

Опубликовано: 16 марта 2020 г.

<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0819-2>

Широта сопутствующих иммунных ответов при выздоровлении пациента: история болезни с не тяжелой формой COVID-19

Ирана Тевараджан, Тхи Х. О. Нгуен, Мариос Кутсакос, Джулиан Друс, Леон Кейли, Каролин Э. ван де Сандт, Сяосяо Цзя, Суэллен Николсон, Майк Кэттон, Бенджамин Коуи, Стивен Ю. С. Тонг, Шарон Р. Левин и Кэтрин Кедзирска.

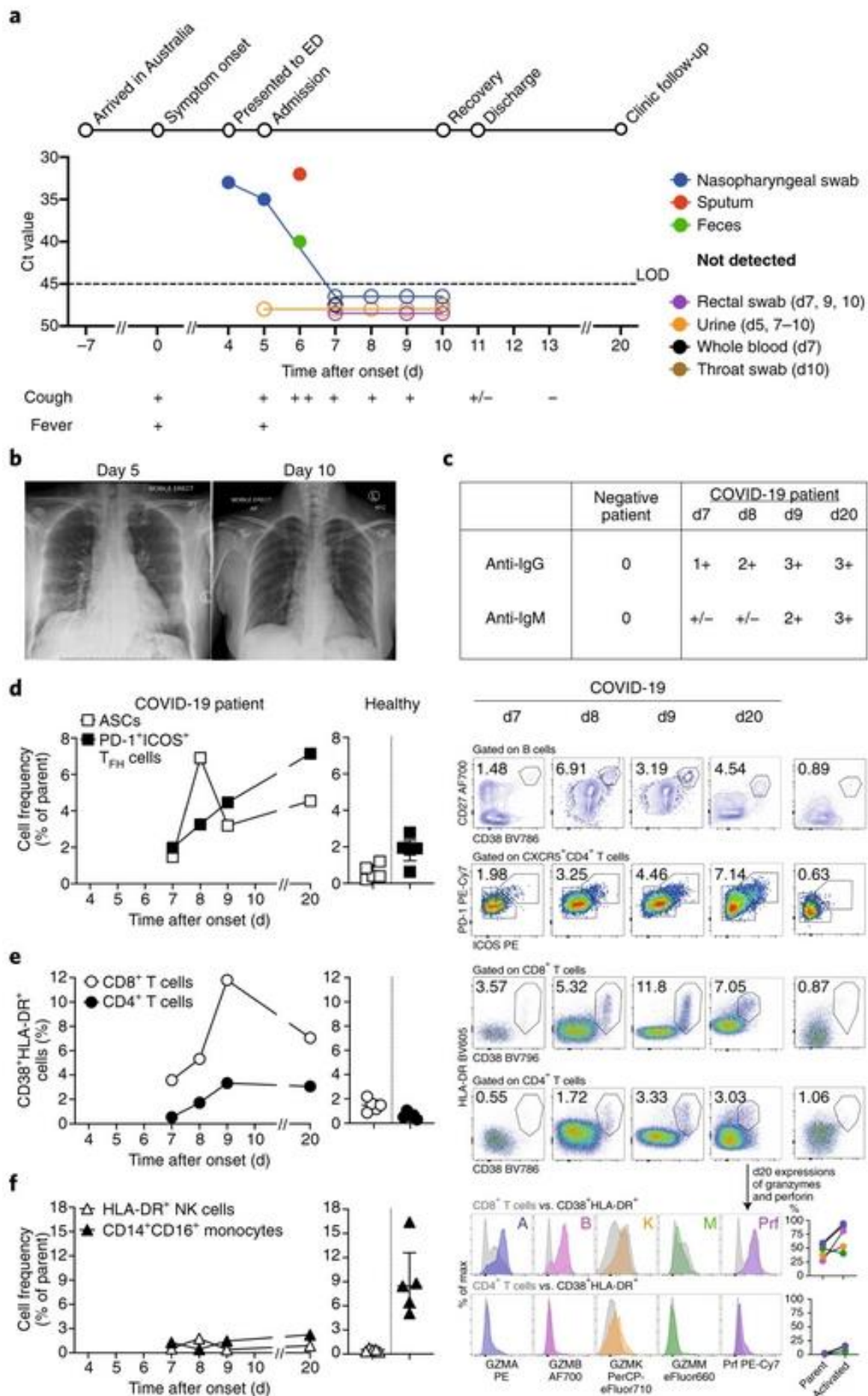
[Nature Medicine](#) (2020) | [Cite this article](#)

731 Altmetric | [Metrics](#)

Редактору. Мы сообщаем о кинетике иммунных реакций в отношении клинических и вирусологических особенностей пациентки с легкой и умеренной коронавирусной болезнью 2019 года (COVID-19), которая потребовала госпитализации. Увеличенные секретирующие антитела (ASCs), фолликулярные хелперные Т-клетки (TFH-клетки), активированные CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки и антитела к иммуноглобулину М (IgM) и IgG, которые связывают вызывающий COVID-19 коронавирус SARS-CoV-2, были обнаружены в крови до симптоматического выздоровления. Эти иммунологические изменения сохранялись в течение не менее 7 дней после полного исчезновения симптомов.

47-летняя женщина из Ухани, провинция Хубэй, Китай, была доставлена в отделение неотложной помощи в Мельбурне, Австралия. Симптомы у нее начались на 4 дня раньше: вялость, боль в горле, сухой кашель, плевритная боль в груди, легкая одышка и субъективная лихорадка (рис. 1a). Она отправилась из Ухани в Австралию за 11 дней до поступления. Она не имела контактов с рынком морепродуктов Нуанан или с известными случаями COVID-19. В остальном она была здорова и не курила, не принимала никаких лекарств. Клиническое обследование выявило температуру 38,5°C, частоту пульса 120 ударов в минуту, артериальное давление 140/80 мм рт.ст., частоту дыхания 22 вдоха в минуту и насыщение кислородом 98% при дыхании окружающим воздухом. При аускультации легких выявляется двухсторонний хрип. На 4-ый день SARS-CoV-2 был обнаружен в образце мазка из носоглотки методом ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени. SARS-CoV-2 был снова обнаружен на 5-6 день в образцах из носоглотки, мокроты и кала, но не обнаруживался с 7-го дня (рис. 1a). С-реактивный белок в крови был повышен до 83,2 с нормальным количеством лимфоцитов ($4,3 \times 10^9$ клеток на литр (диапазон от $4,0 \times 10^9$ до $12,0 \times 10^9$ клеток на литр)) и нейтрофилов ($6,3 \times 10^9$ клеток на литр (диапазон $2,0 \times 10^9$ – $8,0 \times 10^9$ клеток на литр)). Других респираторных патогенов обнаружено не было. Её лечением была внутривенная регидратация жидкости без дополнительной оксигенации. Антибиотики, стероиды или противовирусные препараты не вводились. Рентгенография грудной клетки показала би-базальные инфильтраты на 5-й день, которые очистились на 10-й день (Рис. 1b). На 11-й день она была выписана в домашнюю изоляцию. Ее симптомы полностью исчезли к 13-му дню, и она оставалась здоровой на 20-й день, с постепенным увеличением SARS-CoV-2-связывающих IgM и IgG-антител в плазме с 7-го по 20-й день (рис.1c и расширенные данные рис.1). Пациентка была зачислена через Платформу готовности к исследованиям Sentinel Travelers для исследования новых инфекционных заболеваний нового коронавируса (SETREP-ID-coV) и предоставила письменное информированное согласие перед началом исследования. Уход за пациентами и их исследование проводились в соответствии с руководящими принципами ведения истории болезни и Хельсинкской декларацией. Эксперименты проводились с одобрениями этики HREC / 17 / MH / 53, HREC / 15 / MonH / 64 / 2016.196 и UoM # 1442952.1 / # 1443389.4.

Рис. 1: Появление иммунных ответов при нетяжелых симптомах COVID-19.



а. Хронология COVID-19, показывающая обнаружение SARS-CoV-2 в мокроте, носоглоточных аспиратах и кале, но не в моче, ректальном мазке или цельной крови. SARS-CoV-2 определяли количественно с помощью rRT-PCR; порог цикла (Ct) показан. Более высокое значение Ct означает более низкую вирусную нагрузку. Пунктирная горизонтальная линия обозначает порог предела обнаружения (LOD) (Ct = 45). Открытые круги, не обнаружимые SARS-CoV-2.

б. Рентгенограммы переднезадней грудной клетки на 5-ый и 10-ый дни после появления симптомов, показывающих радиологическое улучшение от госпитализации до выписки.

с. Окрашивание иммунофлуоресцентными антителами, повторенное дважды в двух экземплярах, для выявления IgG и IgM, связанных с SARS-CoV-2-инфицированными клетками Vero, оценивали с помощью плазмы (разбавленной 1:20), полученной в дни 7-9 и 20 после появления симптомов.

d – f. Частота (левый набор графиков) ASC CD27hiCD38hi (gated на лимфоцитах CD3 – CD19 +) и активированных клеток ICOS + PD-1 + TFH (gated на лимфоцитах CD4 + CXCR5 +) (d), активированных CD38 + HLA-DR + CD8 + или CD4 + Т-клетки (e) и CD14 + CD16 + моноциты и активированные HLA-DR + клетки-естественные киллеры (NK) (стробированные на CD3-CD14-CD56 + клетках) (f), обнаруженные проточной цитометрией крови, собранной на 7-9-е сутки и 20 после появления симптомов у пациента и у здоровых доноров (n = 5; медиана с межквартильным диапазоном); примеры стробирования справа. Справа внизу гистограммы и линейные графики, окрашивание гранзима А (GZMA (A)), гранзима В (GZMB (B)), гранзима К (GZMK (K)), гранзима М (GZMM (M)) и перфорина (Prf) в родительские CD8 + и CD4 + Т-клетки и активированные CD38 + HLA-DR + CD8 + и CD4 + Т-клетки. Стробирование и экспериментальные подробности в расширенных данных Рис. 3.

Мы проанализировали кинетику и широту иммунных реакций, связанных с клиническим разрешением COVID-19. Поскольку ASC являются ключевыми для быстрой продукции антител после инфицирования вирусом Эбола^{1,2} и инфицирования вирусом гриппа^{2,3} и вакцинации против него, а активированные циркулирующие клетки TFH (клетки cTFH) одновременно индуцируются после вакцинации против вируса гриппа³, мы определили частоту CD3 – CD19 + CD27hiCD38hi ASC и CD4 + CXCR5 + ICOS + PDOS-1 + cTFH клеточные ответы до симптоматического выздоровления. ASC появились в крови во время вирусного клиренса (день 7; 1,48%) и достигли пика на день 8 (6,91%). Появление клеток cTFH происходило одновременно в крови на 7-й день (1,98%), увеличиваясь на 8-й день (3,25%) и на 9-й день (4,46%) (рис. 1d). Пик как ASCs, так и клеток cTFH был заметно выше у пациента с COVID-19, чем у здоровых контрольных участников (0,61% ± 0,40% и 1,83% ± 0,77% соответственно (среднее ± s.d.); n = 5). Как клетки ASCs, так и клетки cTFH заметно присутствовали во время реконвалесценции (день 20) (4,54% и 7,14% соответственно; рис. 1d). Таким образом, наше исследование предоставляет данные о рекрутировании как клеток ASC, так и клеток cTFH в кровь этой пациентки, когда она все еще была нездоровой и за 3 дня до исчезновения симптомов.

Поскольку коэкспрессия CD38 и HLA-DR является ключевым фенотипом активации CD8+ Т-клеток в ответ на вирусные инфекции, мы проанализировали коэкспрессию CD38 и HLA-DR. Согласно сообщениям о лихорадке Эбола и гриппа^{1,4}, коэкспрессия CD38 и HLA-DR на CD8+ Т-клетках (оцениваемая как частота CD38+ HLA-DR+ CD8+ Т-клеток) быстро увеличилась у этой пациентки с 7 дня (3,57%) к 8-му дню (5,32%) и 9-му дню (11,8%), затем снизились на 20-й день (7,05%) (рис.1д). Кроме того, частота CD38+ HLA-DR+ CD8+ Т-клеток была намного выше у этой пациентки, чем у здоровых людей (1,47% ± 0,50%; n = 5). CD38+ HLA-DR+ Т-клетки были также недавно зарегистрированы у пациентки с COVID-19 в один момент времени 5. Сходным образом коэкспрессия CD38 и HLA-DR на CD4+ Т-клетках (оцениваемая как частота CD38+ HLA-DR+ CD4+ Т-клеток) увеличилась между 7 (0,55%) и 9-м днем (3,33%) у этой пациентки, относительно к здоровым донорам (0,63 ± 0,28%; n = 5), хотя и на более низких уровнях, чем у CD8 + Т-клеток. CD38 + HLA-DR + Т-

клетки, особенно CD8⁺ Т-клетки, продуцировали большее количество гранзимов А и В и перфорина (на ~ 34–54% выше), чем их родительские клетки (популяции CD8⁺ или CD4⁺; рис.1e). Таким образом, появление и быстрое увеличение активированных CD38⁺ HLA-DR⁺ Т-клеток, особенно CD8⁺ Т-клеток, на 7-9 день предшествовало разрешению симптомов. Подробная информация о воспроизводимости данных содержится в отчете о биологических науках.

Анализ моноцитов CD16⁺ CD14⁺, которые связаны с иммунопатологией, показал более низкие частоты моноцитов CD16⁺ CD14⁺ в крови этой пациентки на 7, 8 и 9 дни (1,29%, 0,43% и 1,47% соответственно), чем у здоровых контрольных доноров (9,03% ± 4,39%; n = 5) (рис.1f), что может свидетельствовать об оттоке моноцитов CD16⁺ CD14⁺ из крови в место заражения. Различий в активированных клетках-киллерах HLA-DR⁺ CD3-CD56⁺ не обнаружено.

Поскольку провоспалительные цитокины и хемокины являются предикторами тяжелых клинических исходов гриппа б, мы количественно оценили 17 провоспалительных цитокинов и хемокинов в плазме. Мы обнаружили низкие уровни хемокина MCP-1 (CCL2) в плазме пациентки (расширенные данные, рис.2a), хотя это было сопоставимо с результатами, полученными для здоровых доноров (22,15 ± 13,81; n = 5), пациентов, инфицированных гриппом А вирус или грипп В, оцененный в дни 7–9 (33,85 ± 30,12; n = 5), и пациент, инфицированный коронавирусом человека HCoV-229e (40,56). Таким образом, в отличие от тяжелого птичьего гриппа H7N9, у которого были повышенные цитокины IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1β и IFN-γ6, у этой пациентки с COVID-19 были обнаружены минимальные провоспалительные цитокины и хемокины, даже когда она была симптоматична в дни 7–9.

Поскольку однонуклеотидный полиморфизм rs12252-C / C в гене IFITM3 (который кодирует интерферон-индуцированный трансмембранный белок 3) связан с тяжелым гриппом б,7, мы проанализировали IFITM3-rs12252 у пациентки с COVID-19 и обнаружили «риск» Вариант IFITM3-rs12252-C/C (расширенные данные, рис.2b). Поскольку распространенность IFITM3-rs12252-C/C среди населения Китая составляет 26,5% (проект «1000 геномов») б, дальнейшее исследование аллеля IFITM3-rs12252-C/C в более крупных группах людей с COVID-19 заслуживает внимания.

В совокупности наше исследование дает новый вклад в понимание широты и кинетики иммунных реакций во время нетяжелого случая COVID-19. Эта пациентка не испытывала осложнений дыхательной недостаточности или острого респираторного дистресс-синдрома, не нуждалась в дополнительной оксигенации и была выписана в течение недели после госпитализации в соответствии с нетяжелым, но симптоматическим заболеванием. Мы предоставили данные о наборе популяций иммунных клеток (ASC, TFH-клеток и активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток) вместе с антителами, связывающими SARS-CoV-2 IgM и IgG, в крови пациентки до разрешения симптомов. Мы предлагаем, чтобы эти иммунные параметры были охарактеризованы у более крупных групп людей с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания, чтобы определить, можно ли их использовать для прогнозирования исхода заболевания и оценки новых вмешательств, которые могут минимизировать тяжесть и/или информировать кандидатов о защитной вакцине. Кроме того, наше исследование показывает, что устойчивые многофакторные иммунные ответы могут быть вызваны недавно появившимся вирусом SARS-CoV-2, и, подобно птичьему заболеванию H7N98, ранние адаптивные иммунные ответы могут коррелировать с лучшими клиническими исходами.

Дополнительная информация о дизайне исследования доступна в отчете о научных исследованиях, связанных с этой статьей.

Доступность данных

Исходные данные, лежащие в основе рис. 1a, c – f и расширенных данных рис. 2,

представлены как исходные данные. Необработанные данные FACS приведены в рукописи. Исходные файлы FACS доступны от авторов по запросу.

Ссылки:

1. McElroy A.K. et al. Proc. Natl Acad. Sci. США 112, 4719–4724 (2015).
2. Ellebedy, A.H. et al. Туземный Immunol. 17, 1226–1234 (2016).
3. Koutsakos, M. et al. Sci. Перев. Med. 10, eaan8405 (2018).
4. Wang, Z. et al. Туземный Commun. 9, 824 (2018).
5. Xu, Z. et al. Ланцет Респир. Med. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X) (2020).
6. Wang, Z. et al. Proc. Natl Acad. Sci. США 111, 769–774 (2014).
7. Everitt A.R. et al. Nature 484, 519–523 (2012).
8. Wang, Z. et al. Туземный Commun. 6, 6833 (2015).