

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ
У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ,
ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: В.И.Майсеенко, к.м.н., доцент И.В.Буйневич, д.м.н.,
профессор И.О.Стома, к.м.н., доцент Е.В.Воропаев, А.А.Ковалев,
О.В.Осипкина, С.В.Гопоняко

Гомель, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки риска фиброза легких (J84) у пациентов с инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику фиброза легких у взрослых пациентов.

Инструкция предназначена для врачей общей практики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам терапевтического профиля в стационарных условиях.

1. Показания к применению

Заболевания, классифицированные в рубрике «коронавирусная инфекция неуточненная COVID-19» (B34.2); «COVID-19, вирус идентифицирован» (U07.1); «COVID-19, вирус не идентифицирован» (U07.2).

2. Противопоказания

Противопоказания отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения:

- микропланшетный фотометр для проведения иммуноферментного анализа (ИФА);
- промыватель иммунологических планшет;
- термошейкер;
- холодильник, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °С;
- морозильник, поддерживающий температуру в диапазоне минус 18...минус 20 °С;
- центрифуга (максимальное ускорение – не менее 4000g);
- микроцентрифуга-вортекс;

- комплект пипеточных дозаторов (объемы: 0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл);
- штатив для вакуумных пробирок с ЭДТА для взятия крови;
- штатив «рабочее место» для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 мл;
- термоконтейнер для транспортировки с температурным режимом +2...+8 °С.
- наборы реагентов для проведения иммуноферментного анализа для определения концентрации трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) в сыворотке (плазме) крови;
- наборы реагентов для проведения иммуноферментного анализа для выявления иммуноглобулинов класса М к SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови;
- наборы реагентов для проведения иммуноферментного анализа для определения концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке (плазме) крови;
- этиловый спирт 80%;
- вакуумные пробирки с ЭДТА для взятия крови объемом 4-5 мл;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 10, 20, 200, 1000 мкл;
- наконечники без фильтра для автоматического дозатора объемом 200 мкл, 1000 мкл;
- комплект средств индивидуальной защиты (одноразовые стерильные халаты, латексные перчатки, маски, бахилы, шапочки).

4. Технология осуществления метода

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется в несколько этапов.

Этапы

4.1 Получение и транспортировка биологического материала

В качестве биологического материала используют венозную кровь из кубитальной вены. Получение биологического материала осуществляют натошак в одноразовые пробирки с ЭДТА в соответствии с инструкцией о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований (Приложение к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 № 1123). Транспортировку образцов крови в лабораторию осуществляют в течение 1-2 часов после взятия биоматериала в термоконтейнере с температурным режимом $+2...+8$ °С. Кровь для получения плазмы центрифугируют в течение 10-15 мин. при ускорении 1500-2000 g, затем отбирают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.

4.2 Определение концентрации трансформирующего фактора роста $\beta 1$ в плазме крови

Определение концентрации трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta 1$) в плазме крови пациентов методом ИФА с применением наборов реагентов для определения концентрации трансформирующего фактора роста $\beta 1$ в сыворотке (плазме) крови согласно инструкции производителя. Единицы измерения TGF- $\beta 1$ – пг/мл.

4.3 Выявление иммуноглобулинов класса М к вирусу SARS-CoV-2 в плазме крови и интерпретация результатов

Выявление иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу SARS-CoV-2 человека в плазме крови пациентов методом ИФА с применением наборов реагентов для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу SARS-CoV-2 и интерпретацию проводят согласно инструкции производителя. Для дальнейшего расчета показателя вероятности

развития фиброза легких по формуле 1 используют значения согласно таблице 1.

Таблица 1 – Интерпретация полученного результата по выявлению иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу SARS-CoV-2 для расчета показателя вероятности развития фиброза легких

Результат по выявлению иммуноглобулинов класса М (IgM) к вирусу SARS-CoV-2	Значение для дальнейшего расчета показателя вероятности развития фиброза легких по формуле 1
Отрицательный или сомнительный (IgM не выявлены)	0
Положительный (IgM выявлены)	1

4.4 Определение концентрации С-реактивного белка в плазме крови

Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) в плазме крови пациентов методом ИФА с применением наборов реагентов для определения концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке (плазме) крови согласно инструкции производителя. Единицы измерения СРБ – мг/л. (Примечание: для пересчета концентрации согласно инструкции, к набору используют формулу: 1 МЕ/л СРБ соответствует 1,02 мг/л СРБ).

5. Проведение расчета

Полученные на этапах 4.2-4.4 данные в виде числовых значений подставляют в уравнение и рассчитывают значение Z (показатель вероятности развития фиброза легких) по формуле 1:

$$Z = -3,399 + 0,002 \times X_1 - 0,67 \times X_2 + 0,008 \times X_3, \quad (1)$$

где Z – показатель вероятности развития фиброза легких;

X₁ – концентрация в плазме крови трансформирующего фактора

роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), пг/мл;

X_2 – значение по интерпретации полученного результата по выявлению иммуноглобулинов класса М (IgM), взятое из таблицы 1;

X_3 – концентрация в плазме крови С-реактивного белка (СРБ), мг/л.

6. Определение вероятности

Полученный показатель Z для определения дальнейшей тактики ведения пациента сравнивают с пороговым значением, указанным в таблице 2.

Таблица 2 – Интерпретация показателя Z

Значение Z	Вероятность развития фиброза легких
$\geq 0,509$	Высокая
$< 0,509$	Низкая

7. Принятие управленческого решения

При высокой вероятности развития фиброза легких (J84) медицинское наблюдение за пациентами осуществляется согласно пункту 2 приложения 13 к Рекомендациям об организации оказания медицинской помощи пациентам с инфекцией COVID-19, утвержденных приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.06.2022 г. № 841; при низкой вероятности развития фиброза легких (J84) медицинское наблюдение за пациентами осуществляется согласно пункту 1 приложения 13 к Рекомендациям об организации оказания медицинской помощи пациентам с инфекцией COVID-19, утвержденных приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.06.2022 г. № 841.

8. Перечень возможных осложнений или ошибок

При точном соблюдении инструкции осложнения и ошибки маловероятны.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2

В большинстве случаев инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, протекает с поражением респираторных отделов [1, 2]. В настоящее время активно продолжают изучаться свойства вируса SARS-CoV-2 и ряд патологических изменений, которые он вызывает в организме человека как в острую фазу заболевания, так и спустя длительный период времени [3], [4], [5], [6]. Не смотря на объявленный пятого мая 2023 года Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) конец пандемии новой коронавирусной инфекции, ее последствия, получившие название пост-COVID-19 синдром, все также актуальны в настоящее время [7], [8], [9], [10], [11].

После перенесенной инфекции, пациенты отмечали снижение качества повседневной жизни, ограничение физической активности, за счет сохранения симптомов болезни на протяжении нескольких месяцев. Отсюда и интерес к пациентам, перенесших COVID-19 инфекцию различной степени тяжести, имеющих жалобы со стороны органов и систем. Согласно международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10), данное состояние кодируется под рубрикой U09.9 Состояние после COVID-19 неуточненное. Постковидный синдром (Post COVID-19 condition) включает в себя 33 симптома, которые сохраняются после перенесенной COVID-19 инфекции и длятся до нескольких недель или месяцев. Данный синдром рассматривается как комплекс осложнений, вызванный вирусом SARS-CoV-2.

Пост-COVID-19 синдром или Long-COVID ВОЗ описывает как широкий спектр вновь возникших или продолжающихся симптомов, с которыми пациенты сталкиваются более чем через месяц после инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Long-COVID-19 возникает у пациентов с разной степенью тяжести перенесенной инфекции COVID-19, при этом активно изучаются возможные предикторы нарушений [8], [9], [10], [11].

Анализ состояния пациентов, перенесших тяжелую форму при COVID-19, выявил высокую частоту фиброзных нарушений функции легких в ранний период выздоровления [12]. На основании анализа образцов легких больных COVID-19 были определены 3 основных гистологических варианта повреждения легочной ткани: эпителиальные изменения с диффузным альвеолярным повреждением (85%), сосудистый паттерн с поражением микрососудов (59%) и фиброзный паттерн с интерстициальным фиброзом (22%) [13]. По данным S.B. Polak et al. [13], гистологическая картина повреждения легочной ткани, характерная для интерстициального фиброза, выявлялась примерно с 3-й недели заболевания COVID-19 и не была связана с использованием аппарата искусственной вентиляции лёгких. Эпителиальные и сосудистые паттерны могут присутствовать на всех стадиях симптоматического COVID-19, тогда как фиброзный паттерн (гиперплазия фибробластов, фиброз, отложение коллагена в перегородках, микрокистозное сотовое легкое) проявляется примерно с 3-й недели заболевания.

С помощью методов биоинформационного анализа было установлено, что связывание вируса SARS-CoV-2 с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ-2), которых особенно много в легочной ткани, приводит к активации экспрессии мРНК факторов роста, инициирующих процессы фиброобразования, таких как

трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (Transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF), фибронектин [14]. Предполагается, что развитию фиброза легких у пациентов с COVID-19 может способствовать дисбаланс в ренин-ангиотензиновой системе. В результате высокоаффинного связывания SARS-CoV-2 с рецептором АПФ-2 снижается экспрессия АПФ-2 и повышается уровень ангиотензина 2, который играет ключевую роль в процессах aberrантного заживления повреждений и формирования легочного фиброза. Эти процессы включают выработку провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (interleukin, IL) 6 (IL-6) и IL-8, выработку активных форм кислорода инфицированными клетками альвеолярного эпителия и активацию TGF- $\beta 1$, трансформирующий фактор роста-бета1 (TGF- $\beta 1$), является основным провоспалительным цитокином, который стимулирует пролиферацию фибробластов, и активирует их для инициирования профибротических реакций, способствует прогрессированию и развитию легочного фиброза, при этом отсутствует связь между степенью тяжести и периодом, прошедшим после перенесенной COVID-19 инфекцией, а также имеющимися жалобами со стороны органов дыхания [15].

В связи с вышеизложенным большое прогностическое значение имеет возможность спрогнозировать риск развития фиброза легких у пациентов с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2.

Применение описанного нами метода позволит еще в первые дни заболевания коронавирусной инфекцией COVID-19 на основании лабораторных данных спрогнозировать риск формирования фиброза легких у пациентов для дальнейшей оптимизации процесса обследования в условиях продолжающейся циркуляции вируса SARS-CoV-2 и определения тактики ведения пациентов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J.M. McGoogan // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323, № 13. – P. 1239–1242.
2. Clinical characteristics of patients with 2019 coronavirus disease in a non-Wuhan area of Hubei Province, China: a retrospective study / X. Zhao [et al.] // *BMC Infect Dis*. – 2020. – Vol 20, № 311.
3. Genome Structure, Life Cycle, and Taxonomy of Coronaviruses and the Evolution of SARS-CoV-2 / K. Lamkiewicz [et al.] // *Current topics in microbiology and immunology*. – 2023. – Vol. 439. – P. 305-339.
4. SARS-CoV-2 restructures host chromatin architecture / R. Wang [et al.] // *Nat Microbiol*. – 2023. – Vol. 8, № 4. – P. 679-694.
5. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 postfusion spike in membrane / W. Shi [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 619, № 7969. – P. 403-409.
6. Crystal structure of the CoV-Y domain of SARS-CoV-2 nonstructural protein 3 / Y. Li [et al.] // *Sci Rep*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 2890.
7. Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein / Ł. Suprewicz [et al.] // *Neurol Neurochir Pol*. – 2023. – Vol. 57, № 1. – P. 14-25.
8. Author Correction: Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations / H.E. Davis [et al.] // *Nat Rev Microbiol*. – 2023. – Vol. 21, № 6. – P. 408.
9. Long COVID: mechanisms, risk factors and recovery / R. Astin [et al.] // *Exp Physiol*. – 2023. – Vol. 108, № 1. – P. 12-27.
10. Long COVID: An inevitable sequela of SARS-CoV-2 infection / C.-C. Lai [et al.] // *J Microbiol Immunol Infect*. – 2023. – Vol. 56, № 1. – P. 1-9.

11. Lippi, G. COVID-19 and its long-term sequelae: what do we know in 2023? / G. Lippi, F. Sanchis-Gomar, B.M. Henry // *Pol Arch Intern Med.* – 2023. – Vol. 133, № 4. – P. 16402.
12. Tracking the time course of pathological patterns of lung injury in severe COVID-19 / T. Mauad [et al.] // *Respir Res.* – 2021. – Vol. 22, № 1. – P. 32.
13. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression / S.B. Polak [et al.] // *Mod Pathol.* – 2020. – Vol. 33, № 11. – P. 2128-2138.
14. Udwadia, Z.F. Post-COVID lung fibrosis: The tsunami that will follow the earthquake / Z.F. Udwadia, P.A. Koul, L. Richeldi // *Lung India.* – 2021. – Vol. 38, № Supplement. – P. S41-S47.
15. Delpino, M.V. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis / M.V. Delpino, J. Quarleri // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 340.