

ВЗАИМОСВЯЗЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Никитин Ю.В., Александрова Е.В., Криворучко А.Б., Мешкова М.Е.,
Минаева Л.В., Жданов К.В., Артамонов А.А., Козлов К.В.,
Иванов А.М., Мальцев О.В., Иванов К.С., Ляшенко Ю.И.,
Масалов Е.Б.

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Оценка уровня вирусной нагрузки в различных биологических образцах, взятых из дыхательных путей, может указывать на активную репликацию вируса и используется для мониторинга тяжелых респираторных вирусных инфекций. Изучение взаимосвязей вирусной нагрузки SARS-CoV-2 с лабораторными иммунологическими показателями является важным направлением поиска клинико-лабораторных маркеров COVID-19.

Цель – количественно оценить вирусную нагрузку у пациентов с COVID-19. Выявить взаимосвязь уровня вирусной нагрузки с изменениями показателей клеточного звена иммунной системы.

Проведено лабораторное обследование 74 пациентов с диагнозом COVID-19, которые были разделены на 3 группы по степени тяжести заболевания в соответствии с основными клиническими вариантами: с легким, со среднетяжелым и тяжелым течением. Определена общая вирусная нагрузка в клинических образцах – число копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена RNaseP. Выполнена комплексная оценка клеточного звена иммунной системы, определена концентрация IL-6, С-реактивного белка в сыворотке крови.

Выявлена взаимосвязь развития тяжелого состояния у пациентов COVID-19 с уровнем вирусной нагрузки. Высокие уровни вирусной РНК в биологических образцах коррелируют с основными показателями Т-клеточного звена иммунной системы, ассоциированными с тяжестью течения заболевания. В подгруппе пациентов с высокой вирусной нагрузкой выявили сильные положительные корреляционные связи с относительным количеством цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺),

Адрес для переписки:

Никитин Юрий Владимирович
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия
имени С.М. Кирова»
194044, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Лебедева, 6, лит. В.
Тел.: 8 (981) 719-04-84.
E-mail: dr.iuriiinikitin@gmail.com

Address for correspondence:

Yuriy V. Nikitin
S.M. Kirov Military Medical Academy
6 bldg B Acad. Lebedev St
St. Petersburg
194044 Russian Federation
Phone: +7 (981) 719-04-84.
E-mail: dr.iuriiinikitin@gmail.com

Образец цитирования:

Ю.В. Никитин, Е.В. Александрова, А.Б. Криворучко, М.Е. Мешкова, Л.В. Минаева, К.В. Жданов, А.А. Артамонов, К.В. Козлов, А.М. Иванов, О.В. Мальцев, К.С. Иванов, Ю.И. Ляшенко, Е.Б. Масалов «Взаимосвязь вирусной нагрузки и показателей клеточного звена иммунной системы у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 167-180. doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586

© Никитин Ю.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu.V. Nikitin, E.V. Alexandrova, A.B. Krivoruchko, M.E. Meshkova, L.V. Minaeva, K.V. Zhdanov, A.A. Artamonov, K.V. Kozlov, A.M. Ivanov, O.V. Maltsev, K.S. Ivanov, Yu.I. Lyashenko, E.B. Masalov “Interrelations between viral load and cellular immunity in patients with COVID-19 of varying severity”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 167-180.
doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586

© Nikitin Yu.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IBV-2586

активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$), а также абсолютным и относительным количеством активированных В-лимфоцитов и NK-клеток ($CD3^+CD25^+$).

Лабораторный мониторинг показателей клеточного звена иммунной системы в совокупности с оценкой уровня вирусной нагрузки позволит повысить эффективность ранней диагностики состояния пациентов с новой коронавирусной инфекцией. В качестве кандидатов в критерии благоприятного исхода инфекции, вызванной SARS-CoV-2, можно рассмотреть изменение уровней экспрессии маркеров активации на иммунокомпетентных клетках.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вирусная нагрузка, клеточный иммунитет, активированные лимфоциты, провоспалительные цитокины, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия

INTERRELATIONS BETWEEN VIRAL LOAD AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19 OF VARYING SEVERITY

Nikitin Yu.V., Alexandrova E.V., Krivoruchko A.B., Meshkova M.E., Minaeva L.V., Zhdanov K.V., Artamonov A.A., Kozlov K.V., Ivanov A.M., Maltsev O.V., Ivanov K.S., Lyashenko Yu.I., Masalov E.B.

S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Assessment of viral load levels in various biological samples taken from the respiratory tract can be an indicator of an ongoing process of active viral replication and may be used to monitor severe respiratory viral infections. The study of the relationship between SARS-CoV-2 viral load and immunological laboratory parameters is an important step in the search for clinical markers of COVID-19.

The aim of this research was to quantify viral load in patients with COVID-19 and to identify the relationship between viral load and changes in the parameters of the cellular component of the immune system.

A laboratory examination was carried out on 74 patients diagnosed with COVID-19, they were divided into 3 groups based on the severity of the disease: mild, moderate, severe. Total viral load in clinical samples was determined by the number of SARS-CoV-2 RNA copies per 100 copies of the reference RNaseP gene. A comprehensive assessment of the cellular component of the immune system was performed using flow cytometry and direct monoclonal antibodies, and the IL-6, and C-reactive protein concentrations were determined.

We revealed a relationship between the development of serious clinical conditions in the patients with COVID-19, and the levels of viral load. High levels of viral RNA in biological samples correlate with main indicators of the T cell component of the immune system associated with disease severity. In a subgroup of patients with an extremely high viral load, strong positive correlations were found between the relative numbers of cytotoxic lymphocytes ($CD3^+CD8^+$), activated T lymphocytes ($CD3^+HLA-DR^+$), as well as absolute and relative numbers of activated B lymphocytes and NK cells ($CD3^+CD25^+$).

Laboratory monitoring of the cellular component of the immune system, along with the assessment of viral loads, should improve early assessment of clinical condition in the patients with COVID-19. Changes in expression levels of activation markers on immune cells can be potentially viewed as indicators of recovery during COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, viral load, cellular immunity, activated lymphocytes, pro-inflammatory cytokines, polymerase chain reaction, flow cytometry

Введение

Измерение вирусной нагрузки (ВН) в различных биологических образцах, взятых из дыхательных путей, может указывать на активную репликацию вируса и используется для мониторинга тяжелых респираторных вирусных инфекций, включая клиническое прогрессирование и реакцию на лечение [13, 18, 24].

Для постановки диагноза и определения наличия SARS-CoV-2 в образцах мазка со слизистого зева широко применяется анализ методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) в реальном времени [22]. РНК SARS-CoV-2 можно обнаружить в мазках из рото- и носоглотки, а также в мокроте, образцах ткани легких, периферической крови, сыворотке крови, образцах стула и т.д. [4, 5, 25, 26].

В настоящее время изучается взаимосвязь ВН SARS-CoV-2 с тяжестью заболевания и степенью контагиозности вируса для использования в качестве клинического и эпидемиологического маркера COVID-19. Многие исследователи ассоциируют количество РНК вируса, определенного по значениям порогового цикла (Ct) в мазках из рото- и носоглотки в начале болезни, с тяжестью клинического течения и летальным исходом у пациентов с COVID-19 [3, 12, 16, 17, 21, 26, 27].

По данным различных исследований, возрастающая концентрация РНК вируса может указывать на прогрессирование заболевания. Установлены прямые сильные корреляционные связи уровня вирусной нагрузки в плазме крови с концентрациями IL-10, IL-6, IL-15, СРБ, TNF α , миелопероксидазы, количеством нейтрофилов, а также обратные корреляции с насыщением крови кислородом и количеством лимфоцитов, моноцитов периферической крови (ПК) [3, 11, 10]. В свою очередь, иммуносупрессия, индуцированная высокой концентрацией IL-6, характеризуется снижением экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA)-DR на иммунокомпетентных клетках [15], что приводит к нарушению формирования устойчивого Т-клеточного иммунного ответа, необходимого для контроля развития вирусной инфекции [7, 19].

Активная репликация вируса может быть одной из причин нарастающей лимфопении и моноцитопении у тяжелых пациентов с COVID-19 [1, 2], за счет цитопатических реакции и/или стимулирования миграции этих клеток к очагу инфекции в тканях [14].

Таким образом, оценка вирусной нагрузки в дыхательных путях, а также поиск взаимосвязей между этим показателем и тяжестью заболевания является актуальным и приобретает особую значимость для разработки стратегий борьбы с заболеванием и схем его лечения.

Цель исследования – количественно оценить вирусную нагрузку у пациентов с COVID-19. Выявить взаимосвязь уровня вирусной нагрузки с изменениями показателей клеточного звена иммунной системы.

Материалы и методы

Дизайн исследования – одноцентровое одномоментное нерандомизированное проспективное когортное исследование.

В исследование были включены данные лабораторного обследования 74 пациентов в возрасте 19-82 лет ($51 \pm 14,5$ лет); 15 женщин и 59 мужчин (20% и 80% соответственно), находившихся на лечении в клинике инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова с подтвержденным диагнозом COVID-19. Все па-

циенты были разделены на три группы: с легким течением ($n = 2$), со среднетяжелым течением ($n = 60$, далее группа 1) и тяжелым течением заболевания ($n = 12$, далее группа 2). Вследствие малого количества наблюдений пациенты с легкой формой COVID19 в дальнейший анализ включены не были.

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки и ротоглотки проводили при поступлении в клинику с применением наборов реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) и Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (Da An Gene, КНР). В каждой исследуемой пробе одновременно определяли специфические фрагменты N-гена, ORF1ab-гена генома SARS-CoV-2 и эндогенного внутреннего контроля – мРНК человеческой рибонуклеазы Р (RNaseP). Термоциклирование и детекция флуоресцентного сигнала в режиме реального времени проводилась с использованием амплификатора «ДТ-Прайм» («ДНК-технология», Россия).

На определение абсолютного количества вирусных частиц в клинической пробе существенное влияние оказывает фактор вариации общего количества клеток-мишеней, поэтому для ретроспективной оценки вирусной нагрузки в исследуемых образцах мы провели процедуру нормирования данных по внутреннему контролю – RNaseP. Число копий мРНК RNaseP можно выразить как абсолютное количество на одну клетку человека, а при анализе данных ранее проведенных исследований с помощью набора Da An Gene установить прямое соотношение между исходным числом клеток в образце и значениями Ct. Используя этот «ген домашнего хозяйства» для стандартизации полученных данных мы полагали, что он экспрессируется во всех человеческих клетках на стабильном и постоянном уровне, поэтому для построения стандартной калибровочной кривой применяли образцы лейкоцитов периферической крови, полученные с помощью флуоресцентного клеточного сортировщика MoFlow Astrios EQ (Beckman Coulter, США) (рис. 1). Количество копий мРНК гена RNaseP оценивали путем сравнения значений Ct, полученных при исследовании клинических проб, со значениями Ct, определенных в серии десятикратных разведений стандартных образцов лейкоцитов человека.

Для определения исходного количества копий РНК-мишени N-gene SARS-CoV-2 проводили сравнение значений Ct, полученных при исследовании клинических проб, со значениями Ct калибровочной кривой, построенной на основе серии десятикратных разведений образцов контрольного материала SARS-CoV-2 Standard

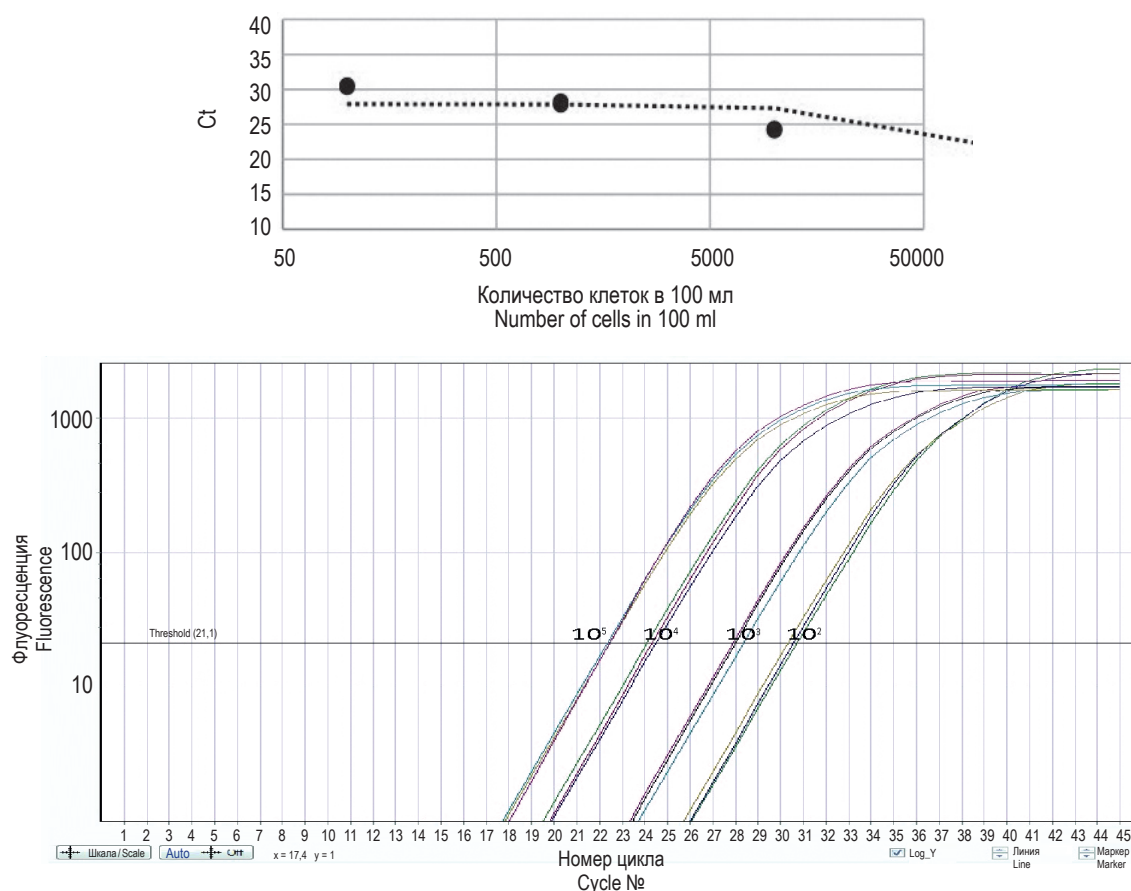


Рисунок 1. Группа данных 1. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК RNaseP из лейкоцитов периферической крови в разной концентрации

Примечание. Использовали 3 повтора суспензии клеток концентрацией 100 000, 10 000, 1000, 100 клеток в 100 мкл транспортной среды. Факт отсутствия внутриэкспериментального отклонения (погрешности) подтверждается, соответственно способ создания суспензии, экстракции НК, обратной транскрипции и амплификации кДНК надежен и позволяет получать воспроизводимые количества РНК из определенного числа клеток.

Figure 1. Data group 1. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of RNaseP cDNA from peripheral blood leukocytes at different concentrations

Note. We used 3 repetitions of the cell suspension at a concentration of 100 000, 10 000, 1000, 100 cells in 100 μ l of the transport medium.

The fact that there is no intra-experimental deviation (error) is confirmed, respectively, the method of creating a suspension, extracting NA, reverse transcription and amplification of cDNA is reliable and allows you to obtain reproducible amounts of RNA from a certain number of cells.

(Bio-Rad, США) (рис. 2 и 3). Данный стандартный контрольный материал представляет смесь синтетических РНК транскриптов 5 генных мишеней SARS-CoV-2 с концентрацией 200 000 копий в 1 мл.

Общую вирусную нагрузку в клиническом образце выражали числом копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена RNaseP, по формуле:

$$NSARS-CoV-2 / NRNaseP \times 100,$$

где NSARS-CoV-2 – число копий РНК SARS-CoV-2, NRNaseP – число копий РНК человеческого RNaseP (расчетные единицы).

Иммунологическое исследование образцов крови включало в себя изучение основных показателей клеточного звена иммунитета. С це-

лью изучения врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы выполнялись следующие исследования периферической крови (ПК): 1) определение абсолютного (10^9 /л) и относительного (%) количества клеток основных популяций лимфоцитов – Т-лимфоциты ($CD3^+CD19^-$), Т-хелперы/индукторы ($CD3^+CD4^+CD45^+$), Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) ($CD3^+CD8^+CD45^+$), истинные натуральные «киллеры» (NK-клетки) ($CD3-CD16^+56^+CD45^+$), В-лимфоциты ($CD19^+CD3^-$); 2) оценка клеточных субпопуляций, с изучением их функциональной активности – Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры NK-клеток (Т-NK-клетки) ($CD3^+CD56^+CD45^+$), NK-клетки, экспрессирующие альфа-цепь анти-

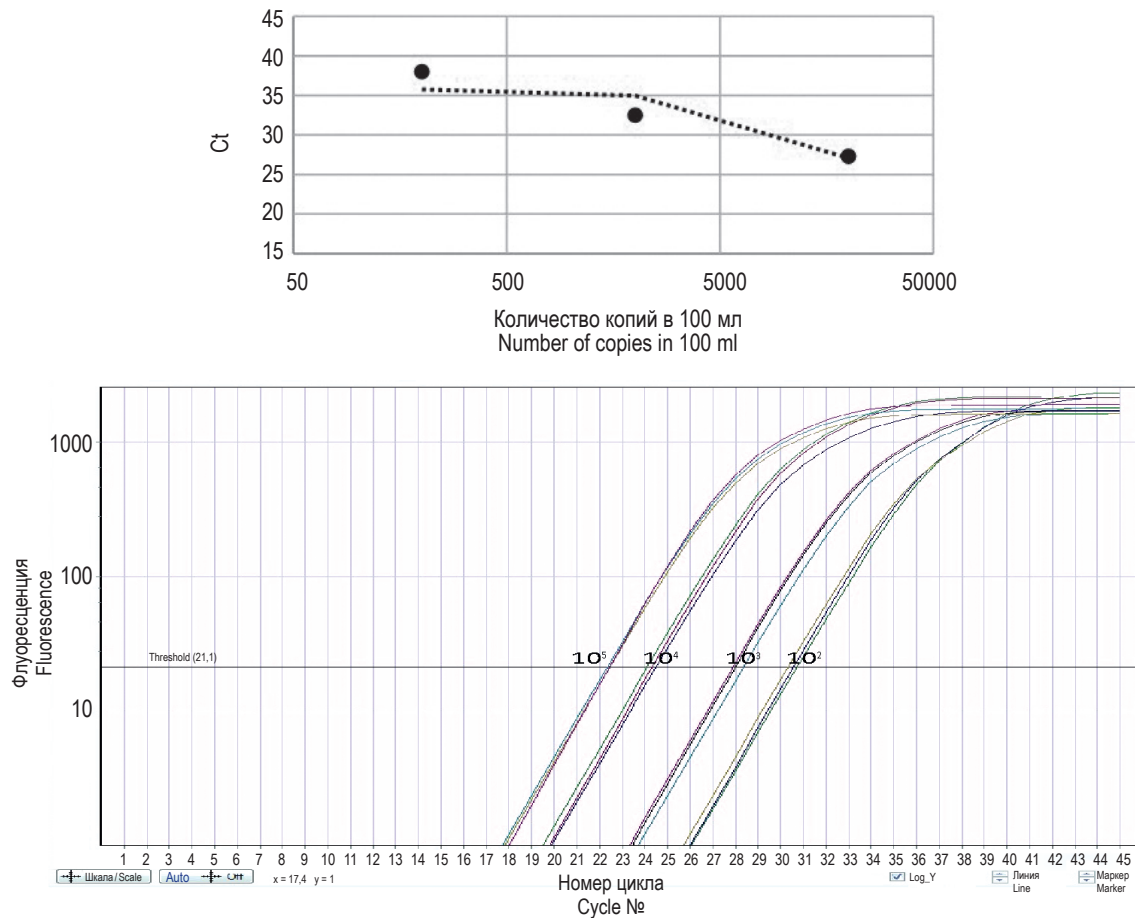


Рисунок 2. Группа данных 2. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК N-gene стандарта SARS-CoV-2 Standard (Bio-Rad, США)

Примечание. Для построения стандартной калибровочной кривой были подготовлены образцы с концентрацией 20 000 копий, 2000 копий и 200 копий в 100 микролитрах транспортной среды.

Figure 2. Data group 2. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of the N-gene cDNA of the SARS-CoV-2 Standard (Bio-Rad, USA)

Note. Samples were prepared at a concentration of 20 000 copies, 2000 copies and 200 copies in 100 microliters of transport medium to construct a standard calibration curve.

гена CD8 (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), активированные В-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺) и активированные цитотоксические лимфоциты (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺), В-лимфоциты и активированные НК-клетки (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора IL-2 (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), регуляторные Т-хелперные клетки (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{neg}CD45⁺), выполняющие иммуносупрессорную функцию. Оценку количественного состава субпопуляций лимфоцитов в периферической крови проводили на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием прямых моноклональных антител (МКА) CD45/CD14 для идентификации популяций лейкоцитов (по прямому (FSC) и боковому светорассеянию (SSC)), пятицветных комбинаций CD45/CD3/CD19/CD16⁺56/HLA-

DR, CD45/CD4/CD8/CD3/CD25, CD45/CD4/CD127/CD3/CD25 и изотипических контролей IgG1/IgG2 той же фирмы.

Для окрашивания проб для проточно-цитометрического анализа использовали следующую методику: брали 100 мкл гепаринизированной ПК, добавляли 10 мкл соответствующих МКА, перемешивали с помощью вортекса и инкубировали 15-20 мин при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли в каждую пробирку по 1 мл лизирующего раствора OptilyseC (Beckman Coulter, США), перемешивали и инкубировали 10 мин. После отмывания фосфатным буфером (PBS) и центрифугирования (5 мин при 1500 об/мин), удаляли супернатант и добавляли в каждую пробирку по 0,5 мл раствора PBS. Полученный осадок ресуспендировали и проводили измерения на проточном цитометре.

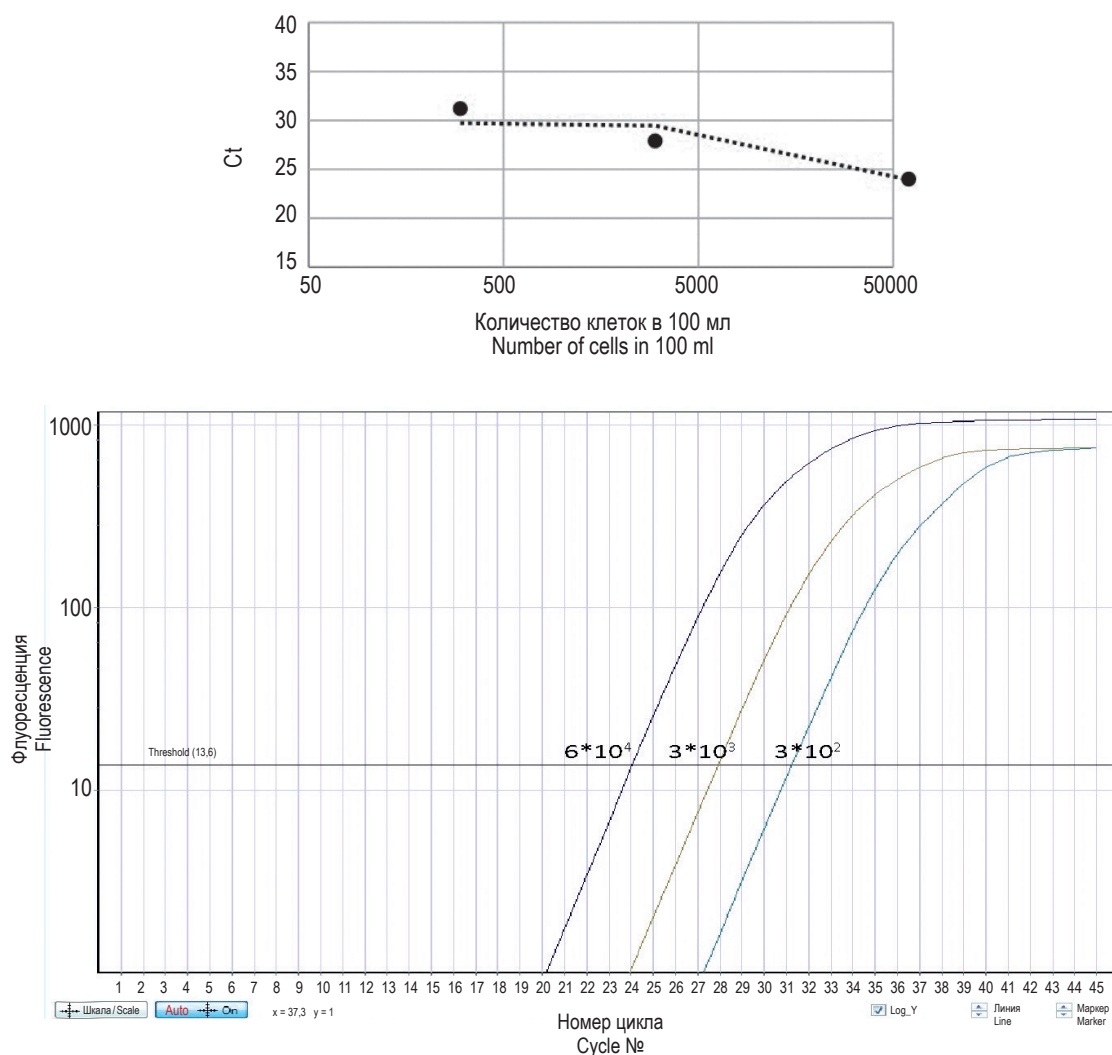


Рисунок 3. Группа данных 3. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК RNaseP из лейкоцитов периферической крови в разной концентрации

Примечание. Для построения стандартной калибровочной кривой были подготовлены образцы с концентрацией 60 000 клеток, 3000 клеток и 300 клеток в 100 микролитрах транспортной среды.

Figure 3. Data group 3. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of RNaseP cDNA from peripheral blood leukocytes at different concentrations

Note. Samples were prepared at 60 000 cells, 3000 cells, and 300 cells in 100 microliters of transport medium to construct a standard calibration curve.

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) определяли методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Швейцария).

Концентрацию цитокинов ИЛ-6 в сыворотке крови определяли «сэндвич»-вариантом твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест», Россия).

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью пакета программ Statistica (версия 10.0, StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 19.7.4, США). Приводимые параметры представлены в формате: Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), где

Me – медиана, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили. Анализ взаимосвязей между признаками проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r -коэффициент). Сравнительный анализ между группами выполняли с использованием рангового непараметрического метода U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался $\leq 0,05$.

Результаты

Данные развернутого иммунологического обследования пациентов со среднетяжелым тече-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АБСОЛЮТНЫХ И ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ ГРУПП 1 И 2, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE ABSOLUTE AND RELATIVE VALUES OF THE PARAMETERS OF THE IMMUNE STATUS OF PATIENTS IN GROUPS 1 AND 2, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	p
Кол-во лейкоцитов, × 10 ⁹ /л Number of leukocytes, × 10 ⁹ /L	4,0-8,8	4,9 (3,7-6,3)	7,2 (5,2-9,4)	
Кол-во нейтрофилов, × 10 ⁹ /л Number of neutrophils, × 10 ⁹ /L	1,8-7,7	3,0 (2,1-4,0)	4,6 (3,1-7,8)	0,014
Кол-во лимфоцитов, % Number of lymphocytes, %	19,0-37,0	30,0 (21,9-37,8)	9,5 (4,0-16,3)	0,000037
Кол-во лимфоцитов, × 10 ⁹ /л Number of lymphocytes, × 10 ⁹ /L	1,2-2,5	1,4 (1,1-1,8)	0,6 (0,4-1,0)	0,000006
CD3 ⁺ T-лимфоциты, % CD3 ⁺ T lymphocytes, %	60,0-80,0	72,9 (67,6-78,4)	77,3 (50,6-81,5)	
CD3 ⁺ T-лимфоциты, × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ T lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,8-2,2	0,98 (0,78-1,35)	0,44 (0,22-0,56)	0,000009
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-лимфоциты (хелперы/ индукторы), % CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes (helpers / inducers), %	30,0-50,0	43,7 (40,0-50,2)	47,5 (33,4-54,6)	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-лимфоциты (хелперы/ индукторы), × 10 ⁹ /л (CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes (helpers / inducers), × 10 ⁹ /L	0,5-1,2	0,62 (0,48-0,79)	0,25 (0,15-0,35)	0,000047
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % (CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	20,0-30,0	23,9 (17,4-29,7)	22,9 (17,0-27,1)	0,033802
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), × 10 ⁹ /L	0,3-0,9	0,33 (0,21-0,51)	0,16 (0,08-0,22)	0,000012
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (Т-киллеры) Т-НК-клетки, % CD3 ⁺ CD56 ⁺ (T killers) T-NK cells, %	1,7-8,6	4,2 (2,0-6,3)	2,9 (2,4-7,5)	
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (Т-киллеры) Т-НК-клетки, × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD56 ⁺ (T-killers) T-NK cells, × 10 ⁹ /L	0,06-0,28	0,05 (0,03-0,09)	0,02 (0,01-0,04)	0,005847
CD4 ⁺ CD8 ⁺ дважды положительные Т-лимфоциты, % CD4 ⁺ CD8 ⁺ double positive T lymphocytes, %	0,0-2,0	0,5 (0,3-0,8)	0,6 (0,1-1,1)	
Соотношение CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ ratio	1,2-2,5	1,9 (1,4-2,7)	2,1 (1,3-2,7)	
CD56 ⁺ HLA-DR ⁺ НК-клетки, экспрессирующие маркер HLA-DR, % CD56 ⁺ HLA-DR ⁺ NK cells expressing the HLA-DR marker, %	0,0-2,0	3,4 (1,7-6,0)	3,5 (2,3-4,2)	
CD3 ⁺ CD56 ⁺ истинные натуральные киллеры (НК-клетки), % CD3 ⁺ CD56 ⁺ true natural killers (NK cells), %	8,0-18,0	12,3 (7,5-16,1)	10,95 (7,4-15,9)	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	p
CD3⁺CD56⁺ истинные натуральные киллеры (NK-клетки), × 10⁹/л CD3 ⁺ CD56 ⁺ true natural killers (NK cells), × 10 ⁹ /L	0,12-0,40	0,17 (0,12-0,24)	0,09 (0,03-0,11)	0,032576
CD3⁺CD8⁺NK-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % CD3 ⁺ CD8 ⁺ NK cells expressing α-chain of CD8 antigen, %	5,0-19,0	4,3 (2,7-8,0)	4,8 (3,5-5,8)	
CD3⁺CD8⁺NK-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD8 ⁺ NK cells expressing α-chain of CD8 antigen, × 10 ⁹ /L	0,06-0,28	0,06 (0,04-0,09)	0,03 (0,02-0,05)	0,013729
CD19⁺В-лимфоциты, % CD19 ⁺ B lymphocytes, %	5,0-19,0	11,3 (8,0-15,0)	11,0 (7,6-16,8)	
CD19⁺В-лимфоциты, × 10⁹/л CD19 ⁺ B lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,10-0,50	0,15 (0,09-0,20)	0,07 (0,04-0,10)	0,000402
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, %	1,3-10,0	17,7 (13,0-23,4)	20,9 (9,8-27,0)	
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, × 10⁹/л CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,02-0,30	0,24 (0,17-0,31)	0,09 (0,06-0,20)	0,000769
CD3⁺HLA-DR⁺В-лимфоциты и активированные NK-клетки, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ B lymphocytes and activated NK cells, %	5,0-20,0	14,9 (11,1-19,7)	16,1 (11,3-24,9)	
CD3⁺HLA-DR⁺В-лимфоциты и активированные NK-клетки, × 10⁹/л CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ B lymphocytes and activated NK cells, × 10 ⁹ /L	0,04-0,50	0,19 (0,14-0,26)	0,1 (0,06-0,16)	0,000182
CD4⁺CD25^{bright}CD45⁺ регуляторные Т-хелперные клетки, % от всех Т-хелперов CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD45 ⁺ regulatory T helper cells, % of all T helpers	1,65-5,75	6,8 (5,6-8,6)	7,5 (5,9-10,6)	
CD3⁺CD25⁺Т-клетки, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ T cells expressing α-chain of IL-2 receptor IL-2, %	3,5-12,5	21,1 (16,8-25,9)	23,4 (17,1-26,2)	
CD3⁺CD25⁺Т-клетки, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ T cells expressing α-chain of IL-2 receptor, × 10 ⁹ /L	0,06-0,35	0,3 (0,22-0,38)	0,16 (0,05-0,25)	0,000294
CD3⁺CD25⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, %	1,7-2,2	0,9 (0,6-1,3)	0,8 (0,6-1,1)	
CD3⁺CD25⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, × 10 ⁹ /L	0,04-0,06	0,01 (0,007-0,020)	0,009 (0,03-0,01)	

ТАБЛИЦА 2. АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ ГРУПП 1 И 2 ($\times 10^9/\text{л}$, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$))

TABLE 2. ABSOLUTE VALUES OF LYMPHOCYTE ACTIVATION MARKERS IN PATIENTS OF GROUPS 1 AND 2 ($\times 10^9/\text{L}$, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$))

Показатель Index	Абсолютные значения Absolute values		p
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	
Активированные Т-лимфоциты Activated T lymphocytes CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,24 (0,17-0,31)	0,09 (0,06-0,20)	0,001
В-лимфоциты и активированные НК-клетки B lymphocytes and activated NK cells CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,19 (0,14-0,26)	0,10 (0,06-0,16)	0,001
Активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2 Activated T lymphocytes expressing the α -chain of the IL-2 receptor CD3 ⁺ CD25 ⁺	0,3 (0,22-0,38)	0,16 (0,05-0,25)	0,001

нием и тяжелым течением представлены в таблице 1 и 2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в группе тяжелых пациентов расчетные показатели вирусной нагрузки были в 16,5 раз выше, чем у пациентов средней тяжести (табл. 3).

При оценке корреляционных связей наблюдались тенденции к снижению относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов

(Т-ЦТЛ) и абсолютного количества активированных CD3⁺ клеток с экспрессией маркера HLA-DR в периферической крови при более высокой вирусной нагрузке. Количество РНК вируса SARS-CoV-2 было достоверно ниже в образцах из носоглотки, взятых на 10-14-й день от момента появления симптомов, чем у пациентов, обследованных на первой неделе заболевания (табл. 4).

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ ВН У ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

TABLE 3. VIRAL LOAD VALUES IN PATIENTS WITH MODERATE TO SEVERE COVID-19

Показатель Index	Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)		p
	Средней тяжести Moderate	Тяжелые Severe	
Вирусная нагрузка (расчетные единицы) Viral load	0,57 (0,03-11,94)	9,55 (0,66-17,44)	0,10

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВН В КОГОРТЕ ПАЦИЕНТОВ (n = 74)

TABLE 4. CORRELATIONS OF VL IN A COHORT OF PATIENTS (n = 74)

Показатель Index	г-коэффициент Спирмена Spearman's r-coefficient p < 0,05
День болезни Day of illness	-0,38
CD3⁺CD8⁺Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	-0,27
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, $\times 10^9/\text{L}$	-0,28

По результатам исследования выделили подгруппу пациентов ($n = 8$), у которых значения медианы ВН составляли 900 расч. ед., т. е. практически в 100 раз превышающие значения ВН у тяжелых больных. У данной группы основные значения показателей клеточного иммунитета, такие как абсолютное количество Т-лимфоцитов, CD3⁺Т-лимфоцитов и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, связанные с риском развития тяжелого течения заболевания, были ниже референсных значений. Основные лабораторные показатели активности воспалительного процесса, используемые при принятии клинических решений (CRP и IL-6),

также выходили за границы референсного интервала (табл. 5).

В подгруппе пациентов с высокой ВН выявили сильные положительные корреляционные связи с относительным количеством цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺), а также абсолютным и относительным содержанием активированных В-лимфоцитов и NK-клеток (CD3⁺CD25⁺). В то же время установили сильную отрицательную корреляцию между количеством РНК вируса и возрастом пациентов (табл. 6).

ТАБЛИЦА 5. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОДГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ($n = 8$)

TABLE 5. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF A SUBGROUP OF PATIENTS ($n = 8$)

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
Кол-во лимфоцитов, $\times 10^9$ /л Number of lymphocytes, $\times 10^9$ /L	1,2-2,5	0,9 (0,73-1,60)
CD3 ⁺ Т-лимфоциты, $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ T lymphocytes, $\times 10^9$ /L	0,8-2,2	0,6 (0,44-1,30)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), $\times 10^9$ /L	0,3-0,9	0,3 (0,1-0,4)
CRP, мг/л CRP, mg/L	0,0-5,0	20,5 (9,0-53,0)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,0-10,0	16,9 (2,6-81,5)

ТАБЛИЦА 6. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВН ПОДГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ($n = 8$)

TABLE 6. CORRELATIONS OF VIRAL LOAD IN A SUBGROUP OF PATIENTS ($n = 8$)

Показатель Index	r-коэффициент Спирмена Spearman's r-coefficient $p < 0,05$
Возраст, лет Age, years	-0,79
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % (CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	0,76
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ активированные Т-лимфоциты, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, %	0,74
CD3 ⁺ CD25 ⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, %	0,74
CD3 ⁺ CD25 ⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, $\times 10^9$ /L	0,84

Обсуждение

Нами установлено, что ВН в образцах, взятых из верхних дыхательных путей у поступающих в стационар пациентов, имела обратную зависимость от сроков развития заболевания ($r = -0,38$). Данная тенденция подтверждается исследованиями, в которых пиковая нагрузка SARS-CoV-2 в образцах верхних дыхательных путей приходилась на ранние стадии заболевания [8, 27], а в образцах нижних дыхательных путей — примерно через две недели после появления симптомов [26]. Оценка ВН у пациентов с ОРДС показала, что пиковое выделение вируса в респираторных образцах происходит примерно через 10-12 дней с момента появления симптомов [6, 9, 26]. Выявленное снижение ВН в зависимости от сроков наблюдения может быть связано с уходом вируса в легкие, с последующим утяжелением заболевания.

Интерес к установлению взаимосвязи ВН с течением заболевания проявляют многие исследователи. Установлено, что количество вирусной РНК, обнаруженное в различных биологических образцах, было выше среди тяжелобольных пациентов, чем среди пациентов с легкой формой заболевания и бессимптомных носителей [23, 26]. В нашем исследовании наблюдалось ярко выраженное превышение значения медианы ВН (в 16,5 раза) в группе тяжелых пациентов. Сравнительный анализ ВН между группами со средней и тяжелой формами течения заболевания выявил различия на уровне статистической тенденции ($p = 0,1$), что по-видимому, связано с особенностями выборки пациентов, вошедших в исследование. Кроме того, снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных общих Т-клеток, ассоциированных с тяжестью течения заболевания, коррелировало с высокой ВН.

Представляются интересными данные литературы о наличии прямых корреляций между вирусной нагрузкой РНК в плазме с количеством нейтрофилов в крови тяжелобольных пациентов и предположение о неспособности контролировать репликацию вируса иммунной системой за счет нейтрофильно-опосредованных реакций в патогенезе тяжелого течения инфекции [3, 20].

В связи с вышесказанным особое внимание было уделено подгруппе из 8 пациентов, у которых ВН в образцах из верхних дыхательных путей приблизительно в 100 раз превышала ВН у остальных исследуемых. Следует отметить, что средний возраст больных этой группы был равен 48 годам (± 8 лет), у них не было выявлено зависимости уровня ВН от сроков развития инфекции, и заболевание завершилось благоприятным исходом. Кроме того, у этих пациентов на-

блюдалось снижение абсолютного числа целого ряда показателей клеточного звена адаптивной иммунной системы (лимфопения, $CD3^+$ лимфоциты, $CD3^+CD8^+$ Т-ЦТЛ) и повышение уровня маркеров воспалительных реакций (СРБ, IL-6), что по данным литературы может сопровождать иммунную дисфункцию при SARS-CoV-2 инфекции [19]. Характер изменения диагностических лабораторных критериев тяжести заболевания, таких как истощение Т-, В-лимфоцитарной клеточной популяции и NK-клеток в периферической крови, а также ассоциация тяжести инфекции с низкой экспрессией человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-DR), опосредованной IL-6, подтверждаются данными литературы [7, 15]. В нашем исследовании были установлены сильные прямые корреляции ВН с относительным количеством Т-ЦТЛ и высоким относительным и абсолютным числом В-лимфоцитов и NK-клеток с экспрессией маркеров активации (HLA-DR, CD25). Выявленные изменения иммунологических показателей, даже на фоне чрезвычайно высокой ВН, могут соответствовать развитию эффективного ответа врожденной и адаптивной иммунной системы на вирусную инфекцию.

Заключение

Выявлена взаимосвязь развития тяжелого состояния у пациентов COVID-19 с уровнем ВН. Высокие уровни вирусной РНК в биологических образцах коррелируют с основными показателями Т-клеточного звена иммунной системы, ассоциированными с тяжестью течения заболевания.

Очевидно, что лабораторная диагностика иммунологических изменений имеет важное значение уже на этапе госпитализации пациентов в стационар. Поиск новых диагностических критериев регуляции иммунного ответа, безусловно, представляет научно-практический интерес. В качестве кандидатов в лабораторные маркеры благоприятного течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, можно рассматривать изменение уровня экспрессии рецепторов активации на иммунокомпетентных клетках.

Таким образом, мониторинг малых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток, экспрессирующих маркеры активации HLA-DR и CD25, в совокупности с оценкой уровня вирусной нагрузки позволит повысить информативность и прогностическое значение ранней диагностики состояния пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Список литературы / References

1. Bao J, Li C., Zhang K., Kang H., Chen W., Gu B. Comparative analysis of laboratory indexes of severe and non-severe patients infected with COVID-19. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 509, pp. 180-194.
2. Bermejo-Martin J.F., Almansa R., Menéndez R., Mendez R., Kelvin D.J., Torres A. Lymphopenic community acquired pneumonia as signature of severe COVID-19 infection. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no. 5, pp. e23-e24.
3. Bermejo Martin J.F., González-Rivera M., Almansa R., Micheloud D., Tedim A.P., Domínguez-Gil M., Resino S., Martín-Fernández M., Ryan Murua P., Pérez-García F., Tamayo L., Lopez-Izquierdo R., Bustamante E., Aldecoa C., Gómez J.M., Rico-Feijoo J., Orduña A., Méndez R., Fernández Natal I., Megías G., González-Estecha M., Carriedo D., Doncel C., Jorge N., Ortega A., de la Fuente A., del Campo F., Fernández-Ratero J.A., Trapiello W., González-Jiménez P., Ruiz G., Kelvin A.A., Ostadgavahi A.T., Oneizat R., Ruiz L.M., Miguéns I., Gargallo E., Muñoz I., Pelegrin S., Martín S., Olivares P.G., Cedeño J.A., Albi T.R., Puertas C., Berezo J.Á., Renedo G., Herrán R., Bustamante-Munguira J., Enríquez P., Cicuendez R., Blanco J., Abadia J., Barquero J.G., Mamolar N., Blanca-López N., Valdivia L.J., Caso B.F., Mantecón M.Á., Motos A., Fernandez-Barat L., Ferrer R., Barbé F., Torres A., Menéndez R., Eiros J.M., Kelvin D.J. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit. Care*, 2020, Vol. 24, no. 1, 691. doi:10.1186/s13054-020-03398-0.
4. Cevik M., Bamford C.G., Ho A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, Vol. 26, no. 7, pp. 842-847.
5. Chen X., Zhao B., Qu Y., Chen Y., Xiong J., Feng Y., Men D., Huang Q., Liu Y., Yang B., Ding J., Li F. Detectable serum severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 level in critically ill patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 8, pp. 1937-1942.
6. Cheng P.K., Wong D.A., Tong L.K., Ip S.M., Lo A.C., Lau C.S., Yeung E.Y., Lim W.W. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2004, Vol. 363, pp. 1699-1700.
7. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I., Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., Lupse M., Kotsaki A., Renieris G., Theodoulou D., Panou V., Koukaki E., Koulouris N., Gogos C., Koutsoukou A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 992-1000.e3.
8. He X., Lau E.H., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., Lau Y.C., Wong J.Y., Guan Y., Tan X., Mo X., Chen Y., Liao B., Chen W., Hu F., Zhang Q., Zhong M., Wu Y., Zhao L., Zhang F., Cowling B.J., Li F., Leung G.M. Temporal Dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 5, pp. 672-675.
9. Hung I.F., Cheng V.C., Wu A.K., Tang B.S., Chan K.H., Chu C.M., Wong M.M., Hui W.T., Poon L.L., Tse D.M., Chan K.S., Woo P.C., Lau S.K., Peiris J.S., Yuen K.Y. Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 10, no. 9, pp. 1550-1557.
10. Laing A.G., Lorenc A., del Molino del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T. S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmägi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham Carl., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M., Hayday A.C. Author Correction: A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med.*, 2020, Vol. 26, no. 12, 1951. doi: 10.1038/s41591-020-01186-5.
11. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., Hirayama A.V., Mastroiani F., Turtle C.J., Harhay M.O., Legrand M., Deutschman C.S. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 12, pp. 1233-1244.
12. Magleby R., Westblade L.F., Trzebucki A., Simon M.S., Rajan M., Park J., Goyal P., Safford M.M., Satlin M.J. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 73, no. 11, pp. e4197-e4205.
13. Memish Z.A., Al-Tawfiq J.A., Makhdoom H.Q., Assiri A., Alhakeem R.F., Albarrak A., Alsubaie S., Al-Rabeeh A.A., Hajomar W.H., Hussain R., Kheyami A.M., Almutairi A., Azhar E.I., Drosten C., Watson S.J., Kellam P., Cotten M., Zumla A. Respiratory tract samples, viral load, and genome fraction yield in patients with Middle East respiratory syndrome. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 210, no. 10, pp. 1590-1594.
14. Monneret G., Cour M., Viel S., Venet F., Argaud L. Coronavirus disease 2019 as a particular sepsis: a 2-week follow-up of standard immunological parameters in critically ill patients. *Intensive Care Med.*, 2020, Vol. 46, no. 9, pp. 1764-1765.
15. Ohno Y., Kitamura H., Takahashi N., Ohtake J., Kaneumi S., Sumida K., Homma S., Kawamura H., Minagawa N., Shibasaki S., Taketomi A. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 2, pp. 193-204.

16. Pan Y., Zhang D., Yang P., Poon L.L.M., Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 4, pp. 411-412.
17. Peiris J.S.M., Chu C.M., Cheng V.C., Chan K.S., Hung I.F., Poon L.L., Law K.I., Tang B.S., Hon T.Y., Chan C.S., Chan K.H., Ng J.S., Zheng B.J., Ng W.L., Lai R.W., Guan Y., Yuen K Y., HKU/UCH SARS Study Group. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*, 2003, Vol. 361, no. 9371, pp. 1767-1772.
18. Rainer T.H., Lee N., Ip M., Galvani A.P., Antonio G.E., Wong K.T., Chan D.P., Ng A.W., Shing K.K., Chau S.S., Mak P., Chan P.K., Ahuja A.T., Hui D.S., Sung J.J. Features discriminating SARS from other severe viral respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 26, no. 2, pp. 121-129.
19. Song C.Y., Xu J., He J.Q., Lu Y.Q. COVID-19 early warning score: a multi-parameter screening tool to identify highly suspected patients. *medRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.03.05.20031906.
20. Venet F., Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 121-137.
21. Veyer D., Kernéis S., Poulet G., Wack M., Robillard N., Taly V., L'Honneur A. S., Rozenberg F., Laurent-Puig P., Bélec L., Hadjadj J., Terrier B., Péré H. Highly Sensitive Quantification of Plasma Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Sheds Light on its Potential Clinical Value. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 73, no. 9, pp. e2890-e2897.
22. WHO. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance, Jan 17, 2020. Available at: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novelcoronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> (accessed Feb 11, 2020).
23. Yuan Y., Wang H., Zhao J., Jing N., Xu J., Li W., Ma B., Zhang J., Li G., Wang S., Li Y., Wang Y., Fan E., Li L. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral RNA Load Status and Antibody Distribution Among Patients and Asymptomatic Carriers in Central China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, 559447. doi: 10.3389/fcimb.2021.559447.
24. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, pp. 1814-1820.
25. Zhang W., Du R.H., Li B., Zheng X.S., Yang X.L., Hu B., Wang Y.Y., Xiao G.F., Yan B., Shi Z.L., Zhou P. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 386-389.
26. Zheng S., Fan J., Yu F., Feng B., Lou B., Zou Q., Xie G., Lin S., Wang R., Yang X., Chen W., Wang Q., Zhang D., Liu Y., Gong R., Ma Z., Lu S., Xiao Y., Gu Y., Zhang J., Yao H., Xu K., Lu X., Wei G., Zhou J., Fang Q., Cai H., Qiu Y., Sheng J., Chen Y., Liang T. 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, Vol. 369, m1443. doi:10.1136/bmj.m1443.
27. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.-L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1177-1179.

Авторы:

Никитин Ю.В. — врач — аллерголог-иммунолог центра клинической лабораторной диагностики, преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Александрова Е.В. — преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Криворучко А.Б. — к.м.н., доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Мешкова М.Е. — к.б.н., старший преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Nikitin Yu.V., Allergologist-Immunologist at the Center of Clinical Laboratory Diagnostics, Lecturer at the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Alexandrova E.V., Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Krivoruchko A.B., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Meshkova M.E., PhD (Biology), Senior Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Минаева Л.В. — к.м.н., старший преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Жданов К.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, начальник кафедры инфекционных болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Артамонов А.А. — студент ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Козлов К.В. — д.м.н., доцент ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Иванов А.М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Мальцев О.В. — к.м.н., старший преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Иванов К.С. — д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Ляшенко Ю.И. — д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Масалов Е.Б. — врач клиник инфекционных болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Minaeva L.V., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Zhdanov K.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Infectious Diseases, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Artamonov A.A., Student, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Kozlov K.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Maltsev O.V., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov K.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Lyashenko Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Masalov E.B., Clinical Infectiologist, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.09.2022

Отправлена на доработку 28.10.2022

Принята к печати 08.11.2022

Received 25.09.2022

Revision received 28.10.2022

Accepted 08.11.2022