХТ для выявления отдельных классов антител (IgA/IgM, IgG) к SARS-CoV-2 возможно определение различных фаз инфекционного процесса:

- серонегативная фаза - антитела могут не выявляться в первичном образце, но выявляются во взятых через несколько дней образцах;
- активная фаза - при определении диагностически значимого уровня IgA и/или IgM в одном образце или значимого нарастания уровня IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом в 2-4 недели;
- фаза реконвалесценции - концентрация IgA и IgM, как правило, существенно снижается (падение титра в 2-4 раза) во время выздоровления, при сохраняющихся IgG через 2 недели после курса лечения и позднее;
- перенесенная инфекция - персистенция IgG без роста его уровня в парных сыворотках и отсутствие IgA и IgM. Определение IgG к SARS-CoV-2 через 4 недели после вакцинации позволяет подтвердить наличие поствакцинального иммунитета. Длительность периода детектируемого наличия антител не определена, но в настоящее время рассматривается как период не менее 3 месяцев [7].

Основными антигенными мишенями вируса SARS-CoV-2, против которых обнаруживаются антитела, являются поверхностный гликопротеин (spike, S-белок) и нуклеокапсидный фосфопротеин (N-белок) вируса [16]. S-белок - самый крупный поверхностный белок SARS-CoV-2, структурным доменом которого является рецептор-связывающий домен (RBD-S), отвечающий за соединение SARS-CoV-2 с рецептором ACE 2 на мембране клеток человека, через который вирус проникает в клетку. Аминокислотные последовательности S-белка SARS-CoV-2 (особенно RBD-S)

являются уникальными, определение антител к этому белку является специфическим маркером иммунного ответа; антитела к RBD-S потенциально обладают вируснейтрализующими свойствами и препятствуют связыванию вируса с клетками человека, тем самым обеспечивают важную роль в определении индивидуального протективного иммунного ответа к SARS-CoV-2 [22].

N-белок вируса является наиболее обильно экспрессируемым иммунодоминантным белком, который взаимодействует с РНК. Образование антител к нуклеокапсиду свидетельствует об активации клеточного иммунитета [23]. Однако наличие антител к N-белку может свидетельствовать о предшествующем инфицировании другими сезонными коронавирусами человека, т.к. N-белок содержит ряд общих консервативных последовательностей [24]. Динамика образования антител к разным белкам коронавируса различается у каждого конкретного человека - у одних лиц изначально образуются антитела к N-, у других к RBD-S, у третьих - к обоим белкам одновременно [24, 25]. Длительность персистенции антител к разным белкам тоже варьирует у разных лиц [24].

Принимая во внимание, что антитела к N- и S- белкам SARS-CoV-2 могут отличаться динамикой и длительностью присутствия в крови, разным уровнем кросс-реактивности с сезонными коронавирусами, способностью участвовать в формировании иммунного ответа на вакцину (в зависимости от типа используемой вакцины), исследователи пришли к выводу, что для объективной оценки иммунного статуса необходимо определять наличие антител к обоим иммунодоминантным белкам вируса. Одновременное использование в качестве диагностической мишени S- и N- белков SARS-CoV-2 позволяет обеспечить высокую чувствительность диагностики - 100% (после 14 дня заболевания) и на протяжении всего периода наблюдения у реконвалесцентов [18].

1.2. Сходимость результатов исследований

Большое разнообразие серологических тестов на отечественном и мировом рынках приводит к тому, что результаты тестирования образцов сыворотки/плазмы крови, в том числе для выявления антител к SARS-CoV-2, с использованием наборов реагентов разных производителей могут отличаться и демонстрировать низкую сходимость. По расчетным данным специалистов Немецкого общества по клинической химии и лабораторной медицине (DGKL) было установлено, что по сравнению с ожидаемыми величинами показателей сходимости в 66-75% реальные показатели результатов измерений оказались очень низкими - до 30-60% [26].

Было показано, что низкая сходимость (повторяемость) результатов исследований с использованием серологических ИХТ тестов разных производителей может быть связана с:

- различиями в конструкции тест-систем в зависимости от типа используемой антигенной мишени. Существуют тесты, основанные только на одном из белков вируса (N-, S- или только на RBD-S SARS-CoV-2), а также тесты, основанные на двух белках;

- индивидуальными особенностями продукции антител разных классов в организме каждого человека (начало продукции и динамика образования антител разных

классов различаются, в связи с этим различаются сроки выявления IgA/IgM и IgG при проведении исследований);

- пороговыми величинами (cut off или ОПкрит.) в тест-системах разных производителей, ОПкрит. устанавливается производителем для каждой тест-системы и определяется на основе статистической обработки сигналов негативных проб, поэтому для сравнения результатов недопустимо использование тестов нестандартизированных по результатам исследований;

- характеристиками самих лабораторных тестов (чувствительностью, специфичностью, прогностической ценностью). Существенное влияние на показатели чувствительности диагностических тестов оказывает использование модифицированных или полноразмерных белков; на показатели специфичности - наличие общих аминокислотных последовательностей у сезонных коронавирусов и вируса SARS-CoV-2;

- различиями "исходных" исследуемых образцов - при исследовании образцов сыворотки/плазмы крови пациентов с подтвержденным диагнозом (по результатам ПЦР и КТ), сходимость результатов намного выше, чем при исследовании случайных образцов; а при бессимптомном течении заболевания выше процент расхождения результатов [26].

Специалистами Национальной группы по оценке серологических тестов на SARS-CoV-2 (Великобритания) было проведено сравнительное исследование по оценке аналитической эффективности пяти ИХ-тестов ведущих мировых производителей диагностических препаратов [27] и продемонстрирована вариация по чувствительности и специфичности между серологическими тестами разных производителей. Авторы отметили, что в Великобритании существует один из немногих установленных стандартов показателей эффективности иммунотестов на SARS-CoV-2 на международном уровне.

В работе эксперты оценивали и сравнивали эффективность тестов таких производителей, как Abbott (США), DiaSorin (Италия), Roche (Швейцария), Siemens (Германия) и нового 384-луночного ИФА-теста Оксфордского университета - Oxford immunoassay (Великобритания). При этом два теста (Abbott и Roche) предназначены для выявления антител к N-белку (Abbott и Roche), другие два - для детекции антител к S-белку (DiaSorin и Siemens); два теста - для определения IgG (Abbott и DiaSorin) и два - для определения общих антител (Roche и Siemens). При помощи теста Oxford immunoassay, сконструированного в формате непрямого ИФА, определяли IgG к тримерному спайковому белку.

Чувствительность и специфичность определяли при исследовании 976 образцов сывороток крови, взятых до пандемии COVID-19 (в период с сентября 2014 г. по октябрь 2016 г.) и 536 образцов сыворотки крови пациентов с лабораторно подтвержденной инфекцией COVID-19, собранных не ранее, чем через 20 дней после появления симптомов заболевания (в период с 1 февраля 2020 г. по 31 мая 2020 г.). Для расчета оптимальных пороговых значений и диагностической эффективности показателей проводили ROC анализ. В ходе исследования во всех тестах регистрировались как ЛПП, так и ЛОР. Анализ несоответствий между результатами исследования в различных тестах показал, что большинство несоответствий наблюдалось при

исследовании серологических образцов от пациентов с ПЦР-подтвержденной инфекцией COVID-19, собранных

ранее 20 дня после появления симптомов заболевания. Полученные результаты представлены в табл.2 [26].

Таблица 2

Результаты оценки эффективности тестов для выявления антител к SARS-CoV-2

Тест производства	Чувствительность, %	Специфичность, %
Abbott	92,7 (95% ДИ 90,2-94,8)	99,9 (95% ДИ 99,4-100)
DiaSorin	96,2 (95% ДИ 94,2-97,7)	98,9 (95% ДИ 98,0-99,4)
Oxford immunoassay	99,1 (95% ДИ 97,8-99,7)	99,0 (95% ДИ 98,1-99,5)
Roche	97,2 (95% ДИ 95,4-98,4)	99,8 (95% ДИ 99,3-100)
Siemens	98,1 (95% ДИ 96,6-99,1)	99,9 (95% ДИ 99,4-100)

По результатам исследования авторы пришли к выводу, что все тесты достигли чувствительности не менее 98% с пороговыми значениями, оптимизированными для достижения специфичности не менее 98% для образцов, полученных через 30 или более дней после появления симптомов инфекции.

Опубликованы также результаты наиболее полного на сегодняшний день исследования по оценке гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 в Исландии (Gudbjartsson D.F., 2020) [28]. В ходе исследования в Исландии около 15% населения страны было протестировано на заражение COVID-19 при помощи количественного ПЦР-теста и 6 серологических тестов. В исследовании приняли участие более 30 000 человек. Авторы в течение 4 мес. определяли уровень разных классов антител и продолжительность их циркуляции в крови. Оценку проводили с использованием тестов для определения суммарных антител к N- и S-белкам вируса; положительными признавали результаты, позитивные в 2-х тестах одновременно. Сходимость результатов измерений при исследовании клинических образцов составила в среднем 93%, при исследовании случайной выборки серологических образцов - в среднем 44% [28].

По результатам исследования выявлено примерно 56% серопозитивных лиц с положительными результатами ПЦР, при этом почти треть из них составили бессимптомные лица. В целом в данном исследовании были зафиксированы и рост, и ранний спад уровня антител к SARS-CoV-2 с дальнейшей стабилизацией на постоянном уровне в течение как минимум 4 мес. после заражения [28].

Приведенные данные свидетельствуют об актуальности вопроса выбора диагностического теста и применения определенного алгоритма тестирования.

Результаты серологических тестов следует интерпретировать в контексте ожидаемых прогностических значений, положительных и отрицательных. Большое значение имеет максимальная специфичность тестов и, следовательно, прогностическая ценность положительных результатов тестов, так как предполагаемая общая распространенность COVID-19 в большинстве популяций низкая.

Расчетным путем было показано что, при малой распространенности COVID-19 в популяции, исследование с использованием одного теста имеет более низкую прогностическую ценность положительного результата (табл.3):

Таблица 3

Распространенность COVID-19 и прогностическая ценность положительного результата исследования с использованием одного теста

Распространенность COVID-19 в популяции, %	PPV для одного теста (SE =90,0%; SP=95,0%); %
2	26,9
5	48,6
10	66,7
30	88,5

Обозначение. PPV - положительная прогностическая ценность, SE - чувствительность, SP - специфичность

Так, например, было показано, что при уровне распространенности COVID-19, составившем 2%, прогностическая ценность положительного результата для одного теста с чувствительностью 90% и специфичностью 95% составит всего 27% [FDA, USA <https://www.fda.gov/>].

Полученные результаты исследований продемонстрировали, что для повышения показателя прогностической ценности положительных результатов необходимо использовать алгоритм исследований, который позволит значительно увеличить достоверность получаемых результатов.

1.3. Алгоритм тестирования

Согласно Временным методическим рекомендациям МЗ РФ "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)" (в. 13.1 от 09.11.2021) "с целью диагностики COVID-19 непрямым методом рекомендуется проведение раздельного тестирования на IgM/IgA и IgG, а также мониторинг появления антител в динамике (детекция сероконверсии) - повторное тестирование в неясных случаях через 5-7 дней [7].

Для минимизации ложноположительных результатов рекомендовано 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 чувствительностью и специфичностью, а также с одновременным выявлением антител классов А, М, G, которая будет играть роль референтной (верифицирующей) тест-системы. В качестве такой тест-системы может использоваться тест-система для выявления рецептор-связывающего домена поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2" [7].

Существует также международный опыт использования последовательного тестирования к разным антигенам SARS-CoV-2. Подобный алгоритм тестирования на антите-

ла к возбудителю COVID-19 изложен во Временном руководстве CDC (США) от 01.08. 2020 г. (Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing) по тестированию на антитела на SARS-CoV-2 и в ряде публикаций по эпидемиологической оценке распространенности специфических антител в популяции [28, 29].

CDC (США) рекомендует использовать алгоритм ортогонального (т.е. последовательного тестирования с использованием двух независимых тестов) в тех случаях, когда ожидаемое прогностическое значение положительных результатов исследования при помощи одного теста является низким. Серологические тесты на SARS-CoV-2 в настоящее время имеют разрешение на экстренное использование (EUA) от FDA (США), которое самостоятельно проверило их эффективность.

В рамках применения алгоритма ортогонального серологического тестирования с использованием двух тестов с чувствительностью 90% и специфичностью 95% (для каждого) FDA (США) продемонстрирован пример расчета прогностической ценности положительных результатов исследований для гипотетических популяций с той же распространенностью COVID-19, что и в табл.3. Представленные в табл.4 показатели были рассчитаны с помощью онлайн-калькулятора на сайте FDA (США) [<https://www.fda.gov/>].

Таблица 4

Распространенность COVID-19 и прогностическая ценность положительных результатов исследования при использовании одного теста и двух тестов

Распространенность COVID-19 в популяции, %	PPV для одного теста (SE=90,0%; SP=95,0%); %	PPV для двух тестов в ортогональной схеме (SE=90,0%; SP=95,0%); %
2	26,9	86,9
5	48,6	94,5
10	66,7	97,3
30	88,5	99,3

Обозначение. PPV - положительная прогностическая ценность, SE - чувствительность, SP - специфичность

При исследовании серологических образцов в двух тестах прогностическая ценность положительных результатов исследования возрастает значительно, примерно в 2 - 3 раза.

Использование суммы результатов разноформатных тестов, нестандартизированных по условиям проведения анализа, затрудняет интерпретацию результатов исследования и не позволяет сделать объективные выводы о наличии антител к отдельным белкам SARS-CoV-2, а, следовательно, о возможности подтверждения положительных или сомнительных результатов исследования, минимизации ЛПР.

Точность одновременного выявления антител к SARS-CoV-2 в тест-системе с максимальными чувствительностью и специфичностью обусловлена:

1) стандартными условиями проведения и общими реагентами теста для обоих белков, позволяющими обеспечить одинаковую кинетику иммунной и ферментативной реакции;

2) единой величиной порогового значения для обоих белков, определенной с использованием одной группы образцов и одинаковых статистических методов.

При исследовании серологических образцов от пациентов с COVID-19 из четырех разных регионов США авторы (Burbelo P.D. et al.; июнь 2020 г.) определяли концентрации антител к S- и N- белкам SARS-CoV-2. Всего исследовали образцы от 35 пациентов с диагнозом COVID-19, подтвержденным с помощью ПЦР-теста, от 10 пациентов с наличием симптомов COVID-19, не прошедших ПЦР-тестирование, и от 32 доноров, сдавших кровь до начала пандемии COVID-19 в 2018 г. (контрольная группа).

Эксперименты с контрольными, заведомо отрицательными образцами показали низкий фон для антител к S-белку, но более высокий для антител к N-белку. Поскольку для серологического теста важна высокая специфичность (отсутствие ложноположительных результатов), авторы установили высокие предельные значения для положительного сигнала. Чувствительность теста при исследовании образцов, взятых позже 14 дня после появления симптомов, составила 100% в случае детекции антител к N-белку и 91% (32 из 35 образцов) для S-белка. Однако чувствительность была значительно ниже при исследовании серологических образцов от тех же пациентов,

полученных в течение первых 14 дней болезни: 51% и 43% для N- и S-белков вируса, соответственно. Специфичность в обоих случаях составила 100%. Анализ ежедневных проб от 6 пациентов с COVID-19 показал, что антитела к N- и S-белку появляются между 8 и 14 днями после появления первых симптомов. Однако у людей с ослабленным иммунитетом антитела к обоим белкам появлялись позднее, чем у иммунокомпетентных лиц, т.е. наблюдался замедленный антительный ответ к SARS-CoV-2.

У 9 из 10 человек с подозрением на COVID-19 были получены негативные результаты на антитела к обоим белкам, но у одного человека - детектированы антитела к N-белку (этот участник сообщал о контакте с инфицированным SARS-CoV-2 по положительному результату ПЦР-теста). Исследователи отметили, что N-белок SARS-CoV-2, несмотря на стабильность и консервативность, содержит ряд устойчивых последовательностей общих с другими сезонными коронавирусами человека, поэтому случаи регистрации ложноположительных реакций у доноров крови могли быть связаны с предшествующим инфицированием другими коронавирусами [30].

Во всем мире проводится большое количество научных исследований по изучению различных аспектов гуморального иммунитета к COVID-19, результаты которых постоянно публикуются в открытых источниках. В настоящее время уже хорошо известно, что сформированный гуморальный иммунитет обеспечивают только вируснейтрализующие антитела (ВНА) - к ним относят иммуноглобулины класса G (IgG), которые считаются более специфичными и дольше сохраняются в организме (в среднем от 3 до 6 мес.). ВНА препятствуют проникновению вируса в клетку и обеспечивают терапевтический эффект антиковидной плазмы.

Золотым стандартом для подтверждения наличия ВНА является реакция нейтрализации вируса - оценка нейтрализующей активности сыворотки на культуре клеток Vero E6, зараженных вирусом SARS-CoV-2. Однако было показано, что высокие титры IgG к SARS-CoV-2, обнаруженные при помощи ИФА-тестов, положительно коррелируют с нейтрализующими антителами [18].

В исследовании Grigoryan L. et al. (2020) было установлено, что нейтрализующими свойствами обладают антитела к S-белку SARS-CoV-2, в особенности к его рецептор-связывающему домену (RBD) [22]. Именно этот белок является мишенью большинства стратегий вакцинации и терапии на основе антител. Вместе с тем, в ряде работ (Sholukh A.M. et al., 2020; Flehmig B. et al., 2020; Grzelak L., et al., 2020) было показано, что N-белок вируса также содержит эпитопы, к которым определяются ВНА. По данным исследования Grzelak L. et al. при оценке корреляции титров ВНА с титрами ИФА коэффициент корреляции Спирмена (r) при $p < 0,001$ составил 0,9 между титрами ВНА и IgG к S-белку, а между титрами ВНА и IgG к N-протеину - 0,88 [31].

Специалисты НПО "Диагностические системы" (Матвеева Е.М. и соавт., 2021) провели собственное исследование по оценке корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах производства компании (ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S) и ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный) и в реакции нейтрализации. Результаты данного исследования опубликованы на сайте COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. (<https://doi.org/10.21055/preprints-3111942>), а также на страницах данного выпуска нашего журнала в рубрике "Оригинальные исследования".

Практические аспекты клинического использования и оценки вируснейтрализующей активности антиковидной плазмы освещены в дайджесте зарубежных и отечественных публикаций по данной теме на стр. 36

III. Интерпретация результатов исследований

Интерпретацию результатов иммунохимических лабораторных исследований рекомендовано проводить с учетом анамнеза и клинических данных, а также результатов других лабораторных и инструментальных исследований.

Варианты интерпретации результатов комплексной лабораторной диагностики COVID-19 с использованием тестов на основе МАНК и ИХА представлены в табл. 5 [7].

Таблица 5

Интерпретация результатов исследований методами амплификации нуклеиновых кислот и иммунохимическими методами [7]

Результаты исследования SARS-CoV-2				Интерпретация*
РНК	Антиген	IgM/ IgA	IgG	
-	-	-	-	Отсутствие текущей и ранее перенесенной инфекции COVID-19
+	+	-	-	Острая фаза инфекции. Серонегативный период. Результат может предшествовать появлению симптомов COVID-19
+	+	+	-	Острая фаза инфекции, Начало развития иммунного ответа
+	+	+	+	Острая фаза инфекции, выраженный иммунный ответ на инфекцию COVID-1
-	-	+	+	Поздняя фаза заболевания или выздоровление, выраженный иммунный ответ
-	-	-	+	Наличие инфекции COVID-19 в прошлом или период выздоровления. Сформирован иммунитет к SARS-CoV-2.

* - результаты исследований суммарных антител интерпретируются в соответствии с включенным в определение видом антител

Обращается внимание на необходимость учитывать вероятность получения ЛПП и ЛОР исследований. На основании анализа литературных данных исследователями выявлены следующие основные причины возникновения ложных результатов [32]:

- ЛПП могут появиться при наличии в крови пациента так называемых "перекрестно-реагирующих" антител (Tzouveleakis A. et al., 2020; Shibata S. et al., 2020; Lustig Y. et al., 2020), сходных по своим иммунохимическим свойствам со специфическими антителами других коронавирусов (Dinnes J. et al., 2020), а также из-за перекрестной реактивности с другими вирусами, например Денге (Lustig Y. et al., 2020), ВИЧ (Tan S.S. et al., 2020) и возбудителями ОРВИ (Boukli N. et al., 2020), при болезни Кавасаки (То К.К. et al., 2020), при наличии ревматоидного фактора IgM (Wang Q. et al., 2020);

- ЛОР могут быть получены при исследовании биологических образцов, взятых на серонегативном этапе развития инфекции (Watson J. et al., 2020), или при применении тест-систем с низким уровнем чувствительности (Deeks J.J. et al., 2020), в некоторых случаях оказывать влияние могут гемоглобин и температура образца (Laureano A.F.S. et al., 2020). Также ЛОР могут быть получены и при обследовании пациентов с иммунодефицитными состояниями (Mouliou D.S. et al., 2020); при аутоиммунных заболеваниях и их терапии (Tzouveleakis A. et al., 2020; Tan S.S. et al., 2020);

- ЛПП и ЛОР могут также появляться при нарушении правил проведения лабораторных исследований на всех этапах (Laureano A.F.S. et al., 2020; Meyer B. et al., 2014; Wang W. et al., 2020).

Таким образом, лабораторные исследования с использованием МАНК и ИХА, несомненно, являются полезным инструментом для диагностики COVID-19 и определения соответствующей фазы развития инфекционного процесса. Однако клиницисты не должны опираться только результаты лабораторных анализов, необходимо обязательно учитывать возможное влияние различных факторов на результаты исследований. Только всестороннее обследование пациента и внимание ко всем данным анамнеза позволит корректно поставить диагноз и выбрать адекватные методы лечения.

В условиях сложной эпидемиологической ситуации в мире, вызванной пандемией COVID-19, специалисты разных стран, в том числе и России, проводят многочисленные научные исследования в области этиологии, патогенеза, эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики данной инфекции. Особое внимание уделяется различным аспектам своевременной и качественной лабораторной диагностики, разработке новых и совершенствованию существующих методов и алгоритмов исследований на разных стадиях заболевания и в различных популяционных группах. Внедрение результатов научной деятельности в повседневную медицинскую практику позволяет расширить спектр и повысить качество лабораторных исследований, обеспечить своевременность и эффективность диагностики COVID-19. Однако, несмотря на достигнутые успехи в создании и производстве диагностических препаратов и высокий уровень лабораторной диагностики, все еще остаются вопросы, требующие дальнейшего комплексного изучения с использованием современных методов.

Литература

1. Sethuraman N., Jeremiah S., Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020 Jun 9; 323(22): 2249-51.
2. Nalla A.K., Casto A.M., Huang M.W., Perchetti G.A., Sampoleo R., Shrestha L. et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer/probe sets and one assay kit. *J Clin Microbiol*. 2020 May 26; 58(6):e 00557-20.
3. Zheng S., Fan J., Yu F., Feng B., Lou B., Zou Q. et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ*. 2020 Apr 21; 369:m1443.
4. Wolfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May; 581(7809):465-9.
5. CDC's Return to Work Healthcare Guidance (2021), downloaded from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/return-to-work.html> on April 27, 2021.
6. Wang W., Xu Y., Gao R. Lu R., Han K., Wu G., Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*. 2020 May 12; 323(18):1843-4.
7. Временные методические рекомендации Минздрава России "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 13.1 от 09.11.2021 г.- 235 с.
8. Dinnes J., Deeks J.J., Adriano A., Berhane S., Davenport C, Dittich S. et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Aug 26; 8(8):CD013705.
9. Brummer L.E., Katzenschlager S., Gaeddert M., Erdmann C., Schmitz S., Bota M. et al. The accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2021 Aug 12; 18(8): e1003735.
10. Lee S., Kim T., Lee E., Lee C., Kim H., Rhee H. et al. Clinical course and molecular viral shedding among asymptomatic and symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection in a community treatment center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med*. 2020 Nov 1; 180(11):1447-52.
11. Jones T.C., Biele G., M?hlemann B., Veith T., Schneider J., Beheim-Schwarzbach J. et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science*. 2021 Jul 9; 373(6551): eabi5273.
12. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021 Jan 1; 2(1): e13-e22.
13. WHO (2020). SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests: an implementation guide. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337948>.
14. WHO (2021). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: interim guidance, 6 October 2021. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345948>.

15. Hanson K.E., Caliendo A.M., Arias C.A., Englund J.A., Hayden M.K., Lee M.J. et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing, *Clin Infect Dis*. 2020 Sept 12; ciaa1343, <https://doi.org/>
16. CDC. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing. Updated Sept. 21, 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
17. Lou B., Li T., Zheng S., Su Y., Li Z., Liu W. et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. *Eur Respir J*. 2020 Aug 27; 56(2): 2000763.
18. To K.K., Tsang O.T., Leung W.S., Tam A.R., Wu T.C., Lung D.C. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020 May; 20(5):565-74.
19. Xiang F., Wang X., He X., Peng Z., Yang B., Zhang J. et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 5; 71(8):1930-4.
20. Xiao A.T., Gao C., Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: the first report. *J Infect*. 2020 Jul; 81(1): 147-78.
21. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F. et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28; 71(15):778-85.
22. Grigoryan L., Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin Immunol*. 2020 Aug; 50:101422.
23. Ferretti A.P. et al. Unbiased screens show CD8+ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity*. 2020 Nov 17; 53(5):1095-1107.e3.
24. Kathleen M. M., Dowlatshahi D.P., Dai J., Becker L.M., Hensel J., Snowden L.M. et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020 Sep 17; 5(18): e142386.
25. Seow J., Graham C., Merrick B., Acors S., Pickering S., Steel K.J.A., Hemmings O. et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol*. 2020 Dec; 5(12):1598-1607.
26. Ozcurumez M.K., Ambrosch A., Frey O., Haselmann V., Holdenrieder S., Kiehntopf M. et al. SARS-CoV-2 antibody testing-questions to be asked. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jul; 146(1):35-43.
27. Ainsworth M., Andersson M., Auckland K., Baillie J.K., Barnes E., Beer S. et al. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. *Lancet Infect Dis*. 2020 Dec; 20(12):1390-1400.
28. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020 Oct 29; 383(18):1724-34.
29. Ripperger T.J. Orthogonal SARS-CoV-2 serological assays enable surveillance of low-prevalence communities and reveal durable humoral immunity. *Immunity*. 2020 Nov 17; 53(5):925-3.e4.
30. Burbelo P.D., Riedo F.X., Morishima C., Rawlings S., Smith D., Das S. et al. Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect Dis*. 2020 Jun 29; 222(2):206-13.
31. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Tondeur L., Huon C. 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*. 2020 Sep 2; 12(559):eabc3103.
32. Mouliou D.S. and Gourgoulis K.I. False-positive and false-negative COVID-19 cases: respiratory prevention and management strategies, vaccination, and further perspectives. *Expert Rev Respir Med*. 2021:1-10.

Коронавирусная инфекция COVID-19: практические аспекты клинического использования антиковидной плазмы крови

ООО "НПО "Диагностические системы", г. Нижний Новгород

В современный период развития пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в научных публикациях исследователей из разных стран широко обсуждаются практические аспекты получения и применения плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенёвших эту инфекцию, а также приводятся доказательства её возможного применения в медицинских целях.

Продукты крови, применяемые для создания пассивного иммунитета

Плазму крови реконвалесцентов и гипериммунный глобулин (иммуноглобулин человека) получают от людей, перенёвших инфекцию, у которых развился иммунный ответ на вторжение в организм человека болезнетворных патогенов. Основным активным компонентом гуморального специфического иммунитета являются нейтрализующие антитела, но в механизм иммунной защиты могут вовлекаться и другие медиаторы иммунных реакций.

Исследователи, изучавшие возможность использования плазмы крови реконвалесцентов COVID-19 (антиковидной плазмы) для терапии этой инфекции отмечают, что до тех пор, пока не станет широко доступной эффективная и безопасная вакцинация против COVID-19, и не будет сформирован массовый популяционный иммунитет, трансфузии антиковидной плазмы крови и введение гипериммунного глобулина будут способствовать формированию приобретенного пассивного (антитело-опосредованного) иммунитета у людей, ранее не контактировавших с SARS-CoV-2, а также позволят уменьшить риск заражения или облегчить состояние инфицированного пациента и тяжесть течения заболевания [3,4].

Плазма реконвалесцентов

Плазма крови доноров-реконвалесцентов (или гипериммунная плазма) аналогична свежемороженой плазме (СЗП), заготовленной стандартным способом (плазма, выделенная из донорской крови, подвергается шоковой заморозке в течение 8 часов или 24 часов после забора крови). Наибольший эффект СЗП оказывает ввиду практически полной сохранности ее функций. Трансфузия СЗП ничем не отличается от переливания других видов плазмы; количество плазмы, получаемой из одной дозы крови, составляет 200-250 мл; необходимость повторного введения оценивает врач.

Плазму крови реконвалесцентов получают от доноров, перенёвших конкретную инфекцию, после их выздоровления (например, от доноров, переболевших COVID-19 - через две недели после полного выздоровления). В идеале

плазмой реконвалесцентов является любая плазма, содержащая в достаточном титре антитела к патогену, обладающие высокой биологической активностью для обеспечения пассивного иммунитета у реципиента.

Плазму крови от доноров-реконвалесцентов обычно получают в учреждениях службы крови методом автоматического плазмафереза (целевого выделения плазмы из донорской крови с возвратом донору остаточных компонентов крови).

Эта плазма не предназначена для рутинного применения - она используется против конкретных патогенов во время эпидемий или пандемий.

Согласно рекомендациям ВОЗ, применение плазмы от доноров-реконвалесцентов (лиц с подтвержденным случаем COVID-19 в стадии выздоровления) с целью лечения заболеваний, характеризующихся эпидемическими вспышками и отсутствием специфического лечения, основано на концепции пассивной иммунизации [1].

В США во время пандемии COVID-19 плазма крови доноров-реконвалесцентов стала доступной на основании разрешения Управления по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) на ее экстренное использование (Emergency Use Authorization, или EUA) в условиях чрезвычайной ситуации (с августа 2020 г., обновлено в марте 2021 г.). Известно, что в США было введено более 250 000 доз плазмы крови реконвалесцентов COVID-19 в рамках программ расширенного доступа, предусматривающих использование официально не зарегистрированного препарата, еще не прошедшего клинических испытаний (в тех случаях, когда исчерпаны другие методы терапии, и пациент дал добровольное согласие на лечение этим препаратом) или в ходе клинических испытаний [2].

В рассматриваемом контексте к наиболее оптимальным характеристикам плазмы крови реконвалесцентов, по мнению исследователей, следует отнести:

- достаточный титр специфических нейтрализующих антител;
- отсутствие инфекционных частиц;
- безопасность и эффективность применения [3, 4].

В России, Временными методическими рекомендациями министерства здравоохранения РФ "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)", версия 13.1 от 09.11.2021 г., определены следующие основные показания к клиническому использованию антиковидной плазмы:

1. Оптимальный период назначения - до 10 дня от момента появления клинических симптомов заболевания у пациентов:

- в тяжелом состоянии, с положительным результатом лабораторного исследования на РНК SARS-CoV-2;
- при средней степени тяжести с проявлениями острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

2. В случае длительности заболевания более 21 дня при неэффективности проводимого лечения и положительном результате на РНК SARS-CoV-2 [5].

Иммуноглобулин человека против COVID-19

Препарат иммуноглобулина человека представляет собой концентрированный раствор иммунологически активной белковой фракции, выделенной из плазмы крови доноров. Для его производства необходим пул плазмы доноров-реконвалесцентов, полученной от большого числа (до тысяч) полностью выздоровевших доноров, в крови которых уже содержатся антитела к возбудителю (в частности, к SARS-CoV-2) в высоких титрах. Эффективность иммуноглобулина человека для лечения тяжелых острых респираторных инфекций уже была продемонстрирована ранее, поэтому его применение также может быть одним из вариантов терапии COVID-19.

В период пандемии новой коронавирусной инфекции производство иммуноглобулина человека против COVID-19 ведётся параллельно с исследованиями эффективности антиковидной плазмы [3].

Применение высокоочищенного препарата иммуноглобулина также основано на концепции пассивной иммунизации. Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G (IgG) к SARS-CoV-2 (не менее 95%), полученные из пула плазмы доноров. Препарат изготавливают по технологии, включающей процедуры инактивации и/или удаления вирусов. Молекулы IgG при изготовлении препарата не подвергаются изменению вследствие химического или ферментативного воздействия. Активность антител полностью сохранена. Препарат не содержит консервантов и антибиотиков [5].

В России иммуноглобулин человека против COVID-19 рекомендовано применять в составе комплексной терапии данной инфекции у пациентов с высоким риском тяжелого течения заболевания (возраст старше 65 лет, наличие сопутствующих заболеваний (сахарный диабет, ожирение, хронические заболевания сердечно-сосудистой системы), только в условиях стационара, при соблюдении всех правил асептики [5].

На данный момент доказательная база клинического применения иммуноглобулина человека против COVID-19 недостаточна, нет исследований высокого качества об эффективности препарата при инфекции COVID-19.

Моноклональные антитела

Для создания искусственного пассивного иммунитета также могут использоваться лекарственные средства на основе моноклональных антител (МКА, англ. mAbs), обладающих вируснейтрализующей способностью [6].

Сегодня во многих странах (США, Франция, Германия, Италия и другие) вируснейтрализующие МКА используют для лечения пациентов на ранней стадии COVID-19, имеющих факторы тяжелого течения заболевания. В мае 2021 г. FDA (США) разрешило экстренное применение рекомбинантных МКА для терапии COVID-19 на ранних стадиях у взрослых и подростков. Европейское агентство лекар-

ственных средств также выдало положительное заключение. Минздрав РФ в свою очередь выдал разрешение на временное обращение и ввоз в страну лекарственных препаратов из группы вируснейтрализующих МКА [<https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/news/default/card/6005.html>].

Механизм действия

В ответ на внедрение вируса в организм человека, иммунная система включает защитные механизмы, направленные на локализацию вируса, предупреждение генерализации инфекционного процесса, уничтожение и выведение вируса из организма. Эти механизмы реализуются иммунной системой человека. В рутинной лабораторной практике принято оценивать лишь гуморальное звено иммунитета - синтез специфических антител к возбудителю.

Трансфузия иммунной плазмы, полученной от доноров-реконвалесцентов, обеспечивает искусственный пассивный иммунитет при помощи содержащихся в ней готовых вируснейтрализующих антител (и/или, возможно, других иммунных медиаторов), направленных против определенного патогена (вируса). Нейтрализующими могут быть иммуноглобулины различных классов (IgA, IgM и IgG). При переливании донорской плазмы, содержащей нейтрализующие антитела, ответная реакция организма на патоген становится более быстрой и активной, однако по сравнению с вакцинацией продолжительность ее действия - меньше.

Антитела, связывающиеся с вирусом, препятствуют проникновению вируса в клетку человека, т.е. обладают вируснейтрализующей активностью. Существуют такие механизмы противовирусного действия, реализуемые вируснейтрализующими антителами, как антителозависимый фагоцитоз, антителозависимая клеточная цитотоксичность и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность; какой механизм работает в случае инфицирования вирусом SARS-CoV-2, пока изучено недостаточно (Nguyen A.A. et al., Jul 2020; Wu F. et al., Oct 2020).

Исследователи отмечают, что IgG появляются в крови человека на 2-3 неделе инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Однако далеко не у всех переболевших образуются вируснейтрализующие антитела (ВНА) в количестве достаточном для лечебного эффекта.

Присутствие антител к SARS-CoV-2 и их сохранение в определенных титрах после выздоровления является индивидуальной особенностью организма реконвалесцента - согласно данным исследований образовавшиеся антитела могут сохраняться (циркулировать в крови) в течение как минимум полугода [7]. Наличие антител обеспечивает иммунную защиту при повторной встрече с инфекцией, сокращает продолжительность заболевания или уменьшает тяжесть его течения, что в конечном итоге помогает избежать серьезных или опасных для жизни осложнений [4, 8].

Исследователи отмечают также, что эффективность применения реконвалесцентной плазмы для лечения осложнений, которые могут развиваться при прогрессировании инфекционного процесса, в настоящее время еще недостаточно изучена. Это является основанием для введения плазмы реконвалесцентов на ранних этапах заболевания [8].

Вирус SARS-CoV-2 содержит 4 основных структурных белка, два из которых, как уже установлено, являются основными антигенами-мишенями, против которых вырабатываются антитела (Sun B. et al., Dec 2020; Okba N.M.A. et al., Jul 2020; Wu Y. et al., Jun 2020):

- Спайк-белок (S-белок) представляет собой тримерный трансмембранный поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2, который связывается с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (АПФ2; ACE2), находящимся на поверхности многочисленных типов клеток хозяина, включая клетки эпителия дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта и опосредует проникновение вируса в клетки организма человека (Engin A.B. et al., Oct 2020). SARS-CoV-2 проникает в клетки организма человека при помощи взаимодействия между рецептор-связывающим доменом (RBD) S1-субъединицы S-белка вируса и АПФ2 человека, в результате чего происходит инфицирование. Однако молекулярный механизм данной связи остается не до конца изученным. Антитела к RBD-домену S-белка препятствуют связыванию вируса с клетками, тем самым обеспечивают важную роль в развитии индивидуального протективного иммунного ответа к SARS-CoV-2 [8].

- Нуклеокапсидный белок (N-белок) выполняет защитную роль для (PHK) коронавируса и способствует сборке функциональных вирионов; он играет важную роль в патогенезе инфекции [9]. Антитела к N-белку обычно образуются одновременно с антителами к S-белку, и являются маркером перенесённой инфекции.

Для выявления антител к S- и N-белкам были разработаны тест-системы, основанные на иммунохимических методах анализа (ИХА), среди которых - тесты на основе иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА), предназначенные для выявления антител к SARS-CoV-2. Исследование образцов сыворотки (плазмы) крови у людей, переболевших COVID-19, позволило установить, что в большинстве случаев IgM к S- и N-белкам вируса - ранние антитела, которые начинают синтезироваться на первой неделе заболевания, их уровень продолжает нарастать в течение двух недель, а затем постепенно снижается. IgG начинают появляться в крови позднее (обычно к третьей неделе после инфицирования) и сохраняются длительное время. Отмечено, что замена IgM на IgG быстрее происходила у пациентов, для лечения которых не требовалось проведение интенсивной терапии, по сравнению с пациентами, которые прошли курс лечения в отделениях интенсивной терапии [10]. Для оценки вируснейтрализующей активности плазмы реконвалесцентов используют тест-системы на основе ИФА и других современных методов лабораторной диагностики.

Опыт применения плазмы крови реконвалесцентов при инфекциях, вызванных другими вирусами

По имеющимся опубликованным данным, до пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19, плазму крови реконвалесцентов с относительным успехом использовали для борьбы с инфекциями, вызванными другими патогенами.

Наибольшая эффективность применения гипериммунной плазмы была показана в рандомизированном исследовании с участием пациентов с диагнозом аргентинской геморрагической лихорадки (вызванной вирусом Хуни (англ. Junin), принадлежащим к семейству аренавирусов).

В данном исследовании 217 пациентов были рандомизированы на две группы - получающие плазму реконвалесцентов и получающие трансфузию стандартной свежемороженой плазмы (контрольная группа) в дозе 500 мл. Терапию начинали на 8 день после появления симптомов инфекции (Maiztegui J.I. et al., Dec 1979). Уровень смертности в группе пациентов, получавших плазму реконвалесцентов, был ниже, чем в контрольной (1% против 16,5%). При этом, у тех пациентов, начало лечения которых пришлось на 9-й день после появления симптомов или позднее, улучшение показателей выживаемости не отмечено.

В мета-анализе 2015 года были объединены результаты нескольких обсервационных исследований, согласно которым было выявлено снижение смертности и другие положительные клинические исходы у пациентов с инфекцией, вызванной SARS-CoV (возбудителем атипичной пневмонии) и инфекцией, вызванной вирусом гриппа (Mair-Jenkins J. et al., Jan 2015). Несмотря на положительные результаты отмечено низкое качество этих исследований из-за высокого риска различных систематических ошибок и отсутствия контрольных групп.

Кто может стать донором

Донором антиковидной плазмы может быть практически любой человек, соответствующий общим критериям донорства, который полностью излечился от COVID-19, как минимум через 2 недели после заболевания (не ранее чем через 14 дней после исчезновения клинических симптомов при отрицательном результате ПЦР-теста на PHK SARS-CoV-2).

Считается, что у лиц, которые перенесли заболевание в тяжелой форме, развивается сильный иммунный ответ, и у них с большей вероятностью будет высокий титр антител, хотя доказательства этого ограничены, и титр не может быть рассчитан на основании анализа клинических симптомов.

Исследование Klein S. et al. (США, Nov 2020), в котором авторы оценивали иммунный ответ у 126 потенциальных доноров антиковидной плазмы (в среднем через 43 дня после первоначального положительного результата теста на SARS-CoV-2), показало, что у мужчин регистрировались более высокие уровни антител, чем у женщин; у пожилых людей - выше, чем у молодых; а у госпитализированных больных выше, чем у амбулаторных пациентов. На основании полученных результатов установлена корреляция между наиболее высоким уровнем антител и степенью тяжести заболевания у госпитализированных больных [11].

В другом исследовании Wu F. et al. (Китай, Oct 2020) иммунный ответ оценивали у 175 человек, перенёвших COVID-19 в лёгкой форме. Авторы сообщают, что у большинства обследованных нейтрализующие антитела обнаружены в течение первых 10-15 дней при помощи реакции нейтрализации псевдовирусов. В 30% случаев определены очень низкие титры нейтрализующих антител; примерно у 6% пациентов антитела не детектировались. Титры нейтрализующих и spike-связывающих антител у лиц

старшего (60-85 лет) и среднего (40-59 лет) возраста были выше, чем у молодых (15-39 лет) пациентов. Наблюдалась тенденция к повышению титров нейтрализующих антител у мужчин по сравнению с женщинами, а также положительная корреляция с уровнем С-реактивного белка [12].

Опубликованы также результаты исследования другого коллектива китайских авторов - Long Q.X. et al. (Aug 2020), которые изучали и сравнивали гуморальный иммунный ответ в двух группах пациентов - в группе из 37 пациентов, перенёсших инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, в бессимптомной форме, подтверждённую результатами ПЦР, и в группе из 37 пациентов с клиническими проявлениями инфекции. Во второй группе выявлены повышенный уровень вирус-специфических IgG и более длительная персистенция антител в крови в ранней фазе выздоровления (первые 8 недель после выписки из стационара) [13].

Ожидаемая длительность циркуляции антител к SARS-CoV-2 в крови доноров после перенесённой в разных формах COVID-19-инфекции в титрах, достаточных для лечения больных пациентов (а, следовательно, период, в течение которого эти доноры-реконвалесценты могут привлекаться для донации антиковидной плазмы) в настоящее время изучаются. Для получения такой информации, необходим мониторинг титра антител у большого числа людей в течение длительного периода времени. Предварительные результаты исследования Gudbjartsson D.F. et al. (Sep 2020), Исландия, свидетельствуют о том, что во многих случаях антитела определяются в крови в течение как минимум 4 месяцев [14].

Другое исследование специалистов из Центра крови Хоксворта, США (Prus K. et al., Feb, 2021) по тестированию серии образцов плазмы крови от доноров-реконвалесцентов COVID-19 показало, что оптимальный период времени, на протяжении которого сохраняется высокий уровень антител, составляет от 4 до 8 недель [15].

В исследовании группы авторов из Канады (Perreault J. et al., Nov, 2020) с участием около 300 реконвалесцентов, относительно стабильные показатели уровня антител к RBD наблюдались в течение 10 недель, но в дальнейшем было отмечено их снижение после нескольких донаций [16]. У некоторых доноров уровень антител может сохраняться высоким и более продолжительное время. В рекомендациях FDA (США) указано, что доноры-реконвалесценты COVID-19 могут сдавать плазму крови в течение 6 месяцев с момента постановки диагноза [2].

На основании полученных данных клинических исследований было высказано предположение, что не у всех реконвалесцентов COVID-19 выявляются ВНА в титре, достаточном для обеспечения терапевтической эффективности плазмы, подчеркнута важность определения титра антител перед трансфузией плазмы.

Вакцинация против коронавирусной инфекции COVID-19 не является противопоказанием к донорству антиковидной плазмы. Однако в настоящее время исследователи продолжают изучать уровень и длительность сохранения протективных антител у привитых лиц (не болевших COVID-19) и исследуют возможность лечения пациентов с коронавирусной инфекцией плазмой крови людей, привитых против COVID-19. Лица, вакцинированные против COVID-19, могут быть донорами обычной плазмы, тромбоцитов и эритроцитов.

Лабораторные исследования/типы тестов

Для выявления антител используют биологические тесты на нейтрализацию (для оценки функциональной нейтрализующей способности антител против вирусных или псевдовирусных частиц в серийных разведениях *in vitro*) и серологические тесты (для оценки связывания антител со специфическими эпитопами вируса).

Наличие нейтрализующих антител в титре достаточном для защиты от инфекции считается важным показателем для оценки терапевтической эффективности плазмы крови, однако оптимальный порог (титр ВНА, выше которого плазма наиболее эффективна) для COVID-19 пока ещё не установлен. Специалисты подчеркивают, что изменить титр антител в дозе плазмы крови невозможно (т.е. плазму нельзя сконцентрировать для повышения титра антител), в отличие препаратов специфических антител - гипериммунных иммуноглобулинов и МКА.

Биологические тесты позволяют оценивать влияние перелитой плазмы крови на жизнеспособность вируса (т.е. вируснейтрализующую способность антител). К ним относятся VNT-реакция нейтрализации бляшкообразования (PRNT) и микронейтрализация; используется вирус SARS-CoV-2 из клинического изолята или рекомбинантные SARS-CoV-2, экспрессирующие репортерные белки. В тестах нейтрализации псевдовирусов (pVNT) используются рекомбинантные псевдовирусы (например, VSV), которые включают S-белок SARS-CoV-2. Использование биологических тестов в лабораторной практике не нашло широкого применения, поскольку выполнение таких исследований возможно только в специализированных лабораториях (Wu F. et al., Oct 2020; Nie J. et al., Dec 2020).

При помощи серологических тестов, основанных на ИХА, оценивают специфическое связывание антител с целевым антигеном в образцах плазмы/сыворотки крови человека. Для выявления антител используют очищенные белки SARS-CoV-2. Специфические IgA, IgM и IgG к вирусу определяют, как по отдельности, так и суммарно в разных комбинациях при помощи ИХА тестов. Чаще используют "качественные" серологические тесты, результат которых оценивают, как "положительный", если есть реакция (антитела присутствуют) или "отрицательный" - нет реакции. Существуют также и "полуколичественные" тесты, результаты которых выражают в виде коэффициента позитивности (КП), отражающего отношение оптической плотности (ОП) исследуемого образца (пробы) пациента к пороговому значению (соотношение ОПобр./ОПкрит.; S/C). КП показывает во сколько раз уровень антител в пробе превышает пороговый уровень их распознавания. Результаты полуколичественных тестов не являются абсолютным показателем наличия антител в образце, технически не являются титрами.

При отсутствии в анамнезе установленного диагноза инфекции COVID-19 отбор доноров может осуществляться на основании выявления IgG к SARS-CoV-2. В России исследование для выявления IgG к SARS-CoV-2 осуществляется с помощью ИФА/ИХЛА тест-систем (зарегистрированных в установленном порядке и разрешенных к использованию на территории Российской Федерации), для которых экспериментально установлена корреляция между результатами определения содержания антител в

плазме с вируснейтрализующей активностью, определенной в тесте с использованием перmissive культуры клеток. С этой целью возможно применение ИФА/ИХЛА тест-систем для определения IgG к S1 домену Spike гликопротеина вируса SARS-CoV-2 [5]. По данным Jouner M., (2020) в проспективном исследовании (n=35 322 пациентов) показано, что эффект от трансфузии антиковидной плазмы увеличивался по мере увеличения в ней титра IgG к S1 домену Spike гликопротеина [23].

Подчеркивается, что исследования с использованием биологических тестов нагляднее демонстрируют клиническую эффективность, но тесты на основе ИХА легче выполнять и автоматизировать. При этом возможно возникновение определённых сложностей при определении корреляционной связи между результатами реакции нейтрализации живого вируса/псевдовируса и титрами антител в ИФА; в этом направлении продолжаются активные научные исследования.

Исследователи отмечают, что с течением времени качество тестирования постепенно улучшается (Wu F. et al., Oct 2020; Okba N.M.A. et al., Jul 2020; Patel E.U. et al., Jan 2021; Perreault J. et al., Nov 2020). Продолжаются исследования по оценке значимости разных типов тестов, величины титра антител, полученной первоначально и в динамике, типа антигена, используемого в тесте и объема дозы донорской плазмы.

Что исследовать (образцы или готовую дозу плазмы)?

Титр антител можно определить при исследовании образца плазмы крови, взятого у донора до донации или при исследовании готовой дозы плазмы. При тестировании плазмы крови реконвалесцентов использовали несколько подходов. В ранних этапах пандемии COVID-19 титр антител определяли в дозе готовой плазмы крови - этот подход считался наиболее эффективным, поскольку в тот период серологические тесты не были широко доступными. Позднее, когда стали доступны разные тест-системы на основе ИХА, стали исследовать образцы плазмы донора до донации.

Исследователи пришли к выводу, что тестирование образца биоматериала донора при его визите перед сдачей плазмы более практично; оно позволяет отложить донацию плазмы у доноров, не имеющих антител в достаточном титре.

Данные клинических исследований свидетельствуют о том, что у многих лиц, переболевших COVID-19, антитела в плазме (сыворотке) крови содержатся в титрах, не достаточных для терапевтического использования их плазмы, поэтому подчеркивается важность определения уровня антител в плазме реконвалесцентов перед проведением трансфузии [7, 14, 18].

Скрининг на инфекционные заболевания и инаktivация патогена

Доноры антиковидной плазмы должны проходить стандартное медицинское обследование в соответствии с утвержденным порядком обследования доноров крови и её компонентов, а полученная плазма крови должна подвергаться стандартным скрининговым исследованиям на

гемотрансмиссивные инфекции. В рутинной практике плазма не тестируется на наличие SARS-CoV-2. FDA не рекомендует такое тестирование, поскольку для респираторных вирусов не характерна передача гемоконтактным путём [17].

Для снижения риска инфицирования реципиента может применяться инаktivация патогенов. Разработаны различные методы инаktivации жизнеспособных клеток вирусов и микроорганизмов, среди которых сольвент/детергентный метод и фотохимическая инаktivация.

Кроме того, проводят скрининг плазмы на группу крови (по системе ABO) и резус-фактор (RhD) - для того, чтобы можно было переливать ABO-совместимую плазму. Также плазму крови от доноров-женщин, имеющих в анамнезе беременность, тестируют на анти-HLA (антитела против человеческих лейкоцитарных антигенов), чтобы снизить риск острого повреждения легких, связанного с переливанием крови (TRALI - синдром). Исследование на анти-HLA проводят перед донацией, с учетом того факта, что у трети рожавших доноров-женщин могут выявляться антитела против HLA [17]. Доноры плазмы с наличием анти-HLA отстраняются от донаций.

При незначительных изменениях, выявленных в ходе лабораторного обследования донора, решение о его допуске к донации принимается врачом-трансфузиологом по согласованию с заведующим отделением.

Особенности трансфузии плазмы крови реконвалесцентов

Использование плазмы крови, полученной от доноров реконвалесцентов COVID-19, рассматривается как один из элементов комплексной терапии инфекции, который можно комбинировать со средствами патогенетической и симптоматической терапии заболевания. Решение о назначении терапии антиковидной плазмой принимается лечащим врачом индивидуально с учетом состояния больного.

С целью определения критериев наибольшей клинической эффективности терапии антиковидной плазмой в последнее время был проведен целый ряд исследований специалистами разных стран мира. Экспериментальные исследования проводились с целью определения оптимального срока начала терапии и титра (или уровня) ВНА.

Определение оптимального срока начала терапии

Оптимальные сроки для начала терапии антиковидной плазмой у больных COVID-19 все еще остаются не до конца установленными; накапливается все больше данных о том, что применение этого вида терапии в поздние сроки заболевания не приносит клинической пользы пациентам с COVID-19. И большинство специалистов склоняются к мнению о том, что применение антиковидной плазмы на ранних сроках заболевания наиболее эффективно.

Исследователи из США (Klassen S.A. et al., 2021) по результатам мета-анализа, проведенного с использованием данных рандомизированных клинических испытаний и обсервационных исследований, пришли к выводу, что улучшение выживаемости больных связано с применением антиковидной плазмы крови [18]. Статистические показатели зависели от того, какие испытания были включены в мета-анализ; когда анализ ограничивался только

данными рандомизированных испытаний, тенденция к повышению выживаемости не достигла статистической значимости (отношение шансов [ОШ] 0,76; 95% ДИ 0,54-1,09); однако после исключения из мета-анализа одного испытания с участием большого числа пациентов, получавших антиковидную плазму с низким титром антител, преимущество стало статистически значимым (летальность составила 11% против 16%; ОШ 0,65; 95% ДИ 0,43-0,98). Доказательства пользы терапии антиковидной плазмой возросли, когда анализ был ограничен исследованиями, в которых плазму применяли в течение трех дней после постановки диагноза (ОШ 0,44; 95% ДИ 0,32-0,61), что согласуется с предполагаемым механизмом действия (снижением проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку и/или повышением клиренса вируса).

Продолжаются клинические исследования по оценке применения антиковидной плазмы на всех этапах оказания медицинской помощи населению - от использования в целях профилактики (среди лиц, находившихся в тесном контакте с больными, но не заразившихся или среди лиц с высоким риском контакта с больными COVID-19), а также на начальном этапе развития инфекции, до лечения пациентов, находящихся в тяжелом и крайне тяжелом состоянии [3,4,19].

Определение оптимального уровня антител

Уровень антител считается важным определяющим фактором эффективности терапии, поскольку основной механизм действия опосредован антителами. Тем не менее, оптимальный титр антител для антиковидной плазмы неизвестен. Как уже отмечалось ранее, при исследовании плазмы крови можно определять титр антител (функциональное исследование нейтрализации вируса или псевдовируса при помощи серии последовательных разведений, которое требует дополнительных мер безопасности), так и уровень антител (серологическое исследование на наличие антител против определенного вирусного антигена, которое легче в исполнении и не требует усиления мер биологической безопасности). В клинической практике доноров и дозы антиковидной плазмы крови отбирают по результатам исследований образцов плазмы на наличие ВНА, проводимых при помощи иммунодиагностических тестов, а не реакции нейтрализации.

До августа 2020 г. антиковидной считали плазму крови с титром ВНА $\geq 1:160$, в случае отсутствия плазмы с высоким титром антител допускалось использование плазмы с титром антител 1:160 или даже 1:80 [34].

В августе 2020 г. Управление FDA (США) выдало разрешение на использование антиковидной плазмы в качестве лечебного средства для неотложного применения при оказании помощи госпитализированным пациентам с COVID-19. Взамен титра ВНА для отбора плазмы рекомендовано использовать другой критерий - КП (или S/CO) ≥ 12 , определенный в тесте "Ortho VITROS IgG" (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ). По этому показателю плазму характеризуют как "антиковидная плазма с высоким титром антител" [2]. Плазма с более низкими показателями может быть обозначена как "антиковидная плазма с низким титром антител". Она используется в случае отсутствия плазмы с высокими титрами [2].

С июня 2021 г. в США, согласно разрешению FDA на экстренное использование EUA, допускается трансфузия плазмы крови доноров-реконвалесцентов COVID-19, содержащей антитела только в высоких титрах. [20].

В Российской Федерации, согласно "Временным методическим рекомендациям минздрава России "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19" (версия 13.1 от 09.11.2021), "применяется плазма с вируснейтрализующей активностью в разведении 1:160; в случае отсутствия доноров с оптимальной вируснейтрализующей активностью плазмы допускается осуществлять заготовку от доноров с вируснейтрализующей активностью плазмы 1:80" [5].

Приведенные ниже результаты ряда рандомизированных клинических исследований зарубежных авторов продемонстрировали эффективность раннего начала терапии антиковидной плазмой с высокими титрами антител. Однако стоит отметить, что некоторые из перечисленных исследований были ограничены невозможностью набрать запланированное количество участников.

Виды терапевтических подходов

• Раннее начало терапии, высокие титры антител

Коллектив исследователей из Аргентины (Libster R. et al., Feb 2021) в феврале 2021 г. опубликовал результаты рандомизированного двойного плацебо-контролируемого исследования применения антиковидной плазмы крови с высокими титрами IgG к S-белку SARS-CoV-2 $> 1:1000$ (определенными в тест-системе "COVIDAR IgG, Instituto Leloir", Аргентина). В исследовании приняли участие 160 амбулаторных пациентов в возрасте 65 лет и старше с легкими симптомами COVID-19, с момента развития которых прошло не более 72 часов. Участники исследования были рандомизированы в 2 группы по 80 человек: в 1-ой группе пациенты получали антиковидную плазму в дозе 250 мл, а во 2-ой группе - плацебо (250 мл 0,9% физиологического раствора). Применение антиковидной плазмы в 1-ой группе ассоциировалось с меньшей вероятностью прогрессирования инфекции до тяжелого заболевания (с частотой дыхания ≥ 30 вдохов в мин.; сатурацией $O_2 < 93\%$), чем в контрольной группе (16% против 31%), и более низкой вероятностью развития опасного для жизни состояния или смерти (9% против 15%) [21]. Установлена зависимость доза-ответ (между дозой плазмы и клиническим эффектом), основанная на титре антител; плазма с более высоким титром антител к SARS-CoV-2 с большей вероятностью предотвращала прогрессирование заболевания (относительный риск [ОР] по сравнению с контрольной группой 0,27; 95% ДИ 0,08-0,68), чем плазма с более низким титром, что не давало статистически значимого преимущества в предотвращении прогрессирования заболевания (ОР 0,69; 95% ДИ 0,34-1,31) [21].

Испанскими исследователями (Avendano-Sola C. et al., Sep 2020) было проведено многоцентровое рандомизированное клиническое исследование с участием 81 пациента, госпитализированного с диагнозом COVID-19 в среднем через 8 дней от начала заболевания. Все пациенты были рандомизированы в две когорты в соотношении 1:1 - получавших только стандартную терапию (1-я когорта) и

получавших наряду со стандартной терапией антиковидной плазмой (2-ая когорта) в дозе 250-300 мл, содержащей IgG к SARS-CoV-2. Было показано улучшение показателей выживаемости у пациентов, получивших антиковидную плазму (показатель летальности через 15 и 29 дней составил 0% во 2 когорте против 9% в 1 когорте) [22]. Риск прогрессирования болезни был также ниже во 2 когорте пациентов, получивших трансфузию антиковидной плазмы (0% против 14% пациентов в 1 когорте (группе контроля), в которой зарегистрированы смерть или потребность в высокопоточной оксигенотерапии, искусственной вентиляции легких (ИВЛ) или экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО) на 15 день болезни). Титр ВНА в антиковидной плазме был выше 1:80, медиана ID50 составила 1:292 в реакции микронейтрализации вируса и 1:327 в реакции нейтрализации псевдовируса. Однако необходимо отметить, что в исследовании было набрано менее 30% планируемого количества участников, и в результате оказалось недостаточно статистических данных для полной оценки предполагаемого результата.

Группой авторов из клиники Мэйо, США (Joyner M.J. et al., Aug 2020), было проведено обсервационное (наблюдательное) исследование с участием 35322 пациентов с диагнозом COVID-19. Когорта пациентов, получивших трансфузии антиковидной плазмы, включала высокую долю тяжелобольных - 52,3% находились в отделении интенсивной терапии, а 27,5% - на ИВЛ. Показатели летальности рассчитывали от дня начала терапии антиковидной плазмой, назначенной с учетом степени тяжести заболевания. Более низкие показатели летальности отмечались в случае начала терапии антиковидной плазмой в течение трех дней после постановки диагноза по сравнению с началом терапии на 4 день и позднее (показатель семидневной летальности составил 8,7% [95% ДИ 8,3-9,2%] против 11,9% [11,4-12,2%] соответственно, $p < 0,001$). Исследовали различия в показателях летальности в зависимости от уровня IgG в переливаемой плазме; так показатели 7-дневной летальности составили 8,9% среди пациентов, получивших плазму с высоким уровнем IgG (КП > 18,45), 11,6% - среди реципиентов плазмы со средним уровнем IgG (КП = 4,62-18,45) и 13,7% среди реципиентов плазмы с низким уровнем IgG (КП < 4,62), $p = 0,048$ [23]. Сопоставимые результаты получены и по показателям 30-дневной летальности (21,6% против 26,7%, $p < 0,0001$). По результатам исследования авторы пришли к выводу, что трансфузия антиковидной плазмы с высоким содержанием антител на ранних сроках заболевания приводит к снижению показателей летальности, что может рассматриваться в качестве критериев эффективности терапии антиковидной плазмой [23].

Позднее были опубликованы результаты другой работы этих авторов (Joyner M.J. et al., Mar 2021). Ими проведено ретроспективное исследование с использованием доступных данных национального реестра США об уровнях IgG к SARS-CoV-2 в переливаемой антиковидной плазме для терапии более 3082 госпитализированных пациентов с диагнозом COVID-19 и показателях 30-дневной летальности после трансфузии плазмы. При анализе данных общего количества включенных в исследование пациентов обнаружена зависимость улучшения клинических исходов заболевания от содержания IgG в перелитой плазме. Значения КП

для уровней IgG к SARS-CoV-2 были распределены на три категории: низкий (<4,62), средний (4,62-18,45) и высокий (>18,45). Показатели 30-дневной летальности после трансфузии антиковидной плазмы составили 22,3% в когорте пациентов, получивших плазму с высоким уровнем антител, 27,4% - среди реципиентов плазмы со средним уровнем IgG и 29,6% - в когорте реципиентов плазмы с низким содержанием IgG. Связь уровней антител к SARS-CoV-2 с риском смерти от COVID-19 анализировали в зависимости от применения ИВЛ перед трансфузией плазмы. В когорте пациентов, не получивших ИВЛ до переливания плазмы отмечен более низкий риск смерти среди реципиентов плазмы с высоким уровнем антител, чем в группе реципиентов плазмы с низким уровнем IgG (ОР 0,66; 95% ДИ 0,48-0,91), и никакого влияния на риск смерти не наблюдалось среди пациентов, получивших ИВЛ (ОР 1,02; 95% ДИ 0,78-1,32). Таким образом, среди госпитализированных пациентов, не получивших ИВЛ, установлена связь низкого риска смерти от COVID-19 с трансфузией антиковидной плазмы крови с высоким содержанием IgG [24].

Аналогичные результаты были получены в исследовании специалистов из нескольких крупных медицинских учреждений шт. Техас США (Salazar E. et al., Jan 2021). Авторы работы представили результаты 60-дневного клинического наблюдения за выборкой из 351 госпитализированного пациента, которым перелили плазму крови. Большинство из этих пациентов (278/351; 79%) получили одну дозу антиковидной плазмы объемом 300 мл. Перспективное определение титра анти-RBD IgG при помощи теста на основе ИФА позволило отобрать для трансфузии дозы плазмы с высоким уровнем антител. Ранее авторы сообщали, что титр анти-RBD IgG $\geq 1:1350$ в плазме крови примерно с 80%-ной вероятностью соответствует титру нейтрализации живого вируса *in vitro* $\geq 1:160$. На основании того, что первоначально FDA рекомендовало считать антиковидной плазму с титром ВНА 1:160 и выше, для оценки титра антител в дозах донорской плазмы авторы исследования стандартизовали ИФА тест для четырех разведений плазмы: 1:50, 1:150, 1:450 и 1:1350. Результаты ИФА теста были ранжированы на основе самого высокого титра, а затем и самой высокой оптической плотности (ОП) при разведении 1:50.

Плазму с титром анти-RBD IgG $\geq 1:1350$ получил 321 пациент из 351 (91%); 24 пациента получили начальную или единственную дозу антиковидной плазмы с титром анти-RBD IgG > 1:150, но < 1:1350; 6 пациентов - с титром анти-RBD IgG < 1:150. Среди получивших вторую дозу плазмы, 71 пациент (71/75; 95%) получил ее с титром анти-RBD IgG $\geq 1:1350$, а 4 (4/75; 5%) человека с титром анти-RBD IgG > 1:150, но < 1:1350.

В дальнейшем авторы провели ретроспективный анализ, руководствуясь рекомендациями FDA по использованию для отбора антиковидной плазмы такого критерия как КП $\geq 12,0$, определенного в тесте "Ortho VITROS IgG". В данном исследовании ретроспективный анализ образцов плазмы крови (отобранных из 278/351 (79%) доз плазмы для переливания), выполненный при помощи теста "Ortho VITROS IgG", выявил среднее значение КП, составившее 24,0, что значительно превышало установленный FDA порог в 12,0 для обозначения антиковидной плазмы с высоким титром антител. В ходе исследования был определен

оптимальный срок для переливания пациентам с COVID-19 антиковидной плазмы с высоким титром антител, составивший 72 часа после госпитализации, что позволило снизить показатели смертности у этих пациентов. Показатель 60-дневной летальности составил 6,2% в когорте реципиентов антиковидной плазмы против 12,4% в контрольной группе ($p=0,003$). В целом, результаты проведенного исследования подтверждают и расширяют предварительные данные предыдущей работы авторов о том, что переливание антиковидной плазмы, содержащей IgG к RBD-домени S-белка SARS-CoV-2 в высоких титрах, пациентам с COVID-19 в ранние сроки после госпитализации, значительно снижает смертность [25].

В другом ретроспективном когортном исследовании, выполненном в США, авторы оценивали эффективность применения антиковидной плазмы для лечения COVID-19 (Shenoy A.G. et al., Feb 2021). В рамках исследования были проанализированы данные 526 госпитализированных пациентов с лабораторно подтвержденной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. Сравнивали данные 263 пациентов, получивших терапию антиковидной плазмой (от 1 до 2 доз, общий объем - 250-500 мл) с данными 263 пациентов контрольной группы, получавших стандартную медикаментозную терапию. Оценивали показатель 28-дневной летальности, с предварительной оценкой показателя через 7 и 14 дней. Отмечено снижение показателей 7-дневной и 14-дневной летальности у пациентов, получавших антиковидную плазму по сравнению с пациентами контрольной группы (9,1% против 19,8% через 7 дней наблюдения, $p<0,001$ и 14,8% против 23,6% через 14 дней, $p=0,01$). Тенденция к снижению летальности перестала быть статистически значимой после 28 дней наблюдения (в случае применения антиковидной плазмы показатель составил 25,5%, в контрольной группе - 27%, ($p=0,06$)). Также отмечена тенденция к снижению потребности в кислороде после переливания плазмы. Срок, прошедший от начала заболевания до начала применения плазмы, не уточнялся. Основным ограничением данного исследования было отсутствие сведений о титрах антител в перелитых дозах антиковидной плазмы. Однако на сегодняшний день это - крупнейшее исследование, демонстрирующее улучшение показателей летальности у пациентов с COVID-19, получавших терапию антиковидной плазмой по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе [26].

• **Раннее начало терапии, низкие титры антител**

Многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование, проведенное в Индии (Agarwal A. et al., Oct 2020), с участием 464 госпитализированных пациентов с COVID-19 средней тяжести, которые были рандомизированы в две группы: в 1-ой группе 235 пациентов получили две дозы антиковидной плазмы (по 250 мл) с интервалом 24 часа в дополнение к стандартной терапии, во 2-ой группе (229 человек) - только стандартную медикаментозную терапию (контрольная группа). Результаты исследования не показали улучшения выживаемости (85% против 86%) или улучшения состояния/стабилизации заболевания через 28 дней наблюдения. Средний срок от начала заболевания до переливания плазмы был коротким (6 дней), средний титр ВНА (измеренный после трансфузии плазмы) составил 1:40, что было ниже, чем средний

титр ВНА, измеренный у реципиентов до переливания плазмы (1:90) и ниже рекомендуемого уровня эффективности. Анализ исходов у пациентов, получивших плазму с титром антител 1:80 не показал улучшения, однако количество таких пациентов было крайне низким. Авторами был сделан вывод о том, что определение титров ВНА у доноров и пациентов (реципиентов плазмы) поможет дополнительно оценить эффективность антиковидной плазмы крови для терапии инфекции [27].

• **Позднее начало терапии**

Существуют две причины, по которым переливание антиковидной плазмы в поздние сроки развития заболевания является малоэффективным:

1. У большинства пациентов к 8-10 дню болезни уже будет развиваться собственный антительный ответ к SARS-CoV-2, а в донорской плазме может не наблюдаться повышения уровня антител выше уровня, обеспечиваемого эндогенной реакцией организма.

2. По мере прогрессирования заболевания тяжелые проявления могут быть в большей степени связаны с воспалительной реакцией организма на вирус, чем с действием самого вируса.

Китайские специалисты (Li L. et al., Aug 2020; Liu Z., Aug 2020) опубликовали результаты открытого, многоцентрового, рандомизированного клинического исследования, проведенного с целью оценки эффективности применения антиковидной плазмы крови. В исследование были включены 103 пациента с тяжелой формой COVID-19, у которых диагноз был подтвержден лабораторно. Пациенты были стратифицированы на две группы: первую составили больные ($n=52$), для лечения которых наряду со стандартной лекарственной терапией дополнительно применяли трансфузию антиковидной плазмы, вторую (контрольную) - больные ($n=51$), получавшие только стандартную терапию. Результаты работы показали тенденцию к улучшению клинических исходов у пациентов, получавших терапию антиковидной плазмой, однако полученные данные не достигли статистической значимости (летальность к 28 дню наблюдения составила 16% в первой группе против 24% - во второй; $p=0,3$, ОШ 0,59; 95% ДИ 0,22-1,59) [28]. Интервал времени между появлением симптомов и вливанием плазмы был длинным и составил в среднем 30 дней. Исследование с предполагаемым изначально участием 200 пациентов было прекращено досрочно, поскольку эпидемия COVID-19 в том регионе Китая, где оно проводилось, быстро пошла на убыль. Титр IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 в антиковидной плазме крови составлял не менее 1:640 (титр 1:1280 был эквивалентен титру реакции вируснейтрализации 1:80); а дозу плазмы крови для трансфузий определяли из расчета 4 - 13 мл/кг массы тела реципиента. У всех обследованных больных с тяжелым, но не критическим состоянием, после проведенной терапии отмечено достоверное статистически значимое сокращение времени до клинического улучшения состояния (4,9 дня; 95% ДИ, 9,3-0,54 дня) [28].

Специалисты из Нидерландов (Gharbharan A. et al, 2020) представили результаты исследования, разработанного как открытое многоцентровое рандомизированное

клиническое исследование с участием пациентов с ПЦР-подтвержденной инфекцией COVID-19 из 14 крупных стационаров страны. В работе сравнивали эффективность применения антиковидной плазмы с высоким титром ВНА для лечения COVID-19 и стандартной медикаментозной терапии. Пациенты - участники исследования были рандомизированы 1:1 в 2 группы: 1) получающие терапию антиковидной плазмой и 2) получающие стандартную терапию. Пациенты первой группы получили антиковидную плазму в дозе 300 мл с титром ВНА к SARS-CoV-2 не менее 1:80. Несмотря на то, что с момента появления симптомов COVID-19 до включения пациентов в исследование прошло только 10 дней, у большинства участников (55/66; 80,3%) были обнаружены антитела к SARS-CoV-2. При помощи теста нейтрализации редукции бляшек были выявлены ВНА к SARS-CoV-2 у 44 из 56 (79%) пациентов; средний титр ВНА у пациентов был сопоставим со средним титром антител у 115 доноров антиковидной плазмы (1:160 против 1:160, $p=0,40$). Эти наблюдения авторов вызвали опасения относительно потенциальной пользы применения антиковидной плазмы для исследуемой популяции, в связи с чем исследование было досрочно остановлено, и набор участников прекращен. В сравниваемых группах не наблюдалось различий по показателям летальности ($p=0,95$), срокам пребывания в стационаре ($p=0,68$) или степени тяжести заболевания на 15-й день ($p=0,58$). Таким образом, наличие ВНА к SARS-CoV-2 у большинства пациентов на момент включения их в исследование, привело авторов к выводу о непригодности его дизайна для оценки клинической эффективности антиковидной плазмы и необходимости его пересмотра для будущих исследований [29].

Исследователи из Аргентины (Simonovich V.A. et al, 2021) опубликовали результаты рандомизированного двойного слепого многоцентрового исследования с участием 334 пациентов с тяжелой формой пневмонии COVID-19, которые были госпитализированы в 12 различных клиник Аргентины. Все пациенты были рандомизированы в 2 группы в соотношении 2:1; в общей сложности 228 человек получали терапию антиковидной плазмой, а 105 пациентов - плацебо (только стандартную терапию). Возраст участников исследования был разнообразным: 55% - младше 65 лет, 33% - 65-80 лет и 12% - старше 80. У многих выявлены сопутствующие заболевания/факторы: у 45% - избыточный вес, 48% - гипертония, у 17% диабет, 44% - курительщики в прошлом, 4,4% - почечная недостаточность и др. Соотношение таких осложнений было примерно равным в обеих группах, и на конечный результат не повлияло. Объединяло этих больных наличие инфекции COVID-19 и рентгенологически подтвержденная пневмония. У части пациентов (примерно поровну в обеих группах) уровень насыщения крови кислородом был ниже 93% - гипоксемия, которая являлась наиболее частым критерием тяжести, но это не было обязательным условием участия в исследовании. Среднее время от появления симптомов до включения в исследование составляло 8 дней (в среднем от 5 до 10 дней).

Пациентам 1-ой группы вливали антиковидную плазму крови с титром антител к SARS-CoV-2 не менее 1:180 (в среднем 1:320). На 30-й день наблюдения не было

отмечено существенной разницы между группами пациентов в распределении клинических исходов (ОШ 0,83; 95% ДИ 0,52 - 1,35; $p = 0,46$). Уровень смертности в 1-ой группе составил 10,96% (25 человек), во 2-ой группе пациентов, получавших плацебо - 11,43% (12 человек), при разнице рисков -0,46 процентных пунктов (95% ДИ, от -7,8 до 6,8). Наблюдалась тенденция к повышению общих титров антител к SARS-CoV-2 у пациентов, получавших антиковидную плазму на 2-й день после трансфузии. Неблагоприятные события и серьезные нежелательные явления были схожими в обеих группах пациентов. Исследователи не обнаружили значительных различий в клиническом статусе или показателях смертности между пациентами, получавшими антиковидную плазму и пациентами, получавшими плацебо [30].

В целом по результатам проведенных исследований авторами были сделаны следующие выводы: 1) плазму крови реконвалесцентов COVID-19 можно сочетать с другими терапевтическими средствами, в том числе и противовирусными препаратами (что и проводилось в большинстве клинических исследований); 2) в случае назначения трансфузий антиковидной плазмы не следует откладывать начало терапии плазмой в ожидании возможного эффекта от других средств, а начало терапии другими препаратами не должно быть отсрочено в ожидании эффекта от применения плазмы.

Оптимальная доза

Оптимальная доза антиковидной плазмы неизвестна; выбор режима дозирования следует осуществлять в соответствии с клиническими рекомендациями (протоколами лечения), используемыми в медицинских учреждениях. В России, в соответствии с действующими нормативными актами в сфере здравоохранения, объем донации определяется врачом-трансфузиологом; суммарный объем трансфузии составляет 5-10 мл антиковидной плазмы/кг веса пациента, в среднем 400-600 мл [5].

В обсервационных исследованиях обычно используется одна (в объеме 200 - 250 мл) или две дозы плазмы.

- В случае отсутствия или недоступности протоколов, рекомендуется применять одну или две дозы плазмы за одно введение.

- Определение дозы для детей ограничено клиническими испытаниями, обычно объем дозы зависит от массы тела.

Оптимальная доза зависит от уровня антител. Например, трансфузия небольших (по объему) доз плазмы с высокими титрами антител, определенными по результатам исследования в реакции нейтрализации, может быть одинаково эффективной, как и применение больших доз плазмы с низкими титрами антител, определенными в ИФА. На этапе принятия решений об оптимальной дозе очень важны консультации врачей -специалистов разного профиля (инфекционистами, вирусологами и трансфузиологами).

Кратность трансфузий

На данный момент данные о целесообразности трансфузии более 1 дозы или повторного вливания антиковидной плазмы отсутствуют. Продолжительность действия неизвестна.

Было высказано предположение, основанное на опыте терапевтического применения других препаратов на основе антител, что эффективность плазмы крови переболевших будет зависеть от присутствия в ней ВНА в количестве достаточном для лечения, сохраняющимся на протяжении от нескольких недель до нескольких месяцев. Для большинства пациентов присутствие антител в плазме в течение такого временного периода, вероятно, будет обеспечивать достаточную нейтрализацию вируса до полного выздоровления пациента или до тех пор, пока у него не сформируется эндогенный иммунный ответ на вирус. На основании вышеизложенного был сделан вывод, что в большинстве случаев для терапии лиц с ослабленным иммунитетом будет достаточно одной дозы плазмы.

Однако в отдельных случаях целесообразно повторная трансфузия плазмы, например, в тех случаях, когда у пациентов отмечен некоторый положительный эффект после однократной трансфузии плазмы, но еще сохраняются признаки активной инфекции. В РФ для повышения клинической эффективности рекомендуется использовать 2 трансфузии антиковидной плазмы с интервалом 12-24 ч. в объеме 200-325 мл, заготовленной от разных доноров [5]. Результаты некоторых клинических исследований демонстрируют положительный эффект от повторного введения дозы плазмы, особенно у пациентов в критическом состоянии. Однако многократные трансфузии могут увеличить риск перегрузки кровообращения, связанной с переливанием крови (ТАСО - transfusion-associated circulatory overload), особенно у лиц с осложненным течением легочной патологии.

В том случае, если антиковидная плазма будет использоваться в качестве профилактического (а не только терапевтического) средства у лиц с высоким риском инфицирования, необходимо будет определить оптимальный режим дозирования и кратность введения препарата. Клинические испытания продолжаются, но данные о применении антиковидной плазмы с профилактической целью отсутствуют.

Варианты вируса SARS-CoV-2

Предварительные данные ряда исследований (Wibmer C.K. et al., 2021; Cele S. et al., 2021) показывают, что терапия антиковидной плазмой может быть менее эффективной у лиц, инфицированных определенными вариантами SARS-CoV-2, такими как вариант, идентифицированный в Южной Африке (известный как линия B.1.351 или 20H/501Y.V2). Этот вариант несет несколько мутаций, в том числе три - RBD S-белка вируса (N501Y, K417N и E484K). Несмотря на возможное снижение эффективности терапии антиковидной плазмой, инфицирование одним из этих вариантов не является безусловным основанием для отказа от ее использования, особенно в случаях целесообразности применения и в ходе клинических испытаний. Для более глубокого изучения данной проблемы необходимо проведение дополнительных научных исследований [31,32].

В настоящее время еще недостаточно убедительных доказательств эффективности антиковидной плазмы для лечения пациентов с COVID-19 [33], однако полученные результаты ряда опубликованных контролируемых и

нескольких серий неконтролируемых научных исследований свидетельствуют о положительных эффектах ее клинического использования [23, 28, 34]. На основании полученных данных большинство исследователей приходят к выводу о том, что в отсутствие биоинженерных ВНА и эффективной этиотропной терапии применение гипериммунной плазмы реконвалесценто́в является наиболее простым и эффективным средством специфической этиопатогенетической терапии тяжелых форм COVID-19. Это нашло отражение в руководстве ВОЗ и национальных руководствах разных стран (в том числе России) по лечению COVID-19.

Литература

1. Maintaining a safe and adequate blood supply and collecting convalescent plasma in the context of the COVID-19 pandemic: interim guidance, 17 February 2021. World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/339793>
2. FDA. Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma. Feb 11, 2021 <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-applications-inds-cber-regulated-products/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma>
3. Casadevall A., Pirofski L.A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J Clin Invest* 2020; Apr 1; 130(4):1545-8.
4. Bloch E.M., Shoham S., Casadevall A., Sachais B.S., Shaz B., Winters J.L. et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest* 2020; Jun 1; 130(6):2757-65.
5. Временные методические рекомендации министерства здравоохранения РФ "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)", версия 13.1 от 09.11. 2021 г. - 235 с.
6. Marovich M., Mascola J.R., Cohen M.S. Monoclonal antibodies for prevention and treatment of COVID-19. *JAMA* 2020; Jul 14; 324(2):131-2.
7. Liu S.T.H., Lin H.M., Baine I., Wajnberg A., Gumprecht J.P., Rahman F. et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat Med*, Nov 2020; 26(11):1708-13.
8. Roberts D.J., Mifflin G., Estcourt L. Convalescent plasma for COVID-19: back to the future. *Transfus Med* 2020; Jun; 30(3):174-6.
9. Ye Q., West A.M.V., Silletti S., Corbett K.D. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Sci.* 2020 Sep; 29(9):1890-1901.
10. Sun B., Feng Y., Mo X., Zheng P., Wang Q., Li P. et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020; Dec; 9(1):940-8.
11. Klein S., Pekosz A., Park H.S., Ursin R.L., Shapiro J.R., Benner S.E. et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest.* 2020 Nov 2; 130(11):6141-50.
12. Wu F., Liu M., Wang A., Lu L., Wang Q., Gu C. et al. Evaluating the association of clinical characteristics with neutralizing antibody levels in patients who have recovered from mild COVID-19 in Shanghai, China. *JAMA Intern Med.* 2020 Oct 1;180(10):1356-62

13. Long Q.X., Tang X.J., Shi Q.L., Li Q., Deng H-J., Yuan J. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; Aug;26(8):1200-4
14. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 2020 Oct 29; 383(18):1724-34
15. Prus K., Alquist C.R., Cancelas J.A., Oh D. Decrease in serum antibodies to SARS-CoV-2 in convalescent plasma donors over time. *Transfusion.* 2021, Feb; 61(2):651-4
16. Perreault J., Tremblay T., Fournier M.J., Drouin M., Beaudoin-Bussieres G., Prevost J. et al. Waning of SARS-CoV-2 RBD antibodies in longitudinal convalescent plasma samples within 4 months after symptom onset. *Blood.* 2020 Nov 26; 136(22): 2588-91
17. Middelburg R.A., Porcelijn L., Lardy N., Briet E., Vrieling H. Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population. *Vox Sang.* 2011;100(3):327-35
18. Klassen S.A., Senefeld J.W., Johnson P.W., Carter R.E., Wiggins C.C., Shoham S. et al. The effect of convalescent plasma therapy on mortality among patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2021; 96(5):1262-75
19. Murphy M., Estcourt L., Grant-Casey J., Dzik S. International survey of trials of convalescent plasma to treat COVID-19 infection. *Transfus Med Rev.* 2020 Jul ; 34(3):151-7
20. US Food and Drug Administration. Emergency use authorization for convalescent plasma. <https://www.fda.gov/media/141477/download>
21. Libster R., Perez Marc G., Wappner D., Coviello S., Bianchi A., Braem V., Esteban I. et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med.* 2021 Feb 18;384(7):610-8
22. Avendano-Sola C., Ramos-Martinez A., Munez-Rubio E., Ruiz-Antoran B., Malo de Molina R., Torres F. et al. Convalescent plasma for COVID-19: a multicenter, randomized clinical trial. *medRxiv* preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.20182444>
23. Joyner M.J., Senefeld J.W., Klassen S.A., Mills J.R., Johnson P.W., Theel E.S. et al. Effect of convalescent plasma on mortality among hospitalized patients with COVID-19: initial three-month experience. *medRxiv.* 2020 Aug 12; 2020.08.12.20169359
24. Joyner M.J., Carter R.E., Senefeld J.W., Klassen S.A., Mills J.R., Johnson P.W. et al. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19. *N Engl J Med.* 2021 Mar 18;384(11):1015-27
25. Salazar E., Christensen P.A., Graviss E.A., Nguyen D.T., Castillo B., Chen J. et al. Significantly decreased mortality in a large cohort of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients transfused early with convalescent plasma containing high-titer anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike protein IgG. *Am J Pathol.* 2021 Jan; 191(1):90-107
26. Shenoy A.G., Hettinger A.Z., Fernandez S.J., Blumenthal J., Baez V. Early mortality benefit with COVID-19 convalescent plasma: a matched control study. *Br J Haematol.* 2021 Feb;192(4):706 -13
27. Agarwal A, Mukherjee A., Kumar G., Chatterjee P., Bhatnagar T., Malhotra P. Convalescent plasma in the management of moderate Covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial). *BMJ.* 2020 Oct 22;371:m3939
28. Li L., Zhang W., Hu Y., Tong X., Zheng S., Yang J. 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. *JAMA.* 2020 Aug 4;324(5):460-70
29. Gharbharan A., Jordans C.C.E., Geurtsvankessel C., den Hollander J.G., Karim F., Femke P. N. Convalescent plasma for COVID-19. A randomized clinical trial. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.01.20139857v1>
30. Simonovich V.A., Burgos Pratz L.D., Scibona P., Beruto M.V., Vallone M.G., Vozquez C. et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med.* 2021 Feb 18; 384(7):619-29
31. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med.* 2021 Apr; 27(4):622-5
32. Cele S., Gazy I., Jackson L., Hwa S-H., Tegally H., Lustig G. et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 variants from neutralization by convalescent plasma. *Nature.* 2021 May; 593(7857):142-6
33. Chai K.L., Valk S.J., Piechotta V., Doree C., Monsef I., Wood E.M. et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Jul 10; 7(7):CD013600
34. Casadevall A., Joyner M.J., Pirofski L-A.A. Randomized trial of convalescent plasma for COVID-19 - potentially hopeful signals. *JAMA.* 2020 Aug 4; 324(5):455-7

Вакцины против COVID-19: основные подходы к их созданию, особенности применения на практике и исследования по оценке безопасности, иммуногенности и эффективности

ООО "НПО "Диагностические системы", г. Нижний Новгород

В всем мире продолжается пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, сопровождающаяся высокой заболеваемостью и смертностью. С начала пандемии по декабрь 2021 г. из доступных источников известно о более 269 млн случаев инфекции в мире и свыше 5 млн летальных исходов. По общему количеству выявленных случаев среди регионов мира первое место занимает Американский регион (более 98 млн); в Европейском регионе зафиксирован максимальный прирост (20,4 на 100 тыс. населения; 0,44%). Наибольшее число случаев на 100 тыс. населения зафиксировано в Юго-Восточной Азии (6237,2). В Российской Федерации за период с марта 2020 г. по декабрь 2021 г. зарегистрировано свыше 10 млн случаев COVID-19 в 85 субъектах страны и более 290 тыс. смертельных исходов [1,2].

Согласно современным данным, выраженность клинических проявлений COVID-19 варьирует от бессимптомных или легких форм инфекции до крайне-тяжелых, опасных для жизни форм инфекции, часто приводящих к летальному исходу [3]. Практически все ведущие производители лабораторного оборудования и тест-систем в мире ответили на этот вызов с рекордной скоростью, что позволило провести крупномасштабные лабораторные тестирования COVID-19 с охватом значительной части населения и получить ценную информацию для разработки мер по защите населения от этой инфекции (Sethuraman N. et al., Jun 2020; Melgosa J.G. et al., Jul 2020; Manners C. et al., Jun 2020). Важным шагом в этом направлении стали разработка

и внедрение новых эффективных вакцин против COVID-19, число которых с момента начала пандемии стремительно растет. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по состоянию на начало декабря 2021 г. 28 вакцин одобрены для применения как минимум в одной стране, 194 вакцины-кандидата находятся в доклинической разработке и 167 вакцин-кандидатов - на разных стадиях клинических испытаний. База данных ВОЗ о перспективах разработок новых вакцин-кандидатов против COVID-19 во всем мире обновляется два раза в неделю [4]. Кроме того, на сайте RAPS (Regulatory Affairs Professionals Society) - Всемирной организации по регуляторным вопросам в сфере здравоохранения и сопутствующих товаров (лекарственных средств, медицинских изделий, биопрепаратов) - размещен "Трекер вакцин против COVID-19" ("COVID-19 vaccine tracker") - программа, позволяющая отслеживать изменения в разработке вакцин против COVID-19; информация обновляется раз в две недели [5].

Значительные успехи, достигнутые за последние несколько десятилетий в развитии прикладных естественных наук и инновационных технологий за счёт ультрасовременных иммуно-биотехнологических, молекулярно-генетических, генно-инженерных, микробиологических и вирусологических исследований, позволили существенно усовершенствовать подходы к разработке и созданию вакцин. Последовательная смена технологий создания вакцин с использованием как классических, так и современных методов схематично представлена на рис. 1 [6].

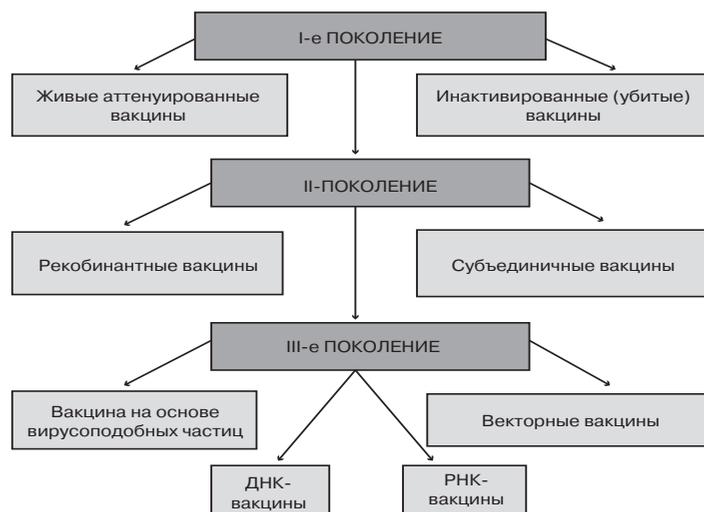


Рис. 1. Классификация вакцин по поколениям [6].

Наличие большого количества различных вакцин против COVID-19 (созданных и находящихся в разработке) повышает вероятность того, что какие-либо из них будут признаны безопасными и эффективными для иммунизации различных (в первую очередь, приоритетных) категорий

населения. При создании вакцин против инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, используют различные платформы, как традиционные технологии производства вакцин, так и инновационные методы на основе векторов, а также ДНК или РНК [7].



Рис. 2. Основные подходы к созданию вакцин [8].

Для разных платформ вакцин требуются разные производственные мощности. Для производства цельновирусных вакцин (живых аттенуированных или цельных инактивированных) необходимо культивировать большое количество вируса, для чего необходимо соблюдение строгого регулирования по соображениям биологической

безопасности. В отличие от производства вакцин на основе РНК и ДНК, для производства цельновирусных вакцин не требуется биопроизводства микроорганизмов на базе реакторов. Характеристика основных видов вакцин против COVID-19 представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики основных видов вакцин против COVID-19

№	Типы вакцин	Технологические платформы	Основные характеристики/особенности
1	Живые аттенуированные вакцины (ЖАВ)	Производят из патогенов вызывающих заболевание (вирусов или бактерий), которые были ослаблены в лабораторных условиях.	Патогены развиваются в организме вакцинированного человека и стимулируют иммунный ответ; могут вызывать заболевание в легкой форме. ЖАВ содержат генетически аттенуированные (ослабленные) версии вируса дикого типа, которые способны к саморепликации в клетках организма хозяина, благодаря чему ЖАВ стимулируют иммунный ответ, но заболевание развиваться не будет. Для ослабления вируса его выращивают в неблагоприятных условиях (при пониженной температуре или культуре клеток другого вида) либо вводят направленные генетические модификации в его геном, при этом вирулентность теряется, но иммуногенность сохраняется. Важный плюс ЖАВ - возможность интраназального введения. Однако проблема безопасности ЖАВ - способность аттенуированных вирусов вернуться в патогенную форму (вирус дикого типа). <u>Примерами ЖАВ</u> против COVID-19 являются: BCG vaccine (Мельбурнский университет/Университет Неймегена, Нидерланды/США/Австралия) и COVI-VAC (Codagenix/Институт сыворотки Индии, США/Индия), находящиеся на стадии клинических испытаний (КИ). На поздних стадиях КИ таких вакцин пока нет [4, 7].
2	Инактивированные вакцины (ИВ)	Изготавливают из вирулентных вирусов, выращенных в культуре клеток, инактивированных химическими или физическими методами (при этом сохраняется иммуногенность).	Содержат большое количество антигена вируса, чтобы вызвать иммунный ответ и выработку антител. ИВ получают путем выращивания SARS-CoV-2 в культуре клеток (обычно на клетках Vero) с последующей химической инактивацией коронавируса [9]. Инактивированный вирус часто комбинируют с адьювантом в вакцине для стимуляции иммунного ответа. Для производства таких вакцин необходимы технологические платформы с высоким уровнем биобезопасности. Иммунные ответы при введении ИВ будут нацелены не только на S-белок SARS-CoV-2, но и на другие белки вируса. <u>Примерами</u> зарегистрированных ИВ против COVID-19 являются: CoronaVac (Sinovac, Китай), Covaxin (Bharat Biotech, Индия), Sinopharm (Sinopharm/Институт биологических препаратов Уханя, Китай), Кови-Вак (Центр Чумакова, Россия), BBIBP-CoV (Sinopharm/Институт биологических препаратов Пекина, Китай) [4].

№	Типы вакцин	Технологические платформы	Основные характеристики/особенности
3	Рекомбинантные белковые вакцины (РБВ)	РБВ - это генно-инженерные вакцины, которые получают, встраивая в геном непатогенных для человека микроорганизмов-векторов ген, отвечающий за синтез необходимого антигена. В качестве векторов используют живые аттенуированные вирусы, бактерии, дрожжи или эукариотические клетки, в которые встраивают ген, кодирующий образование протективного антигена возбудителя против которого будет направлена вакцина.	Рекомбинантные белки в РБВ могут экспрессироваться в различных системах экспрессии, включая клетки насекомых и млекопитающих, дрожжевые клетки и растения. Выходы, а также тип и степень пост-трансляционных модификаций варьируются в зависимости от системы экспрессии. Преимущество РБВ состоит в том, что не требуется репликации живого вируса, однако выход продукции зависит от способности экспрессировать S-белок. Среди РБВ против COVID-19 различают рекомбинантные вакцины на основе S-белка, рекомбинантные вакцины на основе RBD и вакцины на основе вирусоподобных частиц (VLP). РБВ обычно вводят инъекционным путем (внутримышечно). <u>Пример РБВ - и ZF2001 (Институт микробиологии, Китай) [4, 7].</u>
4	Субъединичные вакцины (СВ)	В СВ используются только специфические фрагменты (субъединицы) вирусов или бактерий, способные индуцировать иммунный ответ. Они не содержат целых микроорганизмов или безопасных вирусов в качестве вектора. В качестве субъединиц используются фрагменты белка и/или полисахариды патогена.	Против вируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, разрабатываются только белковые СВ, которые могут стимулировать формирование протективного иммунитета. Вакцина, в состав которой входит очищенный иммуногенный вирусный белок, без-опасна, стабильна, не содержит дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, которые могли бы вызвать нежелательные побочные реакции при вакцинации. Однако с получением вирусных белков есть свои сложности: полный размерный белок труднее экспрессировать, а вакцина на основе фрагмента может оказаться бесполезной против штаммов, у которых этот фрагмент изменился в результате мутации. <u>Примеры СВ - ЭпиВакКорона (Государственный научный центр "Вектор", Россия), Novavax (США), содержащая наночастицы с полным размерным S-белком коронавируса [4].</u>
5	Векторные вакцины (ВВ)	Вакцины, созданные на основе вирусных векторов не содержат антигены, а используют собственные клетки организма для их производства. Это достигается с помощью модифицированного вируса (вектора), который используется для доставки генетического кода антигена в клетки человека. В ВВ против COVID-19 таким антигеном являются S-белки. Существуют два основных типа ВВ - 1) вакцины на основе <i>нереплицирующего вектора</i> , которые не способны производить новые вирусные частицы векторного вируса; они нужны исключительно для производства вакцинного антигена; большинство таких вакцин основаны на аденовирусных векторах (AdV); 2) вакцины на основе <i>реплицирующего вектора</i> - производят новые вирусные частицы вектора в инфицированных ими клетках, которые затем продолжают заражать новые клетки, делая их способными производить вакцинный антиген.	Для ВВ против COVID-19: -используют вирусные векторы, не способные к репликации; -встраивают генетический материал вектора в клетки организма человека; -клетки человека начинают вырабатывать антиген, который затем распознается иммунной системой Одним из недостатков нереплицирующихся ВВ является то, что некоторые из этих векторов поражаются и частично нейтрализуются уже существующим иммунитетом к вирусу, использованному в качестве вектора, что может ослаблять иммуногенность вакцины [10]. Этого можно избежать, применяя типы векторов, не распространенных у людей (векторы, полученные из вирусов животных, таких как аденовирус шимпанзе). Большинство ВВ нереплицирующихся SARS-CoV-2 сконструированы для экспрессии S-белка, что приводит к иммунному ответу хозяина на этот белок. Предназначены для внутримышечного введения. <u>Примерами зарегистрированных нереплицирующихся ВВ являются: Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) (Центр Гамалеи, Россия), Convidicea (CanSino Biologics, Китай), AZD1222 (Oxford/ AstraZeneca) (AstraZeneca/Оксфордский университет, Швеция/Великобритания), COVID-19 Vaccine Janssen (Johnson & Johnson, Нидерланды/ США) [5].</u> <u>Пример реплицирующихся ВВ - DelNS1-2019-nCoV-RBD-OPT1 (Университет Сямьнь, Китай) - в разработке, зарегистрированные отсутствуют.</u>
6	ДНК-вакцины	Создаются на основе ДНК конструкции, которая встраивается в вектор, в качестве которого выступают плазмиды, фаги, вирусы, липосомы, эукариотические клетки.	Вектор со встроенной ДНК вводится в организм вакцинируемого, в котором происходит синтез протективного антигена. ДНК-вакцина способствует активации обеих ветвей иммунитета - гуморальной и клеточной. ДНК-вакцины обеспечивают долговременную экспрессию антигена и устойчивый иммунный ответ, но более слабый по сравнению с цельновирионными. Минус ДНК-вакцин - невысокая иммуногенность известных вариантов. Для усиления иммуногенности и эффективности ДНК-вакцин используют различные адьюванты. А для введения ДНК-вакцин необходимы специальные устройства доставки (электропораторы), что ограничивает широкое применение этих вакцин. ДНК-вакцины должны достичь ядра клетки, чтобы транскрибироваться в мРНК и генерировать белки для стимуляции иммунного ответа. Разрабатываемые ДНК-вакцины против COVID-19 содержат ген, кодирующий S-белок SARS-CoV-2, который экспрессируется при доставке. <u>Примеры ДНК-вакцин, которые находятся на стадии клинических испытаний: INO-4800 (Inocio Pharmaceuticals, США/Южная Корея), AG0301-COVID19 (AnGes Inc., Япония), ZyCoV-D (Zydus Cadila, Индия); зарегистрированных нет [5].</u>

№	Типы вакцин	Технологические платформы	Основные характеристики/особенности
7	РНК-вакцины	Появились относительно недавно. Подобно ДНК-вакцинам, генетическая информация об антигене доставляется вместо самого антигена, и затем антиген экспрессируется в клетках вакцинированного человека. Применяются два основных подхода: 1) использование нереплицирующейся мРНК (модифицированной), кодирующей, как правило, только один антиген; 2) получение самоамплифицирующегося РНК-репликона из одноцепочечных (+/-) РНК вирусов, в геноме которых структурные гены заменены на гены, кодирующие необходимые антигены и РНК-полимеразу.	Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции <i>in vitro</i> из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плазмиды, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов. РНК-вакцины стали первыми вакцинами против COVID-19 и представляют собой совершенно новую технологию. После введения РНК транслируется в целевой белок, который призван вызвать иммунный ответ. При этом мРНК остается в цитоплазме клетки и не проникает в ядро. мРНК-вакцины не интегрируются в геном клетки организма человека и не взаимодействуют с его ДНК. Преимущество новой технологии в том, что вакцину можно производить полностью <i>in vitro</i> . Однако для хранения вакцин требуется ультранизкая температура. <u>Зарегистрированы</u> и активно применяются такие РНК-вакцины как: Comirnaty (Pfizer/BioNTech/Fosun Pharma, США/Германия/Китай) и Moderna (Moderna/NIAD, США), на стадии клинических испытаний находятся ещё 5 вакцин [5].

Сообщается, что усилия специалистов из разных стран по созданию безопасной и эффективной вакцины против COVID-19 и внедрению вакцинации в национальном и глобальном масштабе приносят свои плоды.

В настоящее время во всем мире свыше двух десятков вакцин разрешены или одобрены к использованию одной или несколькими странами, многие другие остаются в разработке. На сайте RAPS размещена новая информация о вакцинах от Pfizer/BioNTech (США, Германия), Moderna (США), AstraZeneca (Великобритания), Российского фонда прямых инвестиций (РФПИ), Janssen Vaccines (Нидерланды, США), Sinovac (Китай), Sinopharm (Китай), Bharat Biotech (Индия) и Иранской организации оборонных инноваций и исследований (IODIR), а также о вакцинах-кандидатах производства Novavax (США) и Valneva (Франция) [5].

ВОЗ формирует список рекомендованных для экстренного применения вакцин против COVID-19, чтобы информировать страны о том, что эти препараты прошли процедуру рассмотрения на основе критериев эффективности и безопасности. До недавнего времени ВОЗ рекомендовала для экстренного применения семь препаратов: это вакцины китайских компаний Sinopharm и Sinovac, вакцина Comirnaty, разработанная совместно компаниями Pfizer из США и BioNTech из Германии, препарат компании Janssen, которая является подразделением американской Johnson & Johnson, вакцина американской компании Moderna, а также два варианта вакцины британско-шведской фирмы AstraZeneca и Оксфордского университета, а в начале ноября 2021 г. этот список был пополнен восьмой индийской вакциной Covaxin (табл.2) [11]. В процессе на одобрение ВОЗ находятся еще более 10 вакцин, среди них российские "Спутник V" и "ЭпиВакКорона".

Таблица 2

Вакцины против COVID-19 рекомендованные ВОЗ для экстренного применения [11]

Компания - производитель	Sinopharm	Sinovac	Pfizer/ BioNTech	Janssen (Johnson & Johnson)
Страна - производитель	Китай	Китай	США, Германия	США
Название вакцины	BBIBP-CoV	CoronaVac	Comirnaty (tozinameran, BNT162b2)	JNJ-78436735; Ad26.COV2.S
Тип вакцины/ платформа	Инактивированная вакцина	Инактивированная вакцина (формалин с квасцовым адьювантом)	мРНК	Вакцина на основе нереплицирующего вектора
Эффективность	Эффективность вакцины против симптоматической COVID-19 составила 79% через 14 или более дней после введения 2 дозы	Эффективность вакцины против симптоматической COVID-19 составила 51% через 14 или более дней после введения 2 дозы; против тяжелой формы COVID-19 - 100%	Эффективность вакцины против симптоматической COVID-19 составила 95%	Эффективность вакцины против симптоматической и тяжелой форм COVID-19 составила 66,9%
Режим дозирования/ пути введения	2 дозы (по 0,5 мл), внутримышечно, с интервалом 3-4 нед.	2 дозы (по 0,5 мл), внутримышечно, с интервалом 2-4 нед.	2 дозы (по 0,5 мл), внутримышечно, с интервалом 21-28 дн.	1 доза (0,5 мл), внутримышечно
Возрастная категория	18-60 лет	18-60 лет	Старше 16 лет	18 лет и старше
Эффективность в отношении новых вариантов SARS-CoV-2	Эффективность вакцины против VOC вариантов SARS-CoV-2 не оценивалась	Эффективность вакцины против P.1 варианта SARS-CoV-2 - 49,6%; против варианта P.2 - 50,7%	Эффективна против различных вариантов SARS-CoV-2	Эффективна против различных вариантов SARS-CoV-2, включая B.1.351 и P.1

Компания - производитель	Moderna	Два варианта Oxford/AstraZeneca, от двух производителей:		Bharat Biotech
Страна - производитель	США	AstraZeneca-SKBio, Республика Корея	Институт сывороток, Индия	Индия
Название вакцины	mRNA-1273	AZD 1222 (Covishield)		COVAXIN (BBV152)
Тип вакцины/ платформа	mРНК	Аденовирусная векторная вакцина		Инактивированная вакцина
Эффективность	Эффективность вакцины составила 94,1% через 14 дней после введения первой дозы	Эффективность вакцины составила 63,09% против симптоматической инфекции COVID-19		Эффективность вакцины составила 78% против COVID-19 любой степени тяжести через 14 или более дней после введения 2 дозы. Эффективность вакцины против тяжелого заболевания составила 93%; против бессимптомной инфекции - 64%
Режим дозирования/ пути введения	2 дозы (100 мкг; 0,5 мл каждая), внутримышечно, с интервалом 28 дн.	2 дозы (по 0,5 мл), внутримышечно, с интервалом 8 - 12 нед.		2 дозы (по 0,5 мл), внутримышечно, с интервалом 4 нед.
Возрастная категория	18 лет и старше	18-65 лет и старше		18-60 лет
Эффективность в отношении новых вариантов SARS-CoV-2	Эффективна против вариантов SARS-CoV-2, включая B.1.1.7 и 501Y.V2	Об эффективности не сообщается, но вакцину рекомендовано использовать в соответствии с Дорожной картой ВОЗ по приоритизации, даже если в стране присутствуют варианты вируса SARS-CoV-2		Эффективность вакцины против всех вариантов SARS-CoV-2 составила 71%; эффективность против варианта "каппа" - 90% и 65% против варианта "дельта"

В Российской Федерации для вакцинации против COVID-19 взрослых лиц зарегистрированы вакцины "ЭпиВакКорона", "КовиВак", "Спутник Лайт" и "ЭпиВак-Корона-Н" (табл.3). "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V"), "Гам-КОВИД-Вак-Лио",

Таблица 3

Вакцины против COVID-19 зарегистрированные в России *)

Название	Параметры	"Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V")	"Гам-КОВИД-Вак-Лио"	"ЭпиВакКорона"	"КовиВак"	"Спутник Лайт"	"ЭпиВакКорона-Н"
Производитель		НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи	НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи	ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора	ФНЦ им. М.П. Чумакова	НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи	ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора
Дата регистрации		11.08.2020	25.08.2020	13.10.2020	19.02.2021	06.05.2021	26.08.2021
Способ получения, состав препарата		Комбинированная векторная вакцина, состоит из 2-х компонентов, в составе компонента I - рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа (rAd26), содержащие ген S-белка SARS-CoV-2; в составе компонента II - рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа (rAd5), содержащие ген S-белка SARS-CoV-2 Вакцина получена биотехнологическим путем, при котором не используется патогенный для человека вирус SARS-CoV-2	Комбинированная векторная вакцина, состоит из 2-х компонентов, в составе компонента I - рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа (rAd26), содержащие ген S-белка SARS-CoV-2; в составе компонента II - рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа (rAd5), содержащие ген S-белка SARS-CoV-2 Вакцина получена биотехнологическим путем, при котором не используется патогенный для человека вирус SARS-CoV-2	Вакцина на основе трех пептидных антигенов S-белка SARS-CoV-2 Вакцина представляет собой химически синтезированные пептидные антигены S-белка вируса SARS-CoV-2, конъюгированные с белком-носителем и адсорбированные на алюминийсодержащем адъюванте (алюминия гидроксиде)	Вакцина коронавируса инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная Вакцина представляет собой очищенную концентрированную суспензию коронавируса SARS-CoV-2 штамм "AYDAR-1", полученного путем репродукции в перививаемой культуре клеток линии Vero, инактивированного бета-пропиолактоном	Векторная вакцина, однокомпонентная; содержит рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа (rAd26). Вакцина получена биотехнологическим путем, при котором не используется патогенный для человека вирус SARS-CoV-2	Вакцина на основе пептидных антигенов S-белка SARS-CoV-2 Вакцина представляет собой химически синтезированные пептидные антигены S-белка вируса SARS-CoV-2, конъюгированные с белком-носителем и адсорбированные на алюминийсодержащем адъюванте (алюминия гидроксиде)

Название	Параметры	"Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V")	"Гам-КОВИД-Вак-Лио"	"ЭпиВакКорона"	"КовиВак"	"Спутник Лайт"	"ЭпиВакКорона-Н"
Форма выпуска	Раствор для в/м введения, два вида - замороженный препарат и жидкий препарат	Лиофилизат для приготовления раствора для в/м введения, двухкомпонентный (компонент I и компонент II)	Суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл (1 доза)	Суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл (1 доза)	Суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл (1 доза)	Раствор для в/м введения, два вида - замороженный препарат и жидкий препарат	Суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл (1 доза)
Иммунологическая эффективность (ИЭ)	<p>ИЭ изучали в различных клинических исследованиях (КИ). Иммуногенность оценивали по содержанию специфических IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 и вируснейтрализующих антител, а также по образованию специфических Т-хелперных (CD4+) и цитотоксических (CD8+) лимфоцитов.</p> <p>Результаты КИ показали, что вакцина формирует напряженный антиген-специфический клеточный противоифекционный иммунитет иммунитета в отношении COVID-19 практически у всех обследованных добровольцев. По данным промежуточных КИ эпидемиологическая эффективность составила более 91% (КИ продолжаются)</p>	<p>ИЭ изучали в клин. исследовании (КИ) Иммуногенность оценивали по содержанию специфических IgG к S-белку SARS-CoV-2 и вируснейтрализующих антител, а также по образованию специфических Т-хелперных (CD4+) и цитотоксических (CD8+) лимфоцитов.</p> <p>Результаты КИ показали, что вакцина индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунитета в отношении COVID-19. Эпидемиологическую эффективность не исследовали</p>	<p>Вакцина стимулирует выработку иммунитета в отношении инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, после двукратного внутримышечного применения с интервалом 21 день</p> <p>КИ по изучению эпидемиологической эффективности не проводились.</p>	<p>Вакцина стимулирует выработку иммунитета в отношении инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. КИ по изучению эпидемиологической эффективности не проводились.</p>	<p>ИЭ изучали в различных КИ. Результаты КИ показали, что вакцина индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунитета в отношении COVID-19 после однократной иммунизации.</p>	<p>Вакцина стимулирует выработку иммунитета в отношении инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, после двукратного внутримышечного применения с интервалом 21 день</p> <p>КИ по изучению эпидемиологической эффективности не проводились.</p>	
Пути введения и режим дозирования	Предназначена только для внутримышечного введения. Вакцинацию проводят в два этапа: вначале компонентом I в дозе 0,5 мл, затем, через 3 недели - компонентом II в дозе 0,5 мл	Предназначена для внутримышечного введения. Содержимое флакона предварительно растворяют в 1,0 мл воды для инъекций. Вакцинацию проводят в два этапа (режим "прайм-буст"): вначале компонентом I, затем через 3 недели компонентом II.	Предназначена для двукратного внутримышечного введения с интервалом не менее 14-21 день в дозе 0,5 мл	Предназначена для двукратного внутримышечного введения, двукратно с интервалом 2 недели в дозе 0,5 мл	Предназначена только для внутримышечного введения; I доза препарата 0,5 мл. Строго запрещено внутривенное введение.	Предназначена только для внутримышечного введения; I доза препарата 0,5 мл. Строго запрещено внутривенное введение.	Предназначена только для внутримышечного введения, двукратно с интервалом не менее 14-21 день в дозе 0,5 мл
Возрастная категория/ особые указания	Показано применение у лиц старше 18 лет	Показано применение у взрослых 18 - 60 лет	Показано применение у взрослых 18 - 60 лет	Показано применение у взрослых 18 - 60 лет	Показано применение у взрослых 18-60 лет. По результатам КИ возможно применение препарата для вакцинации ранее переболевших COVID-19 после снижения титра антител с целью предотвращения повторных случаев заболевания	Показано применение у взрослых 18-60 лет. По результатам КИ возможно применение препарата для вакцинации ранее переболевших COVID-19 после снижения титра антител с целью предотвращения повторных случаев заболевания	Показано применение у взрослых 18-60 лет; в первую очередь - лицам с повышенным риском инфицирования

Название	Параметры	"Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V")	"Гам-КОВИД-Вак-Лео"	"ЭпиВакКорона"	"КовиВак"	"Спутник Лайт"	"ЭпиВакКорона-Н"
Условия хранения		Замороженный препарат - хранить в защищенном от света месте, при температуре не выше минус 18°C. Повторное замораживание не допускается. Жидкий препарат - в защищенном от света месте, при температуре от 2° до 8°C. Не замораживать.	В соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от 2° до 8°C в защищенном от света месте. Не допускается хранение восстановленного препарата	При температуре от 2° до 8°C. Не замораживать.	При температуре от 2° до 8°C. Замораживание не допускается.	Замороженный препарат - хранить в защищенном от света месте, при температуре не выше минус 18°C. Повторное замораживание не допускается. Жидкий препарат - в защищенном от света месте, при температуре от 2° до 8°C. Не замораживать.	При температуре от 2° до 8°C. Не замораживать.
Срок годности		Компонента I - 2 мес.; компонента II - 2 мес. Не применять по истечении срока годности.	Компонента I - 6 мес., компонента II - 6 мес. Не применять по истечении срока годности.	6 мес. Не применять по истечении срока годности.	6 мес. Не применять по истечении срока годности.	Замороженный препарат - 6 мес.; жидкий препарат - 1 мес. Не применять по истечении срока годности.	6 мес. Не применять по истечении срока годности

*) Данные инструкций по применению на декабрь 2021 г

Ассортимент выпускаемых и регистрируемых в России вакцинных препаратов постоянно пополняется. Так сообщается, что 24.11.2021 г. Минздрав России зарегистрировал вакцину "Гам-КОВИД-Вак-М" (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) для иммунизации подростков в возрасте 12-17 лет, которую, наряду с вакцинами "Спутник V" и "Спутник Лайт", планируется поставлять и на международные рынки [www.rdif.ru].

Вакцинация взрослого населения против COVID-19 в России проводится в соответствии с "Временными методическими рекомендациями Минздрава России "Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19 (письмо Минздрава России от 24.08.2021 №30-4/И/2-13501). С 18.01.2021 г. в Российской Федерации проводится массовая вакцинация населения против COVID-19 [12].

Эффективность и безопасность российских вакцин против COVID-19 по результатам клинических испытаний

Производители российских вакцин, таких как "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V"), "Стутник Лайт", "ЭпиВакКорона" опубликовали результаты клинических исследований этих препаратов, продемонстрировавшие их эффективность и безопасность, в некоторых международных и отечественных профильных научных изданиях.

Так, специалисты Федерального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Логунов Д.Ю и соавт.), создавшие вакцину "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V") для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, представили результаты исследований в ведущем рецензируемом медицинском журнале "Lancet" первоначально в сентябре 2020 г. - по итогам I-II фаз клинических испытаний вакцины, проведенных с участием пациентов российских стационаров [13], а в последующем (в феврале 2020 г.) - по итогам III фазы клинических испытаний препарата [14].

Российская вакцина "Гам-КОВИД-Вак", полученная биотехнологическим путем, при котором не используется патогенный для человека вирус SARS-CoV-2, это - комбинированная (гетерологичная) векторная вакцина против COVID-19, состоящая из двух компонентов: в состав компонента I входит рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека 26 серотипа (rAd26); в состав компонента II входит вектор на основе аденовируса 5 серотипа (rAd5), оба вектора несут ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Со-здатели вакцины изучали иммунологические свойства и безопасность двух видов препарата (в замороженной и лиофилизированной форме).

Авторы провели два открытых нерандомизированных исследования на стадии I-II фа-зы клинических испытаний вакцины в двух российских стационарах. В обоих исследованиях приняли участие взрослые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет. В I фазе каждого исследования в 0 день внутримышечно вводили либо одну дозу (0,5 мл) компонента I (rAd26-S), либо одну дозу - компонента II (rAd5-S), и оценивали безопасность обоих компонентов в течение 28 дней. Во II фазе исследования (не ранее, чем через 5 дней после введения препарата в 1 фазе), провели первичную буст-вакцинацию внутримышечным введением компонента I (rAd26-S) в 0 день, и компонента II (rAd5-S) на 21 день. Оценивали специфический гуморальный иммунитет (при помощи ИФА определяли специфические антитела к SARS-CoV-2 в 0, 14, 21, 28 и 42 дни исследования) и безопасность применения (на протяжении всего исследования отслеживали количество участников с нежелательными явлениями). Наряду с этим оценивали антиген-специфический клеточный противоинфекционный иммунитет (формирование клеток обеих популяций Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) и секрецию интерферона-гамма (ИФН-γ) и отслеживали изменение титров нейтрализующих антител (определяли при помощи анализа нейтрализации SARS-CoV-2). Данные клинические испытания зарегистрированы на ClinicalTrials.gov под номерами NCT04436471 и NCT04437875.

В период с 18 июня по 3 августа 2020 года в обоих исследованиях приняли участие 76 добровольцев (по 38 человек - в каждом). В каждом исследовании 9 добровольцев получили компонент I (rAd26-S) в фазе 1, 9 человек - компонент II (rAd5-S) в фазе 1 и 20 участников получили оба компонента (rAd26-S и rAd5-S) в фазе 2. Оба варианта вакцины были безопасными и хорошо переносились. Наиболее часто отмечаемыми побочными эффектами были: болезненность в месте инъекции (44 [58%]), гипертермия (38 [50%]), головная боль (32 [42%]), астения (21 [28%]) и боль в мышцах и суставах (18 [24%]). Большинство этих нежелательных реакций были слабо или умеренно выраженными; серьезных побочных эффектов обнаружено не было. У всех участников исследования детектированы специфические антитела (IgG) к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2. На 42 день от начала вакцинации среднее геометрическое значение титров IgG к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 составило 14 703 при использовании замороженной формы препарата и 11 143 для лиофилизата, средний геометрический титр нейтрализующих антител у иммунизированных добровольцев составил 4925 для замороженной формы и 4595 для лиофилизированной, уровень сероконверсии - 100%. Клеточно-опосредованные ответы были обнаружены у всех участников исследования на 28 день вакцинации, при этом медиана пролиферации клеток составляла 2,5% CD4+ и 1,3% CD8+ с замороженной формой и 1,3% CD4+ и 1,1% CD8+ с лиофилизированной формой.

По результатам проведенных исследований авторы пришли к выводу, что комбинированная вакцина "Гам-КОВИД-Вак" против COVID-19 на основе векторов rAd26 и rAd5 имеет хороший профиль безопасности и вызывает сильный гуморальный и клеточный иммунные ответы у участников. Была отмечена необходимость проведения дальнейших исследований эффективности этой вакцины для предотвращения COVID-19 [13].

Позднее, в феврале 2021 года, разработчики вакцины "Гам-КОВИД-Вак" опубликовали в "Lancet" предварительные результаты III фазы клинических испытаний этой вакцины по оценке ее эффективности и безопасности [14].

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование на этапе III фазы клинических испытаний вакцины проводили на базе в 25 лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) Москвы, Россия в период с 7 сентября по 24 ноября 2020 г. Для участия в исследовании отбирали добровольцев в возрасте не моложе 18 лет с отрицательными результатами ПЦР-теста и тестов на наличие IgG и IgM к SARS-CoV-2, без инфекционных заболеваний в анамнезе за 14 дней до начала исследования и отсутствием других прививок за 30 дней до включения в него. Всего в исследование были включены 21 977 взрослых, которые случайным образом были распределены (в соотношении 3:1) в группу для получения вакцины (n=16 501) или плацебо (n = 5476) с разбивкой по возрастным группам. Исследователи, участники и весь исследовательский персонал были замаскированы при выполнении группового задания. Вакцину вводили (0,5 мл/доза) внутримышечно в режиме первичной бустерной вакцинации: с 21-дневным интервалом между введением первой дозы (содержащей компонент I - rAd26) и второй дозой

(содержащей компонент II - rAd5), оба вектора, входящие в состав компонентов I и II, несут ген полноразмерного S-гликопротеина SARS-CoV-2. Первичным результатом было определение доли участников с ПЦР-подтвержденным диагнозом COVID-19 через 21 день после получения первой дозы вакцины. Из всех видов исследований были исключены участники с нарушениями протокола: первичный результат оценивали у участников, получивших две дозы вакцины или плацебо, серьезные нежелательные явления оценивали у всех участников, получивших хотя бы одну дозу на момент блокировки базы данных, а также редкие нежелательные явления. Исследование зарегистрировано на ClinicalTrials.gov (номер клинического испытания NCT04530396).

За указанный период исследования 19 866 человек получили две дозы вакцины или плацебо, у этих участников был проведен анализ первичных результатов. Через 21 день после введения первой дозы вакцины (день введения дозы 2) у 16 (0,1%) человек из 14 964 участников в группе вакцинированных и у 62 (1,3%) человек из 4902 участников в группе плацебо была диагностирована COVID-19, подтвержденная результатами ПЦР; эффективность вакцины составила 91,6% (95%ДИ 85,6-95,2). Большинство зарегистрированных нежелательных реакций были 1 степени тяжести (7485 [94,0%] из 7966 общих событий). Кроме того, 45 участников из 16 427 (0,3%) группы вакцинации и 23 из 5435 (0,4%) участников группы плацебо имели серьезные побочные явления; ни одно из них не было признанным связанным с вакцинацией, что было подтверждено выводами Независимого комитета по мониторингу данных клинического исследования.

Согласно предварительным данным эффективность вакцины "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V") против COVID-19 в ходе III фазы клинического исследования составила 91,6%; вакцина хорошо переносилась в большой когорте иммунизированных [14].

Российская вакцина "Спутник V" - являющаяся первой в мире зарегистрированной вакциной, сначала была зарегистрирована в 16 странах, таких как: Россия, Беларусь, Сербия, Аргентина, Боливия, Алжир, Палестина, Венесуэла, Парагвай, Туркменистан, Венгрия, ОАЭ, Иран, Республика Гвинея, Тунис и Армения. На сегодняшний день российская вакцина зарегистрирована в 67 странах с общим населением более 3,5 млрд человек. Результаты поствакцинальных исследований в ряде стран показали, что "Спутник V" является безопасной и эффективной вакциной против COVID-19 и занимает второе место среди вакцин против COVID-19 в мире по количеству разрешений, выданных государственными регулирующими органами [Данные Российского Фонда Прямых Инвестиций (РФПИ), www.rdif.ru].

Специалисты ряда стран также опубликовали результаты своих исследований по использованию российской вакцины "Спутник V", подтверждающие ее безопасность и высокую эффективность.

По данным Jones I. и Roy P. (Великобритания), представленным в журнале "Lancet" в феврале 2021 г. в клинических испытаниях вакцины "Спутник V" (III фаза) добровольное участие приняли 20000 человек, 75% из которых получали препарат вакцины, остальные - плацебо [15].

Возраст участников составлял 18 лет и старше, доля мужчин - 60%. В ходе III фазы испытаний примерно у четверти участников, получавших вакцину и у 62 (1-3%) из 4902 человек в группе плацебо отмечены сопутствующие заболевания, являющиеся фактором высокого риска развития тяжелой формы COVID-19. Три летальных исхода зарегистрированы в группе вакцинированных с наличием тяжелых сопутствующих заболеваний, но связи этих летальных исходов с вакцинацией не выявлено. У 68 участников исследования, в том числе у 45 человек из группы получивших вакцину, были отмечены серьезные нежелательные явления, не связанные с вакцинацией. В группе участников, получивших плацебо, было зарегистрировано 20 тяжелых случаев заболевания COVID-19, но ни одного - в группе получивших вакцину.

По результатам лабораторного исследования серологических образцов установлено, что гуморальный иммунный ответ сформировался у более чем 98% добровольцев. Уровень вируснейтрализующих антител у участников, вакцинированных препаратом "Спутник V", оказался в 1,3-1,5 раза больше, чем у пациентов, переболевших COVID-19.

Иммунитет, необходимый для предотвращения заболевания, развился примерно через 18 дней после введения первой дозы вакцины во всех возрастных группах, включая людей старше 60 лет. Эффективность вакцины "Спутник V" в ходе III фазы испытаний, оцененная по количеству подтвержденных случаев COVID-19 в течение 21 дня после введения первой дозы препарата, составила 91,6% (95% ДИ 85,6 -95,2) [15].

В августе текущего года исследователи из Аргентины (Rossi A.H. et al., 2021) сообщили о результатах оценки гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2, после вакцинации препаратом "Спутник V" 288 медицинских работников в Аргентине [16]. Авторы определяли титры IgG к S-белку SARS-CoV-2 и оценивали нейтрализующую способность антител после введения одной и двух доз вакцины в когортах условно здоровых (не болевших COVID-19) и ранее переболевших добровольцев. Через 21 день после получения первой дозы вакцины у 94% здоровых участников исследования детектированы специфические IgG к S-белку SARS-CoV-2. Было показано, что у переболевших COVID-19 после получения первой дозы вакцины "Спутник V" вырабатывается более высокий уровень поствакцинальных антител, обладающих вируснейтрализующей способностью, чем у условно здоровых участников, которым была проведена полная схема вакцинации с введением двух доз препарата. Авторы пришли к выводу, что высокий уровень сероконверсии (94%) после введения первой дозы вакцины ранее не болевшим COVID-19 участникам, предполагает возможность отсрочки введения второй дозы для обеспечения более высокого первичного охвата вакцинацией. Опубликованные данные являются важным источником информации, которая может использоваться при подготовке и принятии решений в области общественного здравоохранения в условиях глобальной чрезвычайной ситуации, вызванной пандемией COVID-19 [16].

В период с февраля по май 2021 г. в Королевстве Бахрейн в соответствии с рекомендациями ВОЗ и в рамках кампании по вакцинации населения против COVID-19,

организованного министерством здравоохранения Королевства было проведено исследование с участием более 5000 жителей страны, вакцинированных "Спутником V". Общая эффективность вакцины, оцененная через 14 дней после введения второй дозы, составила 94,3%; у 98,6% иммунизированных отмечались слабо выраженные нежелательные побочные эффекты (реакции организма), характерные для применения вакцины. О высокой безопасности вакцины "Спутник V" свидетельствовали такие данные как: отсутствие серьезных побочных эффектов, связанных с вакцинацией; отсутствие летальных исходов, связанных с вакцинацией и отсутствие тромбоза вен головного мозга после вакцинации [17].

Также вакцина "Спутник V" продемонстрировала 97,2% эффективность и высокий уровень безопасности против COVID-19 в период проведения кампании вакцинации в Беларуси, во время которой в период с января по июль 2021 г. было вакцинировано более 860 000 человек. Данные министерства здравоохранения Беларуси об отсутствии серьезных побочных эффектов и летальных исходов, связанных с вакцинацией, подтвердили высокую безопасность российского препарата [18].

В ряде исследований сообщается также об эффективности вакцины "Спутник V" против вызывающих опасения вариантов (VOC - Variants of Concern) вируса SARS-CoV-2.

Результаты исследования, проведенного специалистами из Аргентинского института вирусологии Национального университета Кордовы (Rodriguez R., Caeiro J.P., Pizzi H.) подтвердили высокую нейтрализующую способность антител к "бразильскому" варианту P.1 ("гамма") коронавируса SARS-CoV-2, выявленному в г. Манаус, после введения двух компонентов вакцины "Спутник V" и формирование сильного иммунного ответа у вакцинированных лиц [19].

Было показано, что после иммунизации "Спутником V" образуются нейтрализующие антитела к "бразильскому" варианту вируса P.1 как у участников, получивших одну инъекцию вакцины, так и у привитых двумя компонентами вакцины: у 99,65% получивших два компонента вакцины IgG к SARS-CoV-2 были детектированы на 42-й день после прививки, а у 85,5% участников, привитых одним компонентом - на 14 день [19].

В статье коллектива специалистов из нескольких ведущих научно-исследовательских институтов России (Гущин В.А. и соавт., июль 2021) представлены результаты исследования нейтрализующей активности сывороток крови, полученных от людей, вакцинированных "Спутником V", в отношении вызывающих опасения вариантов SARS-CoV-2 (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) и двух вариантов вируса SARS-CoV-2 эндемичных для Москвы [20].

Авторы отмечают, что с начала 2021 года в компаниях массовой вакцинации населения в разных странах использовались шесть основных вакцин против COVID-19. Однако в последнее время вызывает беспокойство проблема нейтрализации вирусов и снижение эпидемиологической эффективности некоторых вакцин против генотипов B.1.1.7, B.1.351 P.1 и B.1.617. Растет число сообщений о мутациях в рецептор-связывающем домене (RBD),

увеличивающих трансмиссивность вируса и ускользание от эффекта вируснейтрализующих антител. Вакцина "Спутник V" в настоящее время одобрена для использования в более чем 66 странах, но ее активность в отношении VOC еще недостаточно изучена. В данном исследовании изучали вируснейтрализующую активность (ВНА,) сыворотки крови людей после вакцинации "Спутником V", в отношении международно значимых генетических линий В.1.1.7, В.1.351, P.1, В.1.617.2, В.1.617.3, а также доминирующих в Москве вариантов вируса В.1.1.141 (Т385I) и В.1.1.317 (S477N, A522S) с мутациями в RBD-домене. По результатам исследования не выявлено достоверных различий ВНА сывороток для В.1.1.7, В.1.617.3 и местных генетических линий В.1.1.141 (Т385I), В.1.1.317 (S477N, A522S) с мутациями в RBD-домене. Для вариантов В.1.351, P.1 и В.1.617.2 наблюдалось статистически значимое снижение ВНА сывороток в 3,1, 2,8 и 2,5 раза соответственно. Авторы отметили, что снижение ВНА сывороток пациентов, вакцинированных "Спутником V", в отношении

вариантов В.1.351, P.1 и В.1.617.2 было менее выражено, чем при применении ряда вакцин зарубежного производства, таких как: AstraZeneca/ChA-dOx1 nCoV-19/, Pfizer-BioNTech/BNT162b2/ и Moderna/mRNA-1273/ (при сравнении опубликованных данных). Для окончательного вывода необходимо проведение прямого сравнительного исследования. Тем не менее, сыворотки крови от вакцинированных "Спутником V" сохраняют нейтрализующую активность в отношении вариантов В.1.1.7, В.1.351, P.1, В.1.617.2, В.1.617.3, а также местных генетических линий В.1.1.141 и В.1.1.317, циркулирующих в Москве (A522S) с мутациями в RBD-домене. По мнению авторов, поддержание высоких титров антител как результат вакцинации "Спутником V" или последующих ревакцинаций может быть одним из решений для обеспечения высокой ВНА в отношении В.1.351, P.1, В.1.617.2 и других новых вариантов коронавируса SARS-CoV-2 [20].

По результатам проведенных исследований были определены ключевые преимущества вакцины "Спутник V":

- В ходе III фазы клинических исследований "Спутник V" продемонстрировал **высокие показатели эффективности, иммуногенности и безопасности.**
- **Эффективность "Спутника V" против COVID-19 составила 91,6%** на основе анализа данных 19 866 добровольцев, получивших первую и вторую инъекцию вакцины или плацебо, на момент достижения финальной контрольной точки - 78 подтвержденных случаев заболевания коронавирусом;
- **Эффективность** вакцины для 2 144 добровольцев в возрасте **старше 60 лет составила 91,8%** и статистически не отличалась от данных, полученных в группе добровольцев 18-60 лет.
- Вакцина **предоставляет полную защиту против тяжелых случаев** заболевания COVID-19
- Вакцина формирует иммунный ответ, в результате иммунизации **более 98%** добровольцев **гуморальный иммунный ответ, и 100%** здоровых добровольцев сформировали **клеточный иммунный ответ** к SARS-CoV-2
- **Уровень вируснейтрализующих антител у добровольцев, вакцинированных препаратом "Спутник V", в 1,3- 1,5 раза выше,** чем уровень антител у пациентов, переболевших COVID-19.
- **"Спутник V" продемонстрировал высокие показатели безопасности. Большинство нежелательных явлений (94%) протекали в легкой форме** и свелись к простудным синдромам, реакции в месте введения препарата, головной боли и общей слабости.
- **Отсутствуют нежелательные явления, связанные с вакцинацией,** что подтверждается выводами Независимого комитета по мониторингу данных клинических исследований.
- **Отсутствуют сильные аллергические реакции, анафилактический шок.**
- **"Спутник V" - одна из трех вакцин в мире с эффективностью свыше 90%.** Среди этих вакцин препарат выделяется рядом преимуществ:
 - Вакцина **создана на безопасной платформе аденовирусных векторов человека,** доказавшей безопасность на протяжении десятилетий;
 - Является **пионером** в использовании гетерогенной бустерной вакцинации (два разных вектора для двух прививок в процессе вакцинации среди вакцин против COVID-19). Этот подход обеспечивает более продолжительный иммунитет
 - Вакцина продемонстрировала эффективность **против новых** генетических **вариантов** коронавируса SARS-CoV-2, в ряде исследований показано, что сыворотка крови вакцинированных "Спутником V" сохраняет нейтрализующую активность в отношении ВВО В.1.1.7, В.1.351, P.1, В.1.617.2, В.1.617.3, а также циркулирующих в Москве вариантов В.1.1.141 и В.1.1.317
 - **Простота логистики по всему миру:** температура хранения +2+8 градусов Цельсия;
 - **"Спутник V" является одной из наиболее доступных вакцин в мире,** цена одной инъекции - менее 10 долларов
- **"Спутник V" зарегистрирован в 67 странах** с общим населением более 3,5 млрд человек и занимает второе место среди вакцин против коронавируса в мире по количеству разрешений, выданных государственными регулирующими органами

Наряду с вакциной "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V") специалистами НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи были разработаны и зарегистрированы в России еще две вакцины против COVID-19 - "Гам-КОВИД-Вак-Лео" (зарегистрирована 25.08.2020 г.) и "Спутник Лайт" (16.05.2021 г.), также продемонстрировавшие хорошую иммунологическую эффективность и безопасность.

В ряде зарубежных и отечественных научных изданий представлены результаты исследований вакцины "Спутник Лайт".

Так, согласно исследованию специалистов из Аргентины (Gonzalez S. et al., 2021), опубликованному в октябре 2021 в журнале "EClinicalMedicine" (издаваемом "Lancet") с участием более 400 000 человек в возрасте 60-79 лет, российская вакцина "Спутник Лайт" (первый компонент двухкомпонентной вакцины "Гам-КОВИД-Вак" ("Спутник V")) оказалась высокоэффективной для предотвращения инфекции (78,6%; ДИ95% 74,8-81,7), сокращения доли госпитализаций (87,6%; ДИ95%, 80,3-92,2) и предотвращения летальных исходов (84,8%; ДИ 95%, 75,0-90,7) [21].

Во время проведения кампании по вакцинации в Парагвае с участием 320 000 человек эффективность вакцины "Спутник Лайт" (по данным министерства здравоохранения страны) составила 93,5%. [22].

Кроме того, специалисты из НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Должикова И.В. и соавт. октябрь 2021 г.) на сайте препринтов medRxiv.org опубликовали предварительные результаты исследования эффективности "Спутник Лайт" против "дельта"-варианта SARS-CoV-2, которую оценивали на основе данных регистров о вакцинированных против COVID-19 жителях Москвы и статистических данных о заболеваемости COVID-19 в Москве [23].

Анализ данных показал, что в течение июля 2021 года преобладающим (на уровне 99,5%) штаммом SARS-CoV-2 в Москве был "дельта"-вариант SARS-CoV-2 и его "дочерние" линии (B.1.617.2, AY.4, AY.5, AY.6, AY.10, AY.12, AY.20, AY.23, AY.24, но в основном B.1.617.2 и AY.1). Учет иммунной прослойки в 46% позволил авторам рассчитать эффективность однокомпонентной вакцины против "дельта"-варианта в Москве в течение первых трех месяцев после вакцинации на уровне 69,85% (95% ДИ 64,08 - 74,70). В группе 18-29 лет общая эффективность вакцины против "дельта"-варианта вируса составила 88,61%, в группе 18-59 лет - 75,28%, в группе лиц старше 60 лет - 51,98%. Авторы отметили высокую эффективность иммунизации однокомпонентной вакциной "Спутник Лайт" против дельта-варианта среди людей молодого и среднего возраста, по меньшей мере в течение первых 3 месяцев после получения однократной дозы. Было подчеркнуто, что вакцина "Спутник Лайт" продемонстрировала более высокую эффективность против "дельта"-варианта SARS-CoV-2, чем многие вакцины с двукратным (2-х дозовым) режимом введения [23].

Совсем недавно (в ноябре 2021 г) в международном научном журнале "The Lancet Regional Health - Europe" специалисты ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" МЗ РФ (Тухватулин А.И. и соавт.) опубликовали результаты I-II фазы клинических испытаний вакцины "Спутник Лайт" и заключение о безопасности, переносимости и иммуногенности этой вакцины, которая по своему составу является иден-

тичной первому компоненту вакцины "Спутник V" [24].

Открытое проспективное нерандомизированное исследование в рамках I-II фазы клинических испытаний вакцины "Спутник Лайт" было проведено с участием 110 здоровых добровольцев в возрасте 18-59 лет в медицинском центре "Эко-безопасность" Санкт-Петербурга.

Авторы оценивали показатели гуморального иммунитета (при помощи ИФА определяли наличие IgG к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 на 1, 10, 28 и 42 дни после введения вакцины) и безопасность (количество участников с нежелательными явлениями, отслеживаемыми на протяжении всего исследования). Наряду с этим оценивали антиген-специфический клеточный иммунитет (определяли формирование антиген-специфических клеток обеих популяций Т-лимфоцитов: Т-хелперных (CD4) и Т-цитотоксических (CD8 +), а также концентрацию ИФН- γ при рестимуляции антигена) и изменение титров нейтрализующих антител (в анализе нейтрализации SARS-CoV-2).

В ходе исследования было установлено, что большинство регистрируемых нежелательных побочных реакций были легкой (66,4% от всех вакцинированных) или умеренной (5,5%) степени. Серьезных нежелательных явлений не было выявлено. По результатам определения IgG к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 были выявлены лица с предсуществующим иммунитетом к SARS-CoV-2. После этого открытия авторы разделили все данные о безопасности и иммуногенности на две группы в зависимости от наличия и отсутствия предсуществующего иммунитета к SARS-CoV-2. Между группами наблюдались заметные различия в иммунологической эффективности вакцины (иммуногенности вакцины), т.е. способности вызывать иммунный ответ. При этом, вакцинация серопозитивных добровольцев (n=14) привела к быстрому увеличению среднего геометрического титра (СГТ) специфических IgG к RBD-S вируса с исходного значения СГТ, составлявшего 594,4 до 26899 на 10 день от начала вакцинации по сравнению с 29,09 в группе серонегативных участников (n=96). На 42 день от начала вакцинации в группе серонегативных добровольцев значение СГТ антител составило 1648, уровень сероконверсии - 100% (93/93); в группе серопозитивных лиц - значение СГТ составило 19986, уровень сероконверсии составил 92,9% (13/14). На 42 день от начала вакцинации средний геометрический титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у серонегативных иммунизированных добровольцев составил 15,18; уровень сероконверсии - 81,7% (76/93), а в группе серопозитивных добровольцев - СГТ нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 составил 579,7; уровень сероконверсии - 92,9% (13/14). Антиген-специфическая пролиферация Т-клеток, образование ИФН- γ -продуцирующих клеток и секреция ИФН- γ наблюдались в 96,7% (26/27), 96% (24/25) и 96% (24/25) в группе серонегативных иммунизированных лиц, соответственно и в 100% (3/3), 100% (5/5) и 100% (5/5) в группе серопозитивных вакцинированных, соответственно.

Таким образом, результаты I-II фазы клинических испытаний однокомпонентной вакцины "Спутник Лайт" против COVID-19 на основе вектора rAd26 (для однократного применения) показали, что вакцина имеет хороший профиль безопасности и вызывает сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ как у серонегативных, так и у серопозитивных иммунизированных участников [24].

Разработчики синтетической пептидной вакцины "ЭпиВакКорона" (Рыжиков А.Б.) из ФБУН "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии" "Вектор" Роспотребнадзора в российском журнале "Инфекция и иммунитет" во 2-м квартале 2021 г. опубликовали результаты исследования, полученные в ходе I-II фазы клинических испытаний вакцины на добровольцах в возрасте 18-60 лет [25].

Авторы сообщили, что исследования в рамках I-II фазы клинических испытаний вакцины "ЭпиВакКорона" состояли из двух этапов: на 1 этапе провели открытое исследование безопасности, реактогенности и иммунологической активности вакцины с участием 14 добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте 18-30 лет, на 2 этапе - простое слепое сравнительное рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с участием 86 добровольцев обоего пола в возрасте 18-60 лет. Вакцину участникам вводили внутримышечно, дважды, с интервалом 21 день между инъекциями. Вакцина "ЭпиВакКорона" продемонстрировала низкую реактогенность - только у четверых (9,3%) и двоих (4,7%) добровольцев развились легко выраженные местные реакции (например, кратковременная боль в месте инъекции) после первой и второй инъекций вакцины, соответственно, продолжительность которых составляла не более двух дней; признаки развития системных побочных реакций не обнаружены. По результатам исследования было показано, что применение схемы двухдозовой вакцинации привело к индукции антител, вирусспецифических и нейтрализующих антител у 100% добровольцев. Сероконверсия с титром нейтрализующих антител $\geq 1:20$ была зарегистрирована у 100% добровольцев через 21 день после получения второй дозы препарата. В группах добровольцев, получивших плацебо, о сероконверсии не сообщалось. По результатам испытаний авторы сделали вывод о том, что вакцина "ЭпиВакКорона" на основе пептидов имеет низкую реактогенность, является иммуногенным и безопасным продуктом. Сделать вывод об эффективности вакцины не представлялось возможным из-за недостаточного количества добровольцев и лабораторно подтвержденных случаев COVID-19 (Испытания зарегистрированы на Clinical Trials Identifier; номер NCT04527575) [25].

Клинические пострегистрационные испытания как российских, так и зарубежных вакцин продолжаются, в научной печати периодически появляются публикации об иммуногенности производимых вакцин и эффективности поствакцинального иммунитета в различных популяционных группах, что представляет интерес для медицинского сегмента профессионального сообщества.

Иммуногенность вакцин против COVID-19 и формирование поствакцинального иммунитета в различных популяционных группах

В настоящее время в Германии рекомендуется иммунизация гетерологичной векторной вакциной ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) с последующей бустеризацией вакциной на основе мРНК (BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) или мРНК-1273 (Moderna)), при этом опубликованы литературных данных об иммуногенности вакцин и иммунологи-

ческой реактивности организма пока еще очень мало. Исследователи (Schmidt T. et al., 2021) из Саарского университета (Хомбург, Германия) показали, что, иммунизация здоровых взрослых людей (n=96) гетерологичной вакциной вызывала образование специфических IgG, нейтрализующих антител и специфических CD4+ Т-лимфоцитов, уровень которых был значительно выше, чем после введения гомологичной векторной вакцины (n=55) и повышенным или сопоставимым с уровнем после введения гомогенных мРНК-вакцин (n=62) [26]. Более того, уровень spike-(S)-специфических CD8+ Т-лимфоцитов после введения гетерологичной вакцины был значительно выше, чем после двухдозовой вакцинации гомологичной вакциной. S-специфические Т-клетки были преимущественно полифункциональными с в значительной степени перекрывающимися цитокин-продуцирующими фенотипами во всех трех схемах (42,5%). Следует отметить, что не было разницы между введением 1 и 2 дозы вакцины при гетерологичной (11,2±1,3 недели) и гомологичной (10,8±1,4 недели) схемах вакцинации, образцы крови для исследования от привитых лиц забирали в среднем через 14 дней после вакцинации.

У реципиентов как гомологичной векторной схемы и гетерологичной комбинации вектор/мРНК наблюдались выраженные системные и местные реакции после введения первой дозы векторной вакцины, в то время как бустеризация мРНК-вакциной переносилась хорошо и негативные побочные явления были сопоставимы с таковыми после иммунизации гомологичной мРНК-вакциной. В целом, авторами было продемонстрировано, что гетерологичная вакцина индуцирует развитие сильного гуморального и клеточного иммунного ответа с приемлемым и управляемым профилем реактогенности [26].

Интерес представляет и работа исследователей из Нидерландов (Boekel L. et al., август 2021), которые изучали влияние различных иммуносупрессивных препаратов на развитие гуморального иммунного ответа после вакцинации против COVID-19 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) [27]. Критерием отбора участников исследования стала вакцинация любой вакциной против COVID-19 в рамках национальной программы вакцинации Нидерландов, являвшийся на момент исследования приоритетной для иммунизации пожилых людей. Авторы исследовали образцы сыворотки крови от пациентов с АИЗ и от условно здоровых лиц после получения первой или второй дозы вакцины. Определяли показатели сероконверсии и титры IgG к RBD-S-белка SARS-CoV-2. Логистический и линейный регрессионные анализы использовали для изучения связи между приемом лекарственных препаратов в период вакцинации, частотой сероконверсии и уровнем (титром) IgG.

Для участия в двух проспективных когортных исследованиях (в период с 26 апреля 2020 года по 1 марта 2021 года) были отобраны 3682 пациента с ревматическими заболеваниями, 546 пациентов с рассеянным склерозом и 1147 условно здоровых лиц. В ходе исследования были протестированы образцы сыворотки крови от 632 пациентов с АИЗ и от 289 здоровых лиц - после введения первой дозы вакцины против COVID-19 исследовали образцы от 507 пациентов с АИЗ и 239 здоровых лиц, а после второй -

от 125 пациентов с АИЗ и 50 здоровых лиц) вакцинации. Средний возраст всех участников исследования составил 63 года; доля женщин составила по 67% в каждой группе участников.

Среди участников без признаков предшествующей инфекции SARS-CoV-2, сероконверсия после первой вакцинации оказалась значительно ниже, чем среди пациентов контрольной группы (210 [49%] из 432 пациентов против 154 [73%] из 210 человек; скорректированное отношение шансов (сОШ) 0,33 [95% ДИ 0,23-0,48]; $p < 0,0001$), в основном за счет более низкой сероконверсии у пациентов, получавших метотрексат или анти-CD20 терапию. После второй вакцинации сероконверсия превысила 80% во всех подгруппах пациентов, получавших медикаментозную терапию, за исключением пациентов, получавших анти-CD20 (43%; 3/7 пациентов). Не установлено различий в уровне сероконверсии и титрах IgG у пациентов, ранее перенесших инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 (96%; 72/75 пациентов, средний титр IgG составил 127 AU/mL (arbitrary unit - условная единица - на миллилитр, УЕ/мл) [межквартильный размах (IQR, МКП) 27-300]) и пациентов, не болевших COVID-19, получивших две дозы вакцины (92%; 97/106 пациентов, средний титр IgG составил 49 AU/mL [17-134]).

Авторы работы сделали вывод о том, что сероконверсия после введения первой дозы вакцины против COVID-19 развивается медленнее у пожилых пациентов, принимающих специфические иммуносупрессивные препараты, при этом ревакцинация или повторный контакт с вирусом способствуют развитию гуморального иммунитета. По мнению авторов, прием препаратов, угнетающих функцию иммунной системы, противопоказан в течение, как минимум, за 1 месяц до и после вакцинации из-за риска снижения иммуногенности [27].

Эффективность вакцин против COVID-19 сегодня неоспорима. Результаты проведенных исследований, по мере накопления данных о вакцинации пациентов с ревматическими заболеваниями, помогли уменьшить страх и неуверенность среди этих пациентов в отношении безопасности и эффективности вакцинации. Американская коллегия ревматологов, выпустившая руководство по вакцинации пациентов с ревматическими заболеваниями от COVID-19, продолжает признавать теоретический риск обострения заболеваний после вакцинации, однако опубликованные на сегодняшний день результаты исследований показали, что неблагоприятные последствия у пациентов с аутоиммунными ревматическими заболеваниями сопоставимы с данными по общей популяции, независимо от типа вакцины. По международным данным только 3% с системной красной волчанкой сообщили об обострении заболевания после вакцинации; в 83% случаев наблюдалось появление побочных эффектов от легких до умеренно выраженных. По ранее опубликованным данным EULAR (Европейского альянса ассоциаций ревматологов) после вакцинации против COVID-19 обострения заболеваний были зарегистрированы у 5% пациентов с воспалительными ревматическими заболеваниями [28].

Несмотря на то, что иммуногенность вакцин против COVID-19 снижена у пациентов с ревматическими заболеваниями по сравнению со здоровой группой контроля,

у большинства таких пациентов вырабатываются специфические антитела после вакцинации, независимо от типа вакцины. В исследовании, проведенном в Нидерландах, у пациентов с АИЗ после введения первой дозы вакцин ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) и BNT162b2 (BioNTech-Pfizer) были получены схожие показатели сероконверсии и титров IgG к SARS-CoV-2 (Boekel L. et al., 2021). По данным исследования бразильских авторов (Medeiros-Ribeiro A.C. et al., 2021), после введения второй дозы инактивированной вакцины CoronaVac сероконверсия произошла у 70% пациентов с АИ ревматическими заболеваниями по сравнению с 96% участников контрольной группы.

Результаты исследования Boekel L. et al. (2021) показали, что реакции нейтрализующих антител после однократной дозы BNT162b2 (мПНК) вакцины против COVID-19, разработанной Pfizer-BioNTech, были снижены у пациентов, получавших метотрексат, но не у пациентов, получавших биологические препараты, в то время как реакции Т-лимфоцитов сохранялись. Аналогичным образом, в то время как лекарственная терапия, истощающая В-лимфоциты, оказывает отрицательное влияние на продукцию антител - только около у 40% пациентов, принимавших ритуксимаб, произошла сероконверсия после получения двух доз вакцины - ответы Т-лимфоцитов оказались устойчивыми, даже в отсутствие циркулирующих В-лимфоцитов.

Авторы публикации подчеркивают, что для пациентов с ревматическими заболеваниями, как и для населения в целом, остается нерешенным ряд вопросов, касающихся условий формирования вакциноиндуцированного иммунитета к высокотрансмиссивному дельта-варианту SARS-CoV-2, в том числе для принятия решения о необходимости введения бустерных доз вакцины для усиления иммунитета, ответы на которые являются особенно актуальными для пациентов, получающих метотрексат или препараты, направленные на истощение пула В-лимфоцитов [28].

Инактивированная цельновирионная вакцина CoronaVac (Sinovac Biotech, Пекин, Ки-тай) против COVID-19 была одобрена для экстренного применения в рамках национальной программы вакцинации населения Таиланда и в настоящее время является широко доступной во многих странах с низким уровнем дохода. Vacharathit V. et al. (2021, Таиланд), провели исследование по оценке влияния разных вариантов вируса SARS-CoV-2 (включая варианты В.1.1.7 ("альфа"), В.1.351 ("бета"), и В.1.617.2 ("дельта")) на образование антител (индуцированных как вакциной, так и инфекцией) [29]. Авторы работы оценивали титры анти-SARS-CoV-2 RBD-S1-связывающих IgG, а также титры вируснейтрализующих антител (ВНА) против прототипного вакцинного штамма (дикого типа) SARS-CoV-2 (wild-type, WT) и штаммов вируса, вызывающих опасения (variant of concern, VOC) при исследовании образцов сыворотки крови от медицинских работников, получивших две дозы вакцины CoronaVac. Контрольную группу составили непривитые пациенты с инфекцией COVID-19, госпитализированные в стационар в марте-мае 2020 г. и в апреле-мае 2021 г., которые были разделены на две когорты в зависимости от времени госпитализации. Для количественного определения титра ВНА использовали анализ (реакцию) микронейтрализации.

В ходе исследования у всех участников исследования

были обнаружены вирусспецифические IgG (100% серопозитивных лиц). Критерием достаточной иммуногенности считали наличие в сыворотке крови обследуемых участников ВНА против штамма SARS-CoV-2 дикого типа (WT) и штаммов вируса, вызывающих опасения (VOC) в титре ≥ 20 единиц. Самые высокие титры ВНА были определены для WT штамма SARS-CoV-2 у большинства участников (99,17%), а самые низкие - для штамма "дельта" (в 69,17% случаев). Для сравнения, доля участников с наличием ВНА против вариантов SARS-CoV-2 "альфа" и "бета" составила 85,83% и 82,50% соответственно. Эта тенденция постоянно наблюдалась во всех когортах. Было обнаружено, что титры ВНА у лиц, вакцинированных CoronaVac, были в целом значительно ниже, чем у переболевших COVID-19. Статистический анализ полученных результатов продемонстрировал значительное снижение средних показателей титров ВНА к VOC штаммам по сравнению с титрами ВНА к WT штамму SARS-CoV-2. Исследователи не обнаружили значительной разницы в титрах ВНА к штаммам вируса "альфа" и "бета". Однако титры ВНА к варианту "дельта" были наиболее низкими и значительно отличались от остальных.

Авторы показали, что вакцинальный (дикий) штамм вируса лучше нейтрализуется сыворотками крови пациентов, перенесших инфекцию в 2020 г., а "альфа"-вариант - сыворотками крови переболевших COVID-19 в 2021 г. Это связано с преобладанием штаммов вируса, циркулировавших в Таиланде в середине 2020 г. и середине 2021 г., то есть в периоды забора серологических образцов в соответствующей когорте стационарных пациентов. Бета-вариант одинаково хорошо нейтрализовался сыворотками крови пациентов обеих когорт, перенесших естественную инфекцию. Причем, средние геометрические значения титров ВНА при естественной инфекции были выше, чем титры ВНА после вакцинации CoronaVac. Аналогично, и дельта-вариант одинаково хорошо нейтрализовался сыворотками крови, полученными от пациентов обеих когорт с естественной инфекцией, но титры ВНА были заметно ниже, чем в случае заражения бета-вариантом вируса. Титры ВНА против дельта-варианта были самыми низкими и значительно отличались от остальных. У реципиентов CoronaVac они были еще ниже, почти на пределе обнаружения.

Несмотря на выявление связывающих IgG к RBD-S1-SARS-CoV-2 и 100% уровень сероконверсии, полученные результаты исследования демонстрируют относительно низкие титры ВНА после вакцинации CoronaVac, чем после естественной инфекции. Титры ВНА против вируса "альфа" и "бета" штаммов были сопоставимы с поствакцинальным уровнем антител. Эти выводы противоречат данным предыдущих исследований о том, что бета-вариант более устойчив к нейтрализации, чем альфа - по результатам исследования в реакции нейтрализации псевдовируса образцов сывороток крови реципиентов CoronaVac, собранных через 14 дней после введения второй дозы вакцины. Авторы настоящего исследования пришли к заключению, что для поддержания долгосрочного иммунного ответа у лиц, привитых CoronaVac возможно потребуются дополнительная третья доза вакцины [29].

Другое исследование, проведенное группой американских специалистов (Collier A.Y. et al., 2021) было посвящено

изучению иммуногенности мРНК вакцины для беременных и кормящих женщин.

Несмотря на то, что беременные женщины, инфицированные COVID-19, относятся к группе повышенного риска тяжелого течения заболевания и смерти от этой инфекции, они были исключены из III фазы клинических испытаний вакцин против COVID-19. В связи с этим данные о безопасности и иммуногенности вакцин в этой популяции ограничены. Коллектив исследователей (Collier A.Y. et al., 2021) из Бостона (шт. Массачусетс, США) оценивал иммуногенность вакцин против COVID-19 на основе мРНК, в том числе против эмерджентных опасных вариантов SARS-CoV-2, при проведении вакцинации среди беременных и кормящих женщин [30].

В проспективном когортном исследовании приняли участие 103 женщины, получившие вакцину против COVID-19 с декабря 2020 г. по март 2021 г., и 28 женщин, перенесших инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 в период с апреля 2020 г. по март 2021 г, лабораторно подтвержденную. В данное исследование были включены 30 беременных, 16 кормящих и 57 небеременных и не кормящих женщин, получивших вакцины мРНК-1273 (Moderna) или BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) против COVID-19, а также не вакцинированные переболевшие COVID-19 женщины (22 беременных и 6 небеременных). После вакцинации оценивали гуморальный и клеточный иммунные ответы, определяли уровень нейтрализующих IgG к RBD-S-белка SARS-CoV-2 у беременных, кормящих и небеременных женщин. Spike-специфический Т-клеточный ответ оценивали при помощи теста ELISpot на высвобождение ИФН- γ , и многопараметрического метода внутриклеточного окрашивания цитокинов. Гуморальный и клеточный иммунный ответы определяли к первоначальному штамму SARS-CoV-2 USA-WA1/2020, а также к вариантам B.1.1.7 ("альфа") и B.1.351 ("бета").

Возраст женщин - участниц исследования (получивших мРНК-вакцину против COVID-19) составил от 18 до 45 лет (доля неиспаноязычных белых женщин - 66%). После введения второй дозы вакцины лихорадка была зарегистрирована у 4 беременных женщин (14%; среднее стандартное отклонение (SD) 6%), 7 кормящих женщин (44%; SD 12%) и 27 небеременных женщин (52%; SD 7%). После вакцинации у беременных, кормящих и небеременных женщин обнаружены связывающие и нейтрализующие антитела, а также CD4 и CD8 Т-клеточный иммунный ответ. Связывающие и нейтрализующие антитела также были обнаружены в пуповинной крови младенцев, которые родились у женщин, вакцинированных мРНК-вакцинами и в материнском грудном молоке. Титры связывающих и нейтрализующих антител против вызывающих наибольшие опасения вариантов SARS-CoV-2 "альфа" (B.1.1.7) и "бета" (B.1.351) были снижены, но Т-клеточный ответ против указанных вариантов вируса сохранялся.

В данном исследовании на удобной выборке беременных женщин, мРНК-вакцина против COVID-19 продемонстрировала иммуногенность, а антитела, индуцированные вакциной, обнаружены в пуповинной крови и грудном молоке. У беременных и небеременных женщин, получивших вакцину, развились перекрестные реакции антител и Т-клеточный ответ против вариантов SARS-CoV-2, вызывающих наибольшие опасения [30].

Исходя из соображений безопасности вакцинации против COVID-19 векторной вакциной ChAdOx1-S (AZD1222, Oxford-AstraZeneca), государственные органы управления здравоохранением ряда стран после введения первой дозы вакцины ChAdOx1-S стали рекомендовать в качестве бустера гетерогенную вакцину на основе мРНК вместо схемы с использованием только гомологичной вакцины. На основании данных о сильном иммунном ответе после гетерогенной бустерной (усиливающей) вакцинации, было предложено использование комбинации вакцин (применение двух разных векторов для двух инъекций) в качестве подходящей стратегии для сдерживания вновь появляющихся вариантов SARS-CoV-2 (Duarte-Salles T. et al., 2021). Использование гетерогенной бустерной вакцины BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) на основе мРНК, как было показано, индуцирует более высокое количество S-специфичных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов и высокие титры нейтрализующих антител против "альфа", "бета" и "гамма" вариантов SARS-CoV-2. Однако быстрое распространение дельта-варианта является проблемой как для получивших однократную дозу вакцины ChAdOx1-S, и ожидающих введения второй дозы, так и для лиц, получивших полный курс вакцинации препаратом ChAdOx1-S.

Специалисты из Германии (Behrens G. MN. et al., 2021) исследовали образцы плазмы крови от лиц, вакцинированных ChAdOx1-S через 14-22 дня после вакцинации гомогенной бустерной вакциной ChAdOx1-S (группа 1; n=12, 7 женщин) или гетерогенной бустерной вакциной BNT162b2 (группа 2; n=11, 8 женщин) с целью сравнения нейтрализующей активности антител к SARS-CoV-2, включая "дельта" вариант [31]. Интервал между первой и второй инъекцией составил 73,5 дней (диапазон 71-85 дней) и не отличался между группами. Для анализа нейтрализации использовали псевдотипированный вирус везикулярного стоматита. Средний уровень IgG к S-белку SARS-CoV-2 (QuantiVac, Euroimmun, Любек, Германия) составил 171,9 относительных единиц на мл (ОЕ/мл) (стандартное отклонение (SD) 121, 8 ОЕ/мл) в 1-ой группе и 611,0 ОЕ/мл (SD 104,5 ОЕ/мл) в 2-ой группе ($p < 0,0001$). После введения гомогенной бустерной вакцины в плазме крови участников 1-ой группы определялся умеренный 50% титр нейтрализации (NT50) против дикого типа и "альфа"-варианта, вируснейтрализующая активность была снижена против "бета", "гамма" и "дельта" вариантов вируса. В отличие от этого, у всех участников, вакцинированных гетерогенной бустерной вакциной ChAdOx1-S/BNT162b2 определялся NT50=25 против всех вариантов вируса, включая "дельта" (NT50 \geq 100 у 85% вакцинированных). Средний уровень анти-SARS-CoV-2-S IgG коррелировал с NT50 против "дельта" варианта вируса в обеих группах (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,901$; $p < 0,0001$).

Авторами сделан вывод, что полученные в ходе исследования данные по устойчивому ингибированию опасных вариантов SARS-CoV-2, включая вариант "дельта", подтверждают эффективность гетерогенной бустерной вакцинации (ChAdOx1-S/BNT162b2) [31].

Пациенты с хронической почечной недостаточностью, находящиеся на поддерживающем гемодиализе, подвергаются повышенному риску смерти от COVID-19 и развитию менее эффективного поствакцинального иммунного

ответа. На сегодняшний день лишь несколько исследований посвящены изучению поствакцинального иммунитета к COVID-19 у иммунокомпрометированных пациентов.

Так, коллектив авторов из Германии (Fagni F. et al., октябрь 2021) опубликовал результаты исследования по оценке иммуногенности вакцины против COVID-19 на основе мРНК BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) у диализных пациентов группы риска и охарактеризовали системный клеточный и гуморальный иммунный ответ при исследовании образцов сыворотки крови и слюны при помощи анализа, основанного на высвобождении ИФН- γ и мультиплексного анализа для определения содержания цитокинов и иммуноглобулинов [32]. В последующем авторы сравнили связывающую способность и эффективность нейтрализации иммуноглобулинов, индуцированных вакцинацией против эмерджентных (вновь появляющихся) вариантов SARS-CoV-2 ("альфа", "бета", "эпсилон" и "кластер 5") при помощи конкурентного ИФА теста для детекции антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с клеточным ACE2.

Пациенты, находящиеся на поддерживающем гемодиализе, после введения двух доз вакцины BNT162b2 продемонстрировали детектируемый, но вариабельный клеточный и гуморальный иммунный ответ против SARS-CoV-2 и вызывающих опасения вариантов вируса. Несмотря на то, что иммуноглобулины, индуцированные вакцинацией, были обнаружены в образцах слюны и плазмы крови, содержание IgG и эффективность нейтрализации против SARS-CoV2 были снижены по сравнению с контрольной группой вакцинированных пациентов, не получающих гемодиализ. Аналогичным образом, опосредованное Т-клетками высвобождение ИФН- γ после стимуляции S-пептидами SARS-CoV-2 было значительно снижено.

Поддающиеся количественной оценке гуморальные и клеточные иммунные реакции после вакцинации BNT162b2 у лиц, находящихся на поддерживающем гемодиализе, обнадеживают, но требуют длительного наблюдения для оценки продолжительности иммунитета. Снижение нейтрализации вируса и реакции на ИФН- γ в условиях появления вызывающих опасения вариантов вируса может способствовать тому, что в этой группе риска при первой же возможности будет проведена повторная вакцинация с использованием модифицированных вакцин [32].

Таким образом, в настоящее время в рамках реализации глобальных мер в сфере здравоохранения, направленных на борьбу с COVID-19, во многих странах продолжают работы по созданию и испытанию различных видов вакцин, совершенствуются традиционные и осваиваются инновационные технологии их производства, с каждым годом расширяется ассортимент вакцинных препаратов для различных возрастных и целевых групп населения, ведутся разработки в области способов введения вакцин. Стремительно наращивается производство вакцин, повсеместно и активно проводится информационно-разъяснительная работа с населением о важности вакцинации против COVID-19, что, по мнению специалистов, позволит повысить уровень охвата населения вакцинацией в объеме, необходимом для формирования популяционного иммунитета к COVID-19 и остановить распространение инфекции.

Литература

1. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор РФ). О новой коронавирусной инфекции. Актуальная эпидемиологическая ситуация в России и мире. Информация о случаях заболевания COVID-19 https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono_virus/epid.php
2. Коронавирус COVID-19: официальная информация о коронавирусе в России. <https://стопкоронавирус.рф>
3. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020 Apr 7; 323(13):1239-42
4. World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (Accessed on November 19, 2021)
5. Regulatory Affairs Professionals Society. COVID-19 vaccine tracker. <https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2020/3/covid-19-vaccine-tracker>
6. Finco O., Rappuoli R. Designing vaccines for the twenty-first century society. *Front Immunol*. 2014 Jan 23; 5: 12
7. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020 Oct; 586(7830):516-27
8. World Health Organization. The different types of COVID-19 vaccines <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
9. Plotkin S., Robinson J.M., Cunnighman G., Iqbal R., Larsen S. The complexity and cost of vaccine manufacturing - an overview. *Vaccine* 2017 Jul 24; 35(33):4064-71
10. Zhu F.C., Li Y.H., Guan X.H., Hou L.H., Wang W.J., Li J.X. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020 Jun 13; 395(10240):1845-54.
11. World Health Organization. COVID-19 vaccines: product-by-product information <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines>
12. Временные методические рекомендации. Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19 (письмо Минздрава России от 24.08.2021 №30-4/И/2-13501) - 65 с.
13. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharrullaeva A.S. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020 Sep 26; 396(10255):887-97.
14. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharrullaeva A.S. 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. *Lancet* 2021 Feb 20; 397(10275):671-81.
15. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet*. 2021 Feb 20; 397(10275):642-3.
16. Rossi A.H., Ojeda D.S., Varese A., Sanchez L., Gonzalez Lopez Ledesma M.M., Mazzitelli I. et al. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. *Cell Rep Med*. 2021 Aug 17; 2(8):100359.
17. Российский Фонд Прямых Инвестиций. Пресс-релиз от 10 июня 2021 г. <https://sputnikvaccine.com/newsroom/pressreleases/sputnik-v-demonstrates-high-94-3-efficacy-and-high-safety-profile-during-the-vaccination-campaign-in/>
18. Российский Фонд Прямых Инвестиций. Пресс-релиз от 15 сентября 2021 г. <https://sputnikvaccine.com/newsroom/pressreleases/sputnik-v-demonstrates-97-2-efficacy-and-high-safety-profile-against-covid-during-the-vaccination-ca/>
19. Rodriguez R., Caeiro J.P., Pizzi H. Evaluacion de la respuesta de anticuerpos neutralizantes a la vacuna Sputnik V en una cohort en Cordova y evaluacion de las propiedades neutralizantes de anticuerpos naturales y vacunales frente a la variante Manaos. Available at: <chrome-extension://oemmnacdbldboiebnladdacdbfmadadm/http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2021/05/Resultados-vacuna-cohorte-14-y-42-d%C3%ADas.-Respu-esta-de-acs.-a-Manaos.-14.05.2021-logos.pdf>
20. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., M.A. Nikiforova et al. Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow endemic SARS-CoV-2 variants. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jul 12; 9(7):779.
21. Gonzalez S., Olszevicki S., Salazar M., Calabria A., Regairaz L., Maron L. et al. Effectiveness of the first component of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) on reduction of SARS-CoV-2 confirmed infections, hospitalisations and mortality in patients aged 60-79: a retrospective cohort study in Argentina. *EClinicalMedicine* 2021 Oct; 40:101126.
22. Российский Фонд Прямых Инвестиций. Пресс-релиз от 18 августа 2021 <https://rdif.ru/fullNews/7052/>
23. Dolzhikova I.V., Gushchin V.A., Shcheblyakov D.V., Tsybin A.N., Shchetinin A.M., Pochtovyi A.A. et al. One-shot immunization with Sputnik Light (the first component of Sputnik V vaccine) is effective against SARS-CoV-2 Delta variant: efficacy data on the use of the vaccine in civil circulation in Moscow. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.10.08.21264715v1>
24. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharrullaeva A.S., Kovyrshina A.V. et al. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine "Sputnik Light" for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Dec; 11:100241
25. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А. и др. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины "ЭпиВакКорона" для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18-60 лет (фаза I-II). *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):283-96.
26. Schmidt T., Klemis V., Schub D., Mihm J., Hielscher F., Marx S. et al. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nat Med*. 2021 Sep; 27(9):1530-5
27. Boekel L., Steenhuis M., Hooijberg F., Besten Y. R., van Kempen Z.L. E., Kummer L.Y. et al. Antibody development after COVID-19 vaccination in patients with autoimmune diseases in the Netherlands: a substudy of data from two prospective cohort studies. *Lancet. Rheumatol*. 2021 Nov; 3(11):e778-88.
28. COVID-19 vaccine data provide reassurance. Editorial. *Lancet Rheumatol*. 2021 Sep; 3(9):e605.
29. Vacharathit V., Aiewsakun P., Manopwisedjaroen S., Srisaowakarn Ch., Laopanupong Th., Lu-dowyke N. et al. CoronaVac induces lower neutralising activity against variants of concern than natural infection. *Lancet Infect Dis*. 2021 Oct; 21(10):1352-4.
30. Collier A.Y., McMahan K., Yu J., Tostanoski H., Aguayo R., Ansel J. et al. Immunogenicity of COVID-19 mRNA vaccines in pregnant and lactating women. *JAMA*. 2021. Jun 15; 325(23):2370-80.
31. Behrens G. M., Cossmann A., Stankov M.V., Nehlmeier I., Kempf A., Hofmann M., et al. SARS-CoV-2 delta variant neutralization after heterologous ChAdOx1-S/BNT162b2 vaccination. *Lancet*. 2021 Sep 18; 398(10305):1041-2.
32. Fagni F., Simon D., Tascilar K., Schoenau V., Sticherling M., Neurath M.F. et al. COVID-19 and immune-mediated inflammatory diseases: effect of disease and treatment on COVID-19 outcomes and vaccine responses. *Lancet Rheumatol*. 2021 Oct; 3(10):e724-e736.

СПИСОК АББРЕВИАТУР

АГ	антиген	ОРВИ	острые респираторные вирусные инфекции
АГ-ДЭТ	диагностические экспресс-тесты для выявления антигенов	ОТ- ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
АИЗ	аутоиммунные заболевания	ОШ	отношение шансов
АПФ2 (АСЕ2)	ангиотензинпревращающий фермент 2	ПЦР	полимеразная цепная реакция
АТ	антитело	РА	ревматоидный артрит
ВВ	векторные вакцины	РБВ	рекомбинантные белковые вакцины
ВГВ (HBV)	вирус гепатита В	РНК	рибонуклеиновая кислота
ВГС (HCV)	вирус гепатита С	РФ (RF)	ревматоидный фактор
ВИЧ (HIV)	вирус иммунодефицита человека	СВ	субъединичные вакцины
ВНА	вируснейтрализующие антитела	СГТ	средний геометрический титр
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения	СЗП	свежезамороженная плазма
ДИ	доверительный интервал	СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	CDC	(Centers for Disease Control) - Центр по контролю и профилактике заболеваний, США
ЖАВ	живые аттенуированные вакцины	COVID-19	(Coronavirus disease 2019) - инфекция, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2
ИВ	инактивированные вакцины	EULAR	(European Alliance of Associations for Rheumatology)– Европейский альянс ассоциаций ревматологов
ИВЛ	искусственная вентиляция легких	IgA	иммуноглобулины класса А
ИФА	иммуноферментный анализ	IgM	иммуноглобулины класса М
ИФЛА	иммунофлуоресцентный анализ	IgG	иммуноглобулины класса G
ИФН-γ	интерферон-гамма	IDSA	(Infectious Diseases Society of America)– Американское общество инфекционных болезней
ИХЛА	иммунохемилюминесцентный анализ	FDA	(Food and Drug Administration)–Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, США
ИХА	иммунохроматографический анализ	MERS	(Middle East Respiratory Syndrome)–Ближневосточный респираторный синдром (БВРС), вызываемый коронавирусом MERS-CoV
ИХЛ (CLIA)	реакция иммунохемилюминесценции	N	нуклеокапсидный фосфопротеин SARS-CoV-2 (N-белок)
ИХТ	иммунохимические тесты (тест-системы)	RAPS	(Regulatory Affairs Professionals Society)–Всемирная организация по регуляторным вопросам в сфере здравоохранения и сопутствующих товаров
ИЭ	иммунологическая эффективность	RBD-S	рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2
КВ (CV)	коэффициент вариации	S	поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (Spike, S-белок)
КИ	клинические исследования	SARS	(Severe Acute Respiratory Syndrome)–тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС, атипичная пневмония), вызванный коронавирусом SARS-CoV
КП (S/C)	коэффициент позитивности	SARS-CoV-2	коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2, вызывающий COVID-19
ЛОП	ложноотрицательные результаты/реакции	VOC	(variant of concern)–штаммы вируса, вызывающие опасения
ЛПП	ложноположительные результаты/реакции	WT	(wild-type)–штаммы вируса дикого типа
МКА (mAbs)	моноклональные антитела		
МАНК	метод амплификации нуклеиновых кислот		
ОП	оптическая плотность		
ОР	относительный риск		

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Нижний Новгород

**Центральный офис
ООО «НПО «Диагностические системы»:**

603024, г. Нижний Новгород
ул. Горького, д. 195
тел./факс канцелярии (831) 434-86-83
тел. 8-800-555-03-00 (звонок по России бесплатный)
E-mail: info@npods.ru, selling@npods.ru
официальный сайт: <http://www.npods.ru>

Служба поддержки клиентов:
тел.(831) 467-82-18 (доб.7647,7655)
E-mail: help-ds@npods.ru

Представительства

Москва	Диагностические системы—Столица 123317, г. Москва, Пресненская наб, д. 12, Деловой комплекс "Федерация", Башня "Восток", 29-й этаж тел. (495) 653-81-31, 653-81-32 ds-stolica@bk.ru
Санкт-Петербург	Диагностические системы—СПб 194214, г. Санкт-Петербург, ул.Рашетова, д.14, литю А, пом.12Н тел/факс (812) 414-46-56 info@spb-npods.ru
Красноярск	ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел. (391) 219-22-20,отдел закупок (391) 219-99-10 sbit@ds-s.ru
Екатеринбург	ООО "Диагностические системы—Урал" 620100, г. Екатеринбург, Сибирский тракт, 12, стр. 5, вход 6 отдел продаж: (343) 272-33-08 ds-ural@npods.ru
Республика Украина	ООО «Диагностические системы Украина» 04107, г. Киев, ул. Багговутовская, 8/10 Тел.+380443615576 ua@npods.ru , ds-u@ukr.net
Казахстан	ТОО "FORTIS PAI" (ФОРТИС ПАЙ) 050019, Республика Казахстан, г. Алматы, ул.Чаплина, 71, оф. 2, тел.факс +7-727-234-46-44, +7-727-231-05-12 sales@fortispai.ru www.fortispai.kz
Узбекистан	ООО "INSTEP" 100090, Республика Узбекистан, г. Ташкент, ул. М. Таробий, 29 А, тел. +99871-254-00-26, тел./факс +99871-254-07-05, instep@inbox.ru www.instep.uz

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2754340

**Тест-система и способ дифференцированного выявления
антител к SARS-CoV-2**

Патентообладатель: *Общество с ограниченной
ответственностью "Научно-производственное
объединение "Диагностические системы" (RU)*

Авторы: *Бурков Анатолий Николаевич (RU), Обрядина Анна
Петровна (RU), Матвеева Елена Михайловна (RU),
Климашевская Светлана Владимировна (RU), Ванькова
Ольга Евгеньевна (RU)*

Заявка № **2021103378**

Приоритет изобретения **11 февраля 2021 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **01 сентября 2021 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **11 февраля 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-СПЕКТР

Набор реагентов предназначен для выявления суммарных антител (IgG, IgM и IgA) отдельно к нуклеокапсидному и спайк-белку вируса SARS-CoV-2, методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке или плазме крови человека.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

● Диагностическая чувствительность

Распределение результатов серологического тестирования в группе пациентов с подтвержденным диагнозом «COVID-19», %

Дни после появления симптомов	Антитела к S-белку	Антитела к N-белку	Антитела к S-белку + N-белку
0-7	64,3	60,7	66,7
8-14	93,3	90,0	96,7
>15	100,0	95,5	100,0

Результаты тестирования серологических образцов от реконвалесцентов COVID-19

59-127	100,0	100,0	100,0
--------	-------	-------	-------

● Диагностическая специфичность

Специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-СПЕКТР» составила 99,17% (95% ДИ: 97,04 - 99,77) по оценке 242 образцов случайной выборки сыворотки крови доноров. Общая специфичность набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-СПЕКТР» составила 99,59% (95% ДИ: 98,50 - 99,89).

ОБЛАСТЬ ПРИМИНЕНИЯ

- Диагностика текущей инфекции в комплексе с другими исследованиями и оценка иммунного ответа на перенесенную инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19)
- Минимизация получения ложноположительных результатов серологического тестирования
- Выявление и дифференциация антител до и после вакцинации

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Антитела к N-белку	Антитела к S-белку	Интерпретация
+	+	Подтвержденный положительный результат, перенесенная или текущая инфекция*
+	-	Положительный результат, перенесенная или текущая инфекция, возможна перекрестная реактивность с другими сезонными коронавирусами
-	+	Положительный результат, перенесенная или текущая инфекция, поствакцинальный иммунитет**
-	-	Отрицательный, не содержит антитела к основным белкам вируса

* для подтверждения первичного результата тестирования

** при оценке иммунитета, сформированного вакциной, основанной на S-белке (RBD)

