Количественный анализ уровня вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких умерших пациентов с COVID-19

А. А. ОДИЛОВ¹, А. В. ВОЛКОВ^{1,2}, А. О. АБДУЛЛАЕВ³, А. Б. СУДАРИКОВ³, И. И. БАБИЧЕНКО¹

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, РФ

²ГБУЗ «Городская клиническая больница им. Е. О. Мухина» ДЗМ, Москва, РФ

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: провести у умерших пациентов с COVID-19 количественный анализ уровня вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в тканях легких и оценить его связи с характером гистологических изменений в легких и продолжительностью пребывания в ОРИТ до наступления летального исхода.

Материалы и методы. В качестве материала использованы срезы фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей легких 36 умерших пациентов с COVID-19. Количественная оценка уровня ВН SARS-CoV-2 проведена с использованием оригинального способа кПЦР РВ. ВН рассчитана по формуле: число копий SARS-CoV-2 / число копий ABL1 × 100, выражена отношением истинного числа копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК гена ABL1.

Результаты. В случаях с отсутствием комплекса гистологических изменений, характерных для диффузного альвеолярного повреждения легких (ДАП), частота выявления РНК SARS-CoV-2 и средний уровень ВН SARS-CoV-2 составили 62,5% (5 из 8 наблюдений) и 104,75 (диапазон 0-313) копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК человеческой гена ABL1. Средний уровень ВН SARS-CoV-2 в легких с преобладанием гистологических изменений, характерных для пролиферативной и экссудативной фазы ДАП, отличался в 60 раз и составил 909 (18-2 657) и 54 924 (834-250 281) копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК человеческой ABL1 соответственно. Среднее время, проведенное в отделении реанимации и интенсивной терапии у группы пациентов с экссудативной и пролиферативной фазами ДАП, составило 10,64 (1-22) и 8,14 (1-21) койко-дня соответственно. Частота выявления РНК SARS-CoV-2 у пациентов с ДАП легких составила 100%.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, кПЦР РВ, вирусная нагрузка, FFPE

Для цитирования: Одилов А. А., Волков А. В., Абдуллаев А. О., Судариков А. Б., Бабиченко И. И. Количественный анализ уровня вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких умерших пациентов с COVID-19 // Туберкулез и болезни лёгких. – 2021. – Т. 99, № 11. – С. 7-15. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-11-7-15>

Quantitative Analysis of SARS-CoV-2 Viral Load in the Lungs of COVID-19 Deceased Patients

А. А. ОДИЛОВ¹, А. В. ВОЛКОВ^{1,2}, А. О. АБДУЛЛАЕВ³, А. Б. СУДАРИКОВ³, И. И. БАБИЧЕНКО¹

¹RUDN University, Moscow, Russia

²E. O. Mukhina City Clinical Hospital, Moscow, Russia

³National Research Center of Hematology, Moscow, Russia

ABSTRACT

The objective: to perform quantitative analysis of SARS-CoV-2 viral load (VL) levels in lung tissues in deceased patients with COVID-19 and to evaluate its association with the nature of histological changes in the lungs and the duration of stay in ICU till the lethal outcome.

Subjects and Methods. Sections of formalin-fixed and paraffin-embedded lung tissues of 36 deceased patients with COVID-19 were used. The SARS-CoV-2 viral load was quantitatively assessed using the original qPCR. VL was calculated using the following formula: copies SARS-CoV-2 / copies ABL1 × 100, expressed as the ratio of the true number of SARS-CoV-2 cDNA copies per 100 copies of ABL1 gene cDNA.

Results. In cases with no histological changes typical of diffuse alveolar lung injury (DAI), the detection rate of SARS-CoV-2 RNA and the average level of the SARS-CoV-2 viral load were 62.5% (5 out of 8 observations) and 104.75 (range 0-313) copies of SARS-CoV-2 cDNA per 100 copies of human ABL1 gene cDNA. The average level of the SARS-CoV-2 viral load in the lungs with prevailing histological changes characteristic of the proliferative and exudative phases of DAI differed by 60 times and amounted to 909 (18-2,657) and 54,924 (834-250,281) copies of SARS-CoV-2 cDNA per 100 copies of human ABL1 cDNA, respectively. The average duration of stay in the intensive care unit in the group of patients with exudative and proliferative phases of DAI was 10.64 (1-22) and 8.14 (1-21) bed-days, respectively. The detection rate of the SARS-CoV-2 RNA in patients with diffuse alveolar lung injury was 100%.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, RT qPCR, viral load, FFPE

For citations: Odilov A.A., Volkov A.V., Abdullaev A.O., Sudarikov A.B., Babichenko I.I. Quantitative analysis of SARS-CoV-2 viral load in the lungs of COVID-19 deceased patients. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2021, Vol. 99, no. 11, P. 7-15. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-11-7-15>

Для корреспонденции:

Одилов Акмалжон Адхамжонович
E-mail: a.odilov.tma@gmail.com

Correspondence:

Akmalzjon A. Odilov
Email: a.odilov.tma@gmail.com

Молекулярно-генетическая диагностика COVID-19 основана на качественном выявлении (есть или нет) РНК SARS-CoV-2 в мазках из но-

соглотки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) [24]. Тем не менее накапливается все больше сведений о клинико-про-

гностической ценности не только детекции РНК возбудителя, но и количественной оценки вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в различных биологических образцах пациентов с COVID-19 [13, 26, 27].

В частности, значения уровня ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки в начале болезни ассоциированы с тяжестью клинического течения и летальным исходом у пациентов с COVID-19 [13, 16, 17, 23, 26, 27]. Например, частота внутрибольничной летальности у пациентов с высоким (cycle threshold (Ct) < 25), средним (Ct 25-30) и низким (Ct > 30) уровнями ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки в момент поступления в стационар составляет 35,0; 17,6; 6,2% соответственно [13].

Но, согласно данным других авторов, уровень ВН SARS-CoV-2 в мазках из верхних дыхательных путей имеет слабую корреляцию с симптоматикой и исходом COVID-19, за исключением одышки и аносмии, которые связаны с более низкой ВН SARS-CoV-2 [5]. Также не отмечено корреляции между значениями порогового цикла Ct кривых ПЦР РВ в начале болезни и риском тяжелого течения COVID-19 с необходимостью проведения оксигенотерапии [2]. А. Machado et al. сообщают, что уровни ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки, выражающиеся в Ct ПЦР РВ, не связаны с клиническими критериями тяжести заболевания и необходимостью искусственной вентиляции легких, но ассоциированы с показателями 30-дневной смертности пациентов с COVID-19 в стационаре [12].

По данным литературы, клинко-прогностическое значение уровня ВН SARS-CoV-2 оценивалось в основном в мазках из носоглотки, в слюне и мокроте пациентов с COVID-19. Однако если учитывать, что среди умерших от COVID-19 доминируют пожилые пациенты со слабой аэрацией легких и нарушением мукоцилиарного клиренса в силу возрастных изменений, то уровень ВН SARS-CoV-2 в слизи носоглотки, слюне и мокроте вряд ли у них отражает тяжесть и масштаб инфекционных поражений легочной ткани.

В настоящее время имеется множество сообщений о выявлении РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом кПЦР РВ в образцах как свежих, так и фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей легких [3, 7, 15, 21, 22]. При этом в большинстве работ количественная оценка уровня ВН SARS-CoV-2 проводилась относительно значения порогового цикла (Ct) ПЦР РВ [7, 21], и только в единичных работах исходное количество анализируемого материала нормировали относительно контрольных генов человека, таких как β -глобин [15], GUSB [22] и GAPDH [3]. Тем не менее ни в одной из указанных работ оценка уровня ВН SARS-CoV-2 не проводилась путем оценки количества истинных копий РНК SARS-CoV-2 и человеческого контрольного гена относительно кривых серийного разведения плазмид, содержащих участки генома коронавируса и контрольного гена

человека. К значениям уровня ВН SARS-CoV-2, выражающимся в числе порогового цикла Ct ПЦР РВ, следует относиться очень осторожно, так как эти значения сильно зависят от качества и количества экстрагированной РНК, от эффективности работы праймеров и зондов, а также прохождения реакции амплификации [8, 20]. Поэтому значения Ct ПЦР РВ не могут быть напрямую интерпретированы как ВН SARS-CoV-2 [4].

Цель исследования: провести у умерших пациентов с COVID-19 количественный анализ уровня вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в тканях легких и оценку его связи с характером гистологических изменений в легких и продолжительностью пребывания в ОПИТ до наступления летального исхода.

Материалы и методы

В качестве материала использовано 144 фиксированных в формалине и заключенных в парафин образца легочной ткани, взятых для обязательных посмертных гистологических исследований у 36 пациентов (21 мужчина и 15 женщин), умерших с COVID-19. Диагноз COVID-19 был подтвержден прижизненным выявлением РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР РВ. Согласно 9-й версии Российских временных методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) от 26.10.2020 г., образцы тканей, фиксированные в 10%-ном нейтральном забуференном растворе формалина не менее 24 ч, могут считаться биологически безопасными. Гистологическое исследование тканей легких выполнялось при окрашивании гематоксилином и эозином по общепринятой методике.

Выделение РНК и получение кДНК

Выделение РНК проводилось из 10-12 срезов парафиновых блоков ткани легких толщиной 3 мкм с использованием набора Pure Link™ FFPE (Thermo Fisher Scientific, США) и innuPREP FFPE total RNA Kit (Analytik Jena GmbH, Германия) согласно инструкции производителя. В зависимости от размеров осадка РНК разведена в 15-30 мкл очищенной от РНКаз воде. Получали кДНК в объеме 20 мкл с использованием 10 мкл раствора РНК и набора реагентов для обратной транскрипции «Реверта-Л» («Интерлабсервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для количественной оценки ВН SARS-CoV-2 была создана генно-инженерная конструкция на основе плазмиды pGEM®-T Easy со вставкой участка кДНК генов *orf1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого *ABL1*. Для этого амплифицированы участки гена *orf1ab* коронавируса SARS-CoV-2 длиной 251 нуклеотид, расположенные между позициями 3160-3410 (NCBI Reference Seq. NC_045512.2) и человеческого мРНК гена *ABL1* длиной 197 нуклеотидов, между позициями 647-843 (Номо

sapiens *ABL* proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6). И использованные праймеры представлены в перечне 1.

Перечень 1. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

List 1. Nucleotide sequences of the used primers

SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, NCBI Reference Seq. NC_045512.2 (3160-3410 nt)	
<i>orf1ab_F</i>	F 5'- TTCTGCTGCTCTTCAACCTGA -3'
<i>orf1ab_R</i>	R 5'- CTTCTTCCACAATGTCTGCATTTT -3'
Homo sapiens <i>ABL</i> proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6 (647-843)	
<i>ABL1_F</i>	F4 5'- CGTGAGAGTGAGAGCAGTCC -3'
<i>ABL1_R</i>	R4 5'- GCTGGATAATGGAGCGTGGT -3'

Полученные ампликоны SARS-CoV-2 и *ABL1* были вставлены в плазмидный вектор pGEM®-T Easy (Promega, США), после трансфекции и культивирования компетентных клеток выделена плазмидная ДНК согласно инструкции производителя. Для калибровки использованы серийные разведения плазмидной ДНК pGEM®-T Easy, содержащие геном SARS-CoV-2 с концентрацией 100 000, 10 000, 1 000, 100 и 50 копий в 10 мкл. Также подготовлены серийные разведения плазмидной ДНК с участком кДНК *ABL1* с концентрацией 60 000, 6 000, 600 и 60 копий в 10 мкл. Для исследования ВН SARS-CoV-2 методом количественной ПЦР РВ нами разработан набор оригинальных олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов комплементарных *orf1ab* гена SARS-CoV-2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_045512) и человеческой мРНК гена *ABL1* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_005157.6). Олигонуклеотиды представлены в перечне 2.

Перечень 2. Нуклеотидные последовательности оригинальных олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов

List 2. Nucleotide sequences of original oligodeoxyribonucleotide primers and fluorescently labeled probes

SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, NCBI Reference Seq. NC_045512.2	
<i>orf1ab_F</i>	F 5'- ATGATAGTCAACAACTGTTGGTCA -3'
<i>orf1ab_R</i>	R 5'- CAACTGGTGTAAGTTCATCTCT -3'
<i>orf1ab_ROX</i>	5' - GGCAGTGAGGACAATCAGACAAC - 3'BQH1
Homo sapiens <i>ABL</i> proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6	
<i>ABL1_F</i>	F4 5'- CGTGAGAGTGAGAGCAGTCC -3'
<i>ABL1_R</i>	R4 5'- GCTGGATAATGGAGCGTGGT -3'
<i>ABL1_R6G</i>	5' - AGCCGCTTCAACACCCTGGC -3' BQH1

Количественную мультиплексную ПЦР-РВ проводили в амплификаторе «Rotor-Gene Q» («Qiagen», USA) при температурном режиме: 95°С – 600 с, 45 циклов 95°С – 15 с, 60°С – 45 с, использовали набор реагентов для ПЦР РВ («Синтол» Россия)

и ДНК плазмид pGEM®-T Easy со вставкой кДНК SARS-CoV-2 и *ABL1*.

Способ количественной оценки ВН SARS-CoV-2 в тканях

Количество истинных копий кДНК SARS-CoV-2 и гена *ABL1* оценивали относительно стандартной кривой, построенной на основе серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-T Easy с корреляцией $R^2 \geq 0,99$. ВН выражали числом копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена *ABL1*, по формуле: $N^{SARS-CoV-2} / N^{ABL1} \times 100$, где $N^{SARS-CoV-2}$ – число копий кДНК SARS-CoV-2, N^{ABL1} – число копий кДНК человеческого *ABL1*.

Результаты исследования

Общая характеристика 36 пациентов (21 мужчина, 15 женщин) с клиническим диагнозом, включающим COVID-19, число койко-дней, проведенных в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), характер доминирующих гистологических изменений и среднее значение ВН SARS-CoV-2 в легочной ткани представлены в таблице.

Все пациенты в зависимости от характера гистологических изменений и среднего уровня ВН SARS-CoV-2 в легких были распределены в 3 группы. В группу 1 вошли 8 пациентов (4 мужчины и 4 женщины), средний возраст 75 лет (диапазон 62-90 лет), основными гистологическими характеристиками в легочной ткани были бронхопневмония, очаги кровоизлияний и фиброз легочной паренхимы. Среднее время пребывания пациентов в ОРИТ составило 17,75 дня (диапазон 2-27 дней). РНК SARS-CoV-2 была выявлена в легких у 5 (62,5%) пациентов, средний уровень ВН SARS-CoV-2 составил 104,75 (0-313) копии кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1*. У 3 пациентов РНК SARS-CoV-2 не выявлена.

Группу 2 составили 14 пациентов (10 мужчин и 4 женщины), средний возраст 74 года (диапазон 52-90 лет), в легочной ткани у них преобладали гистологические признаки, характерные для пролиферативной фазы ДАП. Среднее время, проведенное в ОРИТ, составило 10,64 дня (диапазон 1-22 дня). РНК SARS-CoV-2 выявлена у всех пациентов. Средний уровень ВН SARS-CoV-2 составил 909 (18-2 657) копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1*.

В группу 3 вошли 14 пациентов (7 мужчин и 7 женщин), средний возраст которых составил 80 лет (диапазон 61-95 лет), а среднее время пребывания в ОРИТ – 8,14 дня (1-21 день). Доминирующими гистологическими изменениями в легочной ткани у них были признаки экссудативной фазы ДАП в сочетании с очагами кровоизлияний, бронхопневмонией и менее выраженными признаками ранней пролиферативной фазы ДАП. РНК SARS-CoV-2 обнаружена у всех пациентов, а средний уровень ВН SARS-CoV-2 в данной груп-

Таблица. Общая характеристика, гистологические изменения и средний уровень ВН SARS-CoV-2*Table. General characteristics, histological changes and the mean SARS-CoV-2 viral load*

№	Пол	Возраст	Время*	Фаза ДАП/др. изменения легких	ВН SARS-CoV-2
Группа 1. Пациенты без признаков ДАП легких (n = 8)					
7	М	62	2	/фиброз	0
17	Ж	77	15	/фиброз, эмфизема	0
23	М	90	9	/бронхопневмония, кровоизлияния и фиброз	0
34	Ж	73	23	/бронхопневмония	27
29	Ж	79	24	/бронхопневмония	38
15	М	68	19	/бронхопневмония	190
20	Ж	85	23	/бронхопневмония	270
6	М	66	27	/кровоизлияния и фиброз	313
Группа 2. Пациенты с пролиферативной фазой ДАП легких (n = 14)					
5	Ж	73	18	пролиферативная / бронхопневмония с кровоизлияниями	18
22	М	90	10	пролиферативная /	63
31	Ж	78	10	пролиферативная /	208
8	М	64	19	пролиферативная /	677
32	М	85	10	пролиферативная /	694
11	М	84	17	пролиферативная /	706
33	Ж	86	3	пролиферативная /	810
35	Ж	73	2	пролиферативная /	910
21	М	67	13	пролиферативная /	982
30	М	61	5	пролиферативная / бронхопневмония	1 002
1	М	52	1	пролиферативная / эмфизема	1 016
25	М	74	22	пролиферативная /	1 031
14	М	80	10	пролиферативная /	1 952
16	М	67	9	пролиферативная / бронхопневмония с кровоизлияниями	2 657
Группа 3. Пациенты с экссудативной фазой ДАП легких (n = 14)					
13	Ж	71	1	экссудативная /	834
4	М	76	5	экссудативная и ранняя пролиферативная /кровоизлияния	4 909
19	М	84	8	экссудативная /	7 476
9	Ж	72	12	экссудативная / бронхопневмония	12 116
28	Ж	95	7	экссудативная/	14 522
3	М	84	11	экссудативная и ранняя пролиферативная / бронхопневмония с некрозом	14 937
27	М	84	8	экссудативная/	16 867
18	М	85	16	экссудативная/	17 817
36	М	73	2	экссудативная/	18 219
26	Ж	93	7	экссудативная/	27 349
2	Ж	86	21	экссудативная/	73 214
12	Ж	85	7	экссудативная/	151 183
24	Ж	76	3	экссудативная/	159 216
10	М	61	6	экссудативная/	250 281

Примечание: ДАП – диффузное альвеолярное повреждение легких, * – число койко-дней, проведенных в ОРИТ до летального исхода

пе составил 54 924 (834-250 281) копии кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1*.

Ниже в качестве примеров представлены два случая исследования гистологических изменений и измерения уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях легких пациентов с COVID-19.

Случай 24. Женщина, 76 лет. 02.11.2020 г. поступила в стационар с диагнозом: коронавирусная инфекция COVID-19 (U07.1), осложненная внебольнич-

ной двусторонней полисегментарной пневмонией. 05.11.2020 г. зафиксирована смерть пациентки от дыхательной недостаточности 2-й степени, отека легких и отека мозга. При гистологическом исследовании в легких преобладали признаки экссудативной фазы ДАП. Обнаружены признаки внутриальвеолярного отека с фибрином в просвете альвеол, гиалиновые мембраны различной степени выраженности, выстилающие контуры альвеол, десквамация брон-

хиолярного и альвеолярного эпителия, единичные макрофаги и лимфоциты в полости альвеол (рис. 1А). Наблюдались полнокровие и сладжи в сосудах с очагами кровоизлияний (рис. 1В-С). Для мелких сосудов были характерны тромбозы и периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация (рис. 1D).

Рис. 1. Гистологическая картина легких пациента № 24. Окраска: гематоксилин-эозин, ×100
А. Гиалиновые мембраны и богатая фибрином отечная жидкость в полости альвеол, ×100
В. Полнокровие и сладжи в сосудах легких
С. Очаги кровоизлияния с гемолизом эритроцитов
D. Тромб в просвете сосуда легкого

Fig. 1. The histological signs in the lungs of Patient 24.
Stained: hematoxylin-eosin staining, ×100
A. Hyaline membranes and fibrin-rich edematous fluid in the alveolar cavity, × 100.
B. Plethory and sludges in the lung vessels
C. Hemorrhage foci with RBC hemolysis
D. Thrombus in the lumen of the lung vessel

Из кусочков ткани легких были подготовлены срезы, выделены РНК, получены кДНК путем реакции обратной транскрипции и проведена кПЦР РВ, результаты которой представлены на рис. 2.

Истинные значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 и *ABL1* в образцах из передней верхней (1) и задненижней (2) зоны левого и правого легкого пациента № 24 рассчитаны относительно стандартной кривой серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-T Easy. Согласно формуле $N^{SARS-CoV-2}/N^{ABL1} \times 100$ уровень ВН SARS-CoV-2 составил в левом и правом легких 171 211, 17 787 и 21 752, 426 116 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1* соответственно. Средняя ВН была равна 159 216 кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1*.

Случай 25. Мужчина, 74 года. 21.10.2020 г. поступил в стационар с диагнозом: COVID-19 (U07.1), осложненный внебольничной вирусной двусторон-

Рис. 2. Значения пороговых циклов (Ct), концентрации серийных разведений плазмид pGEM®-T Easy, значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 (А) и *ABL1* (В), а также графические кривые кПЦР РВ пациента № 24
Fig. 2. Values of threshold cycles (Ct), concentration of serial dilutions of pGEM®-T Easy plasmids, values of copies of cDNA of SARS-CoV-2 (A) and *ABL1* (B), as well as curves of RT qPCR of Patient 24

ней нижнедолевой пневмонией. Смерть пациента наступила 05.11.2020 г. от осложнений основного заболевания: J12.9 – внебольничная вирусная двусторонняя пневмония; дыхательная недостаточность 2-3-й степени; интоксикационный синдром; отек легких, головного мозга и I26.9 – тромбоэмболия легочной артерии. При гистологическом исследовании в легких обнаружены преимущественно признаки пролиферативной фазы ДАП – отек и лимфоплазмочитарная инфильтрация междольковых перегородок, а также их утолщение за счет пролиферации фибробластов и гиперплазии альвеолоцитов, отложения коллагена. Отмечались плоскоклеточная метаплазия альвеолярного эпителия и единичные крупные атипичные клетки с множеством ядер (рис. 3). Также обнаружены гиалиновые мембраны, но с меньшей выраженностью и числом по сравнению с экссудативной фазой ДАП.

Из парафинированных блоков ткани легких были подготовлены срезы, выделены РНК, получены кДНК путем реакции обратной транскрипции, проведена кПЦР РВ, результаты которой представлены на рис. 4.

Согласно формуле $N^{SARS-CoV-2}/N^{ABL1} \times 100$ уровень ВН SARS-CoV-2 в образцах левого (левое легкое 1 и 2) и правого легкого (правое легкое 1 и 2) составил 908, 291 и 991, 1 934 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1* соответственно. Средняя ВН SARS-CoV-2 составила 1 031 копию кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий *ABL1*.

Закключение

В нашей когорте пациентов число мужчин превалировало над числом женщин, состав-

Рис. 3. Гистологические изменения в тканях легких пациента № 25. Утолщенные за счет пролиферации фибробластов межальвеолярные перегородки (желтые звездочки) и регенеративная гиперплазия альвеолоцитов 2-го типа. В просвете альвеол встречаются единичные крупные атипичные многоядерные клетки (красные стрелки). Окраска: гематоксилин-эозин, $\times 200$

Fig. 3. Histological changes in the lung tissue of Patient 25. Inter-alveolar septa (yellow asterisks) thickened due to proliferation of fibroblasts and regenerative hyperplasia of type 2 alveolocytes. In the lumen of the alveoli, there are single large atypical multinucleated cells (red arrows). Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$

Рис. 4. Значения пороговых циклов (Ct), концентрация серийных разведений плазмид pGEM®-T Easy, значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 (A) и ABL1 (B), а также графические кривые кПЦР РВ пациента № 25

Fig. 4. Threshold cycle (Ct) values, concentration of serial dilutions of pGEM®-T Easy plasmids, SARS-CoV-2 (A) and ABL1 (B) cDNA copies, and RT qPCR curves of Patient 25

для 58% (21/36) и 42% (15/36) соответственно. Преобладание мужского пола среди умерших, вплоть до двукратного, ранее отмечено и другими исследователями [6]. Средний возраст наших пациентов с COVID-19 составил 76,6 года (диапазон 52-93 года). Для сравнения, по данным

A. C. Borczuk et al., средний возраст пациентов составлял 71,45 года [6].

Частота выявления РНК SARS-CoV-2 в ткани легких у наших пациентов составила 91,6% (33/36). Эти результаты сопоставимы с результатами других работ, где частота выявления варьировала от 75% [14] до 100% [11, 25]. Уровень ВН SARS-CoV-2 в легких у наших пациентов колебался в широком диапазоне – от 18 до 250 281 копии кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1. Средний уровень ВН SARS-CoV-2 в группах пациентов с пролиферативной и экссудативной фазой ДАП отличался в 60 раз, составляя 909 и 54 924 копии кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1 соответственно. О том, что высокий уровень ВН SARS-CoV-2 более характерен для экссудативной фазы ДАП, сообщалось и в других исследованиях [10, 18, 19].

Нами выявлена отрицательная корреляционная связь между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 и временем пребывания пациентов в ОПИТ до летального исхода ($r_s = -0,348$, $p = 0,037$) – пациенты с более высокими значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в легких находились в ОПИТ до летального исхода меньшее количество времени и наоборот. Кроме того, при сравнении фаз ДАП в легких с уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких была выявлена сильная прямая корреляционная связь ($r_s = 0,846$, $p < 0,001$) – более высокая ВН SARS-CoV-2 ассоциировалась с экссудативной фазой ДАП.

Несмотря на то что в гистологической картине легких отдельного пациента обнаруживались преимущественно признаки одной стадии ДАП, в некоторых участках легочной ткани отмечалось и сочетание признаков обеих фаз ДАП. Описано подобное сочетание у одного пациента признаков экссудативной и пролиферативной фаз ДАП [1, 9]. По мнению М. В. Самсоновой и др. [1], это может объясняться волнообразным характером процесса репликации коронавируса SARS-CoV-2 или длительной персистенцией вируса, который может вызывать повторное повреждение ткани легких. Обнаруженные нами крупные атипичные многоядерные клетки не характерны для вируса гриппа, коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV, однако описываются рядом авторов при COVID-19 [3, 19], и могут быть следствием нарушения процесса пролиферации клеток и нормальной репарации эпителия [1]. По данным литературы, диапазон времени выявления РНК SARS-CoV-2 в легочной ткани широко варьируется. Если в одних исследованиях белки SARS-CoV-2 в ткани легких выявлялись только в первые 10 дней и в основном в очагах экссудации [18], то результаты других исследований показали возможность выявления вирусного белка и РНК в более поздние временные промежутки – в первые 4 нед. заболевания [19].

Таким образом, разработанный нами способ количественной оценки ВН SARS-CoV-2 позволяет выявить РНК SARS-CoV-2 в диапазоне от 50 до

250 000 копий кДНК SARS-CoV-2 в 10 мкл раствора кДНК. РНК SARS-CoV-2 в легких пациентов, умерших в ОРИТ с диагнозом, включающим COVID-19, выявляется более чем в 90% случаев. Уровень ВН SARS-CoV-2 $\geq 4\,909$ копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК человеческого *ABL1* выявлялся в

образцах легких с гистологической картиной экссудативной фазы ДАП. Наши исследования показали, что продолжительность жизни пациентов с высоким уровнем ВН SARS-CoV-2 ($\geq 4\,909$ копий) и экссудативной фазой ДАП легких в условиях ОРИТ короче, чем у пациентов с пролиферативной фазой ДАП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самсонова М. В., Черняев А. Л., Омарова Ж. Р., Першина Е. А., Мишнев О. Д., Зайратьянц О. В., Михалева Л. М., Калинин Д. В., Варясин В. В., Тишкевич О. А., Виноградов С. А., Михайличенко К. Ю., Черняк А. В. Особенности патологической анатомии легких при COVID-19 // Пульмонология. – 2020. – Т. 30, № 5. – С. 519-532. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532>.
2. Abdulrahman A., Mallah S.I., Alqahtani M. COVID-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study // BMC Infect. Dis. – 2021. – № 21. – P. 688. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06376-1>.
3. Adachi T., Chong J. M., Nakajima N. et al. Clinicopathologic and immunohistochemical findings from autopsy of patient with COVID-19, Japan // Emerg. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 26, № 9. – P. 2157-2161. doi:10.3201/eid2609.201353.
4. Aquino-Jarquín G. The raw cycle threshold values from reverse-transcription polymerase chain reaction detection are not viral load quantitation units // Clin. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 72, № 8. – P. 1489-1490. doi:10.1093/cid/ciaa830.
5. Biguenet A., Bouiller K., Marty-Quinert S., Brunel A. S., Chirouze C., Lepiller Q. SARS-CoV-2 respiratory viral loads and association with clinical and biological features // J. Med. Virol. – 2021. – Vol. 93, № 3. – P. 1761-1765. doi:10.1002/jmv.26489.
6. Borczuk A. C. Pulmonary pathology of COVID-19: a review of autopsy studies // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2021. – Vol. 27, № 3. – P. 184-192. doi:10.1097/MCP.0000000000000761.
7. Bradley B. T., Maioli H., Johnston R. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series [published correction appears in Lancet. 2020 Aug 1;396(10247):312] // Lancet. – 2020. – Vol. 396 (10247). – P. 320-332. doi:10.1016/S0140-6736(20)31305-2.
8. Dahdouh E., Lázaro-Perona F., Romero-Gómez M. P., Mingorance J., García-Rodríguez J. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load // J. Infect. – 2021. – Vol. 82, № 3. – P. 414-451. doi:10.1016/j.jinf.2020.10.017.
9. Duarte-Neto A. N., Monteiro R. A. A., da Silva L. F. F. et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy // Histopathology. – 2020. – Vol. 77, № 2. – P. 186-197. doi:10.1111/his.14160.
10. Heinrich F., Sperhake J. P., Heinemann A. et al. Germany's first COVID-19 deceased: a 59-year-old man presenting with diffuse alveolar damage due to SARS-CoV-2 infection // Virchows Arch. – 2020. – Vol. 477. – P. 335-339.
11. Hirschbühl K., Dintner S., Beer M. et al. Viral mapping in COVID-19 deceased in the Augsburg autopsy series of the first wave: A multiorgan and multimethodological approach // PLoS One. – 2021. – Vol. 16, № 7. – P. e0254872. Published 2021 Jul 19. doi:10.1371/journal.pone.0254872.
12. Machado A., Salvador P., Oliveira P. et al. The impact of SARS-CoV-2 viral load on the mortality of hospitalized patients: a retrospective analysis // Cureus. – 2021. – Vol. 13, № 7. – P. e16540. doi:10.7759/cureus.16540.
13. Magleby R., Westblade L. F., Trzebucki A., Simon M. S., Rajan M., Park J. et al. Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019 // Clin. Infect. Dis. – 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa851 [Epub ahead of print].
14. Massoth L. R., Desai N., Szabolcs A. et al. Comparison of RNA in situ hybridization and immunohistochemistry techniques for the detection and localization of SARS-CoV-2 in human tissues // Am. J. Surg. Pathol. – 2021. – Vol. 45, № 1. – P. 14-24. doi:10.1097/PAS.0000000000001563.

REFERENCES

1. Samsonova M.V., Chernyaev A.L., Omarova Zh.R., Pershina E.A., Mishnev O.D., Zayratyants O.V., Mikhaleva L.M., Kalinin D.V., Varyasin V.V., Tishkevich O.A., Vinogradov S.A., Mikhaylichenko K.Yu., Chernyak A.V. Specific pathological anatomical parameters of the lungs in COVID-19. *Pulmonologiya*, 2020, vol. 30, no. 5, pp. 519-532. (In Russ.) <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532>.
2. Abdulrahman A., Mallah S.I., Alqahtani M. COVID-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2021, no. 21, pp. 688. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06376-1>.
3. Adachi T., Chong J.M., Nakajima N. et al. Clinicopathologic and immunohistochemical findings from autopsy of patient with COVID-19, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 9, pp. 2157-2161. doi:10.3201/eid2609.201353.
4. Aquino-Jarquín G. The raw cycle threshold values from reverse-transcription polymerase chain reaction detection are not viral load quantitation units. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 72, no. 8, pp. 1489-1490. doi:10.1093/cid/ciaa830.
5. Biguenet A., Bouiller K., Marty-Quinert S., Brunel A.S., Chirouze C., Lepiller Q. SARS-CoV-2 respiratory viral loads and association with clinical and biological features. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 3, pp. 1761-1765. doi:10.1002/jmv.26489.
6. Borczuk A.C. Pulmonary pathology of COVID-19: a review of autopsy studies. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2021, vol. 27, no. 3, pp. 184-192. doi:10.1097/MCP.0000000000000761.
7. Bradley B.T., Maioli H., Johnston R. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series [published correction appears in Lancet. 2020 Aug 1;396(10247):312]. *Lancet*, 2020, vol. 396 (10247), pp. 320-332. doi:10.1016/S0140-6736(20)31305-2.
8. Dahdouh E., Lázaro-Perona F., Romero-Gómez M.P., Mingorance J., García-Rodríguez J. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load. *J. Infect.*, 2021, vol. 82, no. 3, pp. 414-451. doi:10.1016/j.jinf.2020.10.017.
9. Duarte-Neto A.N., Monteiro R.A.A., da Silva L.F.F. et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology*, 2020, vol. 77, no. 2, pp. 186-197. doi:10.1111/his.14160.
10. Heinrich F., Sperhake J.P., Heinemann A. et al. Germany's first COVID-19 deceased: a 59-year-old man presenting with diffuse alveolar damage due to SARS-CoV-2 infection. *Virchows Arch*, 2020, vol. 477, pp. 335-339.
11. Hirschbühl K., Dintner S., Beer M. et al. Viral mapping in COVID-19 deceased in the Augsburg autopsy series of the first wave: A multiorgan and multimethodological approach. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 7, pp. e0254872. Published 2021 Jul 19. doi:10.1371/journal.pone.0254872.
12. Machado A., Salvador P., Oliveira P. et al. The impact of SARS-CoV-2 viral load on the mortality of hospitalized patients: a retrospective analysis. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 7, pp. e16540. doi:10.7759/cureus.16540.
13. Magleby R., Westblade L.F., Trzebucki A., Simon M.S., Rajan M., Park J. et al. Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa851 [Epub ahead of print].
14. Massoth L.R., Desai N., Szabolcs A. et al. Comparison of RNA in situ hybridization and immunohistochemistry techniques for the detection and localization of SARS-CoV-2 in human tissues. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2021, vol. 45, no. 1, pp. 14-24. doi:10.1097/PAS.0000000000001563.

15. Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindenmeyer M.T. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2 // *N. Engl. J. Med.* - 2020. - Vol. 383, № 6. - P. 590-592. doi:10.1056/NEJMc2011400.
16. Pujadas E., Chaudhry F., McBride R., Richter F., Zhao S., Wajnberg A., Nadkarni G., Glicksberg B. S., Houldsworth J., Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality // *Lancet Respir. Med.* - 2020. - Vol. 8, № 9. - P. e70.
17. Rao S.N., Manissero, D., Steele V.R., Pareja J. A narrative systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19 // *Infect. Dis. Ther.* - 2020. - Vol. 9. - P. 573-586. doi: 10.1007/s40121-020-00324-3.
18. Sauter J.L., Baine M. K., Butnor K. J. et al. Insights into pathogenesis of fatal COVID-19 pneumonia from histopathology with immunohistochemical and viral RNA studies // *Histopathology.* - 2020.
19. Schaller T., Hirschtbuhl K., Burkhardt K. et al. Postmortem examination of patients with COVID-19 // *JAMA.* - 2020. - Vol. 323. - P. 2518-2520.
20. Schnuriger A., Perrier M., Marinho V. et al. Caution in interpretation of SARS-CoV-2 quantification based on RT-PCR cycle threshold value // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* - 2021. - Vol. 100, № 3. - P. 115366. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2021.115366.
21. Sekulic M., Harper H., Nezami B. G. et al. Molecular Detection of SARS-CoV-2 Infection in FFPE samples and histopathologic findings in fatal SARS-CoV-2 cases // *Am. J. Clin. Pathol.* - 2020. - Vol. 154, № 2. - P. 190-200. doi:10.1093/ajcp/aqaa091.
22. Tian S., Xiong Y., Liu H. et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies // *ModPathol.* - 2020. - Vol. 33, № 6. - P. 1007-1014. doi:10.1038/s41379-020-0536-x.
23. Trunfio M., Venuti F., Alladio F. et al. Diagnostic SARS-CoV-2 cycle threshold value predicts disease severity, survival, and six-month sequelae in COVID-19 symptomatic patients // *Viruses.* - 2021. - Vol. 13, № 2. - P. 281. Published 2021 Feb 11. doi:10.3390/v13020281.
24. WHO Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. Jan 17, 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
25. Wong D. W. L., Klinkhammer B. M., Djurdjaj S. et al. Multisystemic cellular tropism of SARS-CoV-2 in autopsies of COVID-19 patients // *Cells.* - 2021. - Vol. 10, № 8. - P. 1900. Published 2021 Jul. 27. doi:10.3390/cells10081900.
26. Yu F., Yan L., Wang N. et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients // *Clin. Infect. Dis.* - 2020. - Vol. 71, № 15. - P. 793-798. doi:10.1093/cid/ciaa345.
27. Yu X., Sun S., Shi Y., Wang H., Zhao R., Sheng J. SARS-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression // *Crit. Care.* - 2020. - Vol. 24, № 1. - P. 170. Published 2020 Apr. 23. doi:10.1186/s13054-020-02893-8.
15. Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindenmeyer M.T. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 6, pp. 590-592. doi:10.1056/NEJMc2011400.
16. Pujadas E., Chaudhry F., McBride R., Richter F., Zhao S., Wajnberg A., Nadkarni G., Glicksberg B. S., Houldsworth J., Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 9, pp. e70.
17. Rao S.N., Manissero, D., Steele V.R., Pareja J. A narrative systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19. *Infect. Dis. Ther.*, 2020, vol. 9, pp. 573-586. doi: 10.1007/s40121-020-00324-3.
18. Sauter J.L., Baine M.K., Butnor K.J. et al. Insights into pathogenesis of fatal COVID-19 pneumonia from histopathology with immunohistochemical and viral RNA studies. *Histopathology*, 2020.
19. Schaller T., Hirschtbuhl K., Burkhardt K. et al. Postmortem examination of patients with COVID-19. *JAMA*, 2020, vol. 323, pp. 2518-2520.
20. Schnuriger A., Perrier M., Marinho V. et al. Caution in interpretation of SARS-CoV-2 quantification based on RT-PCR cycle threshold value. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2021, vol. 100, no. 3, pp. 115366. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2021.115366.
21. Sekulic M., Harper H., Nezami B.G. et al. Molecular Detection of SARS-CoV-2 Infection in FFPE samples and histopathologic findings in fatal SARS-CoV-2 cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2020, vol. 154, no. 2, pp. 190-200. doi:10.1093/ajcp/aqaa091.
22. Tian S., Xiong Y., Liu H. et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *ModPathol.*, 2020, vol. 33, no. 6, pp. 1007-1014. doi:10.1038/s41379-020-0536-x.
23. Trunfio M., Venuti F., Alladio F. et al. Diagnostic SARS-CoV-2 cycle threshold value predicts disease severity, survival, and six-month sequelae in COVID-19 symptomatic patients. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 281. Published 2021 Feb 11. doi:10.3390/v13020281.
24. WHO Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. Jan 17, 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
25. Wong D.W.L., Klinkhammer B.M., Djurdjaj S. et al. Multisystemic cellular tropism of SARS-CoV-2 in autopsies of COVID-19 patients. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 8, pp. 1900. Published 2021 Jul. 27. doi:10.3390/cells10081900.
26. Yu F., Yan L., Wang N. et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 15, pp. 793-798. doi:10.1093/cid/ciaa345.
27. Yu X., Sun S., Shi Y., Wang H., Zhao R., Sheng J. SARS-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression. *Crit. Care*, 2020, vol. 24, no. 1, pp. 170. Published 2020 Apr. 23. doi:10.1186/s13054-020-02893-8.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.
Тел.: +7 (495) 433-27-94.

Одилов Акмалжон Адхамжонович

ординатор кафедры патологической анатомии
медицинского института.
E-mail: a.odilov.tma@gmail.com

Волков Алексей Вадимович

доктор медицинских наук, доцент кафедры
патологической анатомии медицинского института.
E-mail: alex.volkoff@gmail.com

Бабиченко Игорь Иванович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий
кафедрой патологической анатомии медицинского
института.
E-mail: babichenko@list.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

RUDN University,
6, Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198.
Phone: +7 (495) 433-27-94.

Akmalzhon A. Odilov

Resident Physician of Pathological Anatomy Department
of Medical Institute.
Email: a.odilov.tma@gmail.com

Aleksey V. Volkov

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of Pathological
Anatomy Department of Medical Institute.
Email: alex.volkoff@gmail.com

Igor I. Babichenko

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Pathological Anatomy Department of Medical
Institute.
Email: babichenko@list.ru

*ФГБУ «Национальный исследовательский центр
гематологии» МЗ РФ,
125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4.
Тел.: +7 (495) 612-65-11.*

Абдуллаев Адхамжон Одилович

*кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной гематологии.
E-mail: adham_abdullaev@mail.ru*

Судариков Андрей Борисович

*доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной гематологии.
E-mail: andrey@sudarikov.net*

*National Research Center of Hematology,
4, Novy Zykovskiy Drive,
Moscow, 125167.
Phone: +7 (495) 612-65-11.*

Adkhamzhon O. Abdullaev

*Candidate of Medical Sciences,
Senior Researcher of Molecular Hematology Laboratory.
Email: adham_abdullaev@mail.ru*

Andrey B. Sudarikov

*Doctor of Biological Sciences,
Head of Molecular Hematology Laboratory.
Email: andrey@sudarikov.net*

Поступила 10.09.2021

Submitted as of 10.09.2021