

Ефективність лікування пацієнтів з важкою формою COVID-19 за допомогою реконвалесцентної плазми

Kai Duan^{a,b,1}, Bende Liu^{c,1}, Cesheng Li^{d,1}, Huajun Zhang^{a,1}, Ting Yu^{f,1}, Jieming Qu^{g,h,i,1}, Min Zhou^{g,h,i,1}, Li Chen^{1,1}, Shengli Meng^b, Yong Hu^d, Cheng Peng^e, Mingchao Yuan^k, Jinyan Huang^l, Zejun Wang^b, Jianhon^g Yud, Xiaoxiao Gao^e, Dan Wang^k, Xiaoqi Yu^m, LiLi^b, Jiayou Zhang^b, Xiao Wu^d, Bei Li^e, Yanping Xu^{g,h,i}, Wei Chen^b, Yan Peng^d, Yeqin Hu^b, Lianzhen Lin^d, Xuefei Liu^{g,h,i}, Shihe Huang^b, Zhijun Zhou^d, Lianghao Zhang^b, Yue Wang^d, Zhi Zhang^b, Kun Deng^d, Zhiwu Xia^b, Qin Gong^d, Wei Zhang^d, Xiaobei Zheng^d, Ying Liu^d, Huichuan Yang^a, Dongbo Zhou^a, Ding Yu^a, Jifeng Hou^a, Zhengli Shi^e, Saijuan Chen^l, Zhu Chen^{1,2}, Xinxin Zhang^{m,2}, and Xiaoming Yang^{a,b,2}

^a China National Biotec Group Company Limited, 100029 Beijing, China; ^b National Engineering Technology Research Center for Combined Vaccines, Wuhan Institute of Biological Products Co. Ltd., 430207 Wuhan, China; ^c First People's Hospital of Jiangxia District, 430200 Wuhan, China; ^d Sinopharm Wuhan Plasma-derived Biotherapies Co., Ltd, 430207 Wuhan, China; ^e Key Laboratory of Special Pathogens, Wuhan Institute of Virology, Center for Biosafety Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, 430071 Wuhan, China; ^f Wuhan Jinyintan Hospital, 430023 Wuhan, China; ^g Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; ^h National Research Center for Translational Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; ⁱ Institute of Respiratory Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; ^j Clinical Research Center, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital North, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200018 Shanghai, China; ^k Wuhan Blood Center, 430030 Wuhan, China; ^l State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, National Research Center for Translational Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; ^m Research Laboratory of Clinical Virology, Ruijin Hospital and Ruijin Hospital North, National Research Center for Translational Medicine, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; and ⁿ National Institute for Food and Drug Control of China, 102629 Beijing, China

Статтю надав Чжу Чень, 18 березня 2020 (надіслано на рецензію 5 березня 2020; рецензенти: В. Ян Ліпкін та Фушенг Ван)

Станом на зараз немає спеціальних протівірусних агентів для лікування нового коронавірусного захворювання 2019 (COVID-19), які були би дозволені для медичного застосування. Десять пацієнтів з позитивним результатом полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі взяли участь в цьому дослідженні. Додатково до максимальної підтримуючої терапії та антивірусних агентів, цим пацієнтам було перелито одну дозу реконвалесцентної плазми (РП) об'ємом 200 мл, з титрами нейтралізуючих антитіл понад 1:640, взяту у донорів, які нещодавно одужали від цього захворювання. Перший критерій, який досліджувався, - це безпечність переливання РП. Другий критерій – це покращення клінічних симптомів та лабораторних показників протягом 3-х днів після переливання РП. Середній час від початку захворювання до переливання РП становив 16.5 днів; в п'яти клінічних випадках рівень титрів нейтралізуючих антитіл швидко зріс до 1:640, а в інших чотирьох – так і залишився на високому рівні (1:640). Клінічні симптоми значно полегшилися, а сатурація оксигемоглобіну покращилася протягом 3 днів. Серед клінічних показників, як покращилися після переливання: підвищення кількості лімфоцитів ($0.65 \times 10^9/\text{л}$ в порівнянні з $0.76 \times 10^9/\text{л}$) та зниження рівня С-реактивного білка (55.98 мг/л в порівнянні з 18.13 мг/л). Через 7 днів рентгенівські дослідження показали різний ступінь загоєння уражених ділянок легень. В семи пацієнтів, у яких раніше була вірусемія, після переливання вірусне навантаження більше не виявлялося. Жодні серйозні побічні ефекти не спостерігалися. Це дослідження показало, що пацієнти добре переносять лікування переливанням РП і воно може покращити клінічні результати лікування пацієнтів з важкою формою COVID-19 шляхом нейтралізації вірусемії. Потрібно провести подальші більш добре контрольовані дослідження оптимальної дози та часу і клінічних переваг лікування за допомогою РП.

COVID-19 | реконвалесцентна плазма | результат лікування | пілотний проект

3 грудня 2019 року, пневмонія, спричинена тяжким гострим респіраторним синдромом коронавірусу 2 (SARS-CoV-2), яку Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) назвала коронавірусне захворювання 2019 (COVID-19), з'явилася у місті Вухань в Китаї (1-3). Протягом 3 місяців епідемія швидко поширилася по всьому світі і 11 березня 2020 року ВООЗ оголосило її пандемією. Станом на

12 березня 2020, в Китаї повідомлялося про 80 980 підтверджених випадків захворювання і 3 173 смертей. В той же час, в інших 108 країнах та регіонах повідомлялося про загальну кількість підтверджених випадків в розмірі 44 377 і 1 446 смертей. Станом на зараз немає противірусних агентів для нового вірусу, які би були дозволені для медичного використання, але деякі ліки все ще випробовуються, серед них такі: редмесивір та лопінавір/ритонавір (4, 5). Хоча в Сполучених Штатах і повідомлялося про те, що редмесивір виявив можливу противірусну дію у випадку з одним пацієнтом, хворим на COVID-19, та все ще проводяться рандомізовані контрольовані дослідження цього препарату для визначення його безпечності та ефективності (6). Більше того, лікування уражень легень, спричинених COVID-19, за допомогою кортикостероїдів все ще викликає суперечки, через відтерміноване очищення крові від вірусної інфекції та ускладнення (7, 8). Зважаючи на те, що немає ні ефективних вакцин, ні спеціальних противірусних агентів, то потрібно швидко шукати альтернативні стратегії лікування COVID-19, особливо для пацієнтів з важкою формою цього захворювання.

Значення

Зараз COVID-19 – це величезна загроза глобальному здоров'ю, проте немає жодних противірусних агентів для лікування цього захворювання. В цій роботі ми досліджуємо, чи можна застосовувати переливання реконвалесцентної плазми (РП) для порятунку пацієнтів зі складними формами захворювання. Результати лікування 10 дорослих пацієнтів показали, що одна доза (200 мл) РП добре переноситься і може значно покращити рівень нейтралізуючих антитіл або підтримати їх кількість на високому рівні, і призвести до зникнення вірусемії протягом 7 днів. Крім того, клінічні симптоми та пара-клінічні критерії швидко покращилися протягом 3 днів. Через 7 днів рентгенівські дослідження показали різний ступінь загоснення уражених ділянок легень. Ці результати вказують на те, що РП може стати перспективним варіантом порятунку пацієнтів з важкими формами COVID-19, хоча ще потрібно провести рандомізоване дослідження.

Вклад авторів: Z.C., X. Zhang, and X. Yang розробили дослідження; S.M., Yong Hu, C.P., M.Y., Z.W., J.Y., X.G., D.W., L. Li, J.Z., X.W., B. Li, W.C., Y.P., Yeqin Hu, L. Lin, S.H., Z. Zhou, L.Z., Y.W., Z. Zhang, K. Deng, Z.X., Q.G., W.Z., X. Zheng, Y.L., H.Y., D.Z., D.Y., J. Hou, and Z.S. здійснили дослідження; J. Huang, X. Yu, Y.X., X.L., S.C., and Z.C. проаналізували дані; and K. Duan, B. Liu, C.L., H.Z., T.Y., J.Q., M.Z., L.C., and Z.C. написали цю роботу.

Рецензенти: W.L.L., Колумбійський університет; та F.W., 302 Пекінська лікарня.

Автори заявляють, що немає жодних конфліктів інтересів.

Ця стаття знаходиться у вільному доступі і поширюється згідно з ліцензією Creative Commons «Зазначення авторства 4.0» (CC BY).

Зберігання даних: Детальна інформація пацієнтів, що підтверджує отримані результати цього дослідження зберігаються в Open Science Framework (<https://osf.io/gahz5>).

¹K. Duan, B. Liu, C.L., H.Z., T.Y., J.Q., M.Z., and L.C. рівноцінно доклалися до цієї роботи.

²Особи, котрим можна писати. Електронна пошта: zchen@stn.sh.cn, zhangx@shsmu.edu.cn, or yangxiaoming@sinopharm.com.

Додаткові матеріали по цій статті можна знайти за посиланням: <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2004168117/-/DCSupplemental>.

Терапія реконвалесцентною плазмою (РП) – класична адаптивна імунотерапія – застосовується для профілактики і лікування багатьох інфекційних захворювань вже більше ста років. Протягом останніх двох десятиліть, РП-терапія успішно застосовувалася для лікування SARS, MERS та пандемії H1N1 у 2009 році і показала задовільну ефективність і безпечність (9-12). Метааналіз 32 досліджень коронавірусної інфекції SARS та тяжких форм грипу виявив статистично значиме зниження загального коефіцієнту смертності після РП-терапії в порівнянні з плацебо чи незастосуванням будь-яких терапій (співвідношення ризиків, 0.25; 95% довірчий інтервал, 0.14–0.45) (13). Однак, РП-терапія не призводить до значного покращення виживання у випадку вірусного захворювання Ебола, ймовірно це спричинено тим, що немає даних щодо титрів нейтралізуючих антитіл, необхідних для стратифікованого аналізу (14). Зважаючи на те, що вірологічні та клінічні характеристики SARS, Близькосхідного респіраторного синдрому (MERS) та COVID-19 – схожі, то РП-терапія може виявитися перспективним варіантом лікування COVID-19 (16). Пацієнти, що одужали від COVID-19 і мають високі титри нейтралізуючих антитіл, можуть стати важливим джерелом донорської РП. Та

тим не менше, можливі клінічні переваги та ризик використання реконвалесцентних продуктів крові для лікування COVID-19 залишається нез'ясованим. Саме тому, для того, щоб встановити доцільність застосування лікування за допомогою РП, ми провели це пілотне дослідження на прикладі 10 пацієнтів з важкою формою COVID-19 в трьох лікарнях-учасниках.

Результати

Нейтралізуюча активність РП для SARS-CoV-2. Нейтралізуюча активність РП для SARS-CoV-2 визначалася за допомогою класичної реакції нейтралізації вірусних бляшок з використанням попередньо виділених штамів вірусу (1). В першій партії зразків РП від 40 пацієнтів, які одужали від COVID-19, у 39 було виявлено високі титри антитіл в розмірі щонайменше 1:160 і тільки в одного з них титр був 1:32. Саме ці результати стали основою для нашого пілотного клінічного дослідження використання РП для пацієнтів із важкою формою захворювання.

Загальна характеристика пацієнтів, що брали участь в дослідженні. З 23 січня 2020 по 19 лютого 2020, 10 пацієнтів з важкою формою COVID-19 (шість чоловіків та чотири жінки) розпочали участь в дослідженні і їм було перелито РП. Їх середній вік становив 52.5 років (інтерквартильний розмах (IQR) – 45.0 років до 59.5 років) (Таблиця 1). Жоден з пацієнтів не заразився безпосередньо на Вуханському гуртовому ринку морепродуктів. Середній час від початку прояву симптомів до госпіталізації становив 6 днів (IQR – 2.5 дні до 8.5 днів), а від першого прояву симптомів до переливання РП – 16.5 днів (IQR – 11.0 днів до 19.3 днів). Три пацієнти захворіли в кластері інфекції. Серед найбільш поширених симптомів на початку хвороби – висока температура (7 з 10 пацієнтів), кашель (вісім клінічних випадків) та утруднене дихання (вісім клінічних випадків); до менш поширених симптомів належать: виділення мокротиння (п'ять клінічних випадків), біль в грудях (два клінічні випадки), діарея (два клінічні випадки), нудота та блювання (два клінічні випадки), головний біль (один клінічний випадок) та біль в горлі (один клінічний випадок). В чотирьох пацієнтів були такі попередні хронічні захворювання: серцево-судинні захворювання та/чи цереброваскулярні захворювання та есенціальна артеріальна гіпертензія. П'ять пацієнтів отримали монотерапію арбідолом або комбіновану терапію з ремдесивір (один випадок не включено в клінічне дослідження), чи рибавірином, чи перамівіром, а один пацієнт отримував монотерапію рибавірином (Таблиця 2). Для лікування пацієнтів з ко-інфікуванням використовувалися антибактеріальні та протигрибкові препарати. Шість пацієнтів отримали метилпреднізолон (20 мг раз на 24 год.) внутрішньовенно (в/в)

На комп'ютерній томографії (КТ) у всіх пацієнтів були двосторонні субплевральні фокуси, ущільнення за типом «матового скла» та/чи легеневі паренхіматозні ущільнення, які здебільшого знаходилися у субплевральному відділі та бронхосудинних пучках в легенях. У семи пацієнтів було ураження численних доль легень, а в чотирьох - ущільнення перегородок доль легень.

Ефект від переливання РП.

Полегшення клінічних симптомів. Всі симптоми, особливо висока температура, кашель, утруднене дихання та біль в грудях, зникли або значно полегшилися протягом 1 – 3 днів після переливання РП. До лікування за допомогою РП три пацієнти були на штучній вентиляції легень, а двоє – на звичайній низько поточній назальній оксигенації. Після лікування за допомогою РП двох пацієнтів було переведено зі штучної вентиляції легень на високопоточну наляльну оксигенацію, а одного пацієнта було знято з високопоточної наляльної оксигенації. Крім того, одного пацієнта, який перебував на звичайній низькопоточній назальній оксигенації, було переведено з постійної оксигенації на періодичну оксигенацію (Таблиця 2). На КТ грудної клітки було помічено зменшення легневих уражень. Згідно з КТ грудної, після переливання РП у всіх пацієнтів спостерігалось зменшення уражень легень різного ступеню.

Таблиця 1. Клінічна характеристика пацієнтів, яким перелили РП.

Пацієнт №	Стать	Вік, р	Клінічна класифікація	К-ть днів від початку симптомів до госпіталізації	К-ть днів від початку симптомів до переливання РП	Кластер інфекцій	Основні симптоми	Супутні захворювання
1	Ч	46	Важкий	8	11	Ні	Висока температура, кашель, виділення мокротиння, утруднене дихання, біль в грудях	Гіпертензія
2	Ж	34	Важкий	0	11	Так	Кашель, утруднене дихання, біль в грудях, нудота та блювання	Немає
3	Ч	42	Важкий	8	19	Так	Висока температура, кашель, виділення мокротиння, утруднене дихання, біль в горлі, діарея	Гіпертензія
4	Ж	55	Важкий	10	19	Ні	Висока температура, кашель, виділення мокротиння, утруднене дихання	Немає
5	Ч	57	Важкий	4	14	Ні	Висока температура, утруднене дихання	Немає
6	Ж	78	Важкий	8	17	Так	Висока температура, кашель, виділення мокротиння, утруднене дихання, біль в м'язах	Немає
7	Ч	56	Важкий	4	16	Ні	Висока температура, кашель, виділення мокротиння, артралгія	Немає
8	Ч	67	Важкий	10	20	Ні	Висока температура, кашель, головний біль, діарея, блювання	Серцево-судинні та цереброваскулярні захворювання
9	Ж	49	Важкий	1	10	Ні	Кашель, утруднене дихання	Немає
10	Ч	50	Важкий	3	20	Ні	Утруднене дихання	Гіпертензія

Ж – жінка; Ч – чоловік.

Таблиця 2. Інші види лікування, яке отримували пацієнти, котрим перелили РП

Пацієнт №	Препарати			Киснева підтримка	
	Антивірусне лікування	Антибіотики чи протигрибкові препарати	Кортикостероїди	Перед РП-терапією	Після РП терапії
1	Арбідол 0.2 г 1р./8 год, о. Рибірівірин 0.5 г 1р/день, в/в	Цефоперазон натрію в/в	Немає	Високопоточна назальна оксигенація, Штучна вентиляція	Штучна вентиляція
2	Арбідол 0.2 г 1р./8 год, о.	Цефоперазон натрію в/в	Немає	Немає	Немає
3	Арбідол 0.2 г 1р./8 год, о.	Моксифлоксацин в/в	Метилпреднізалон в/в	Високопоточна назальна оксигенація, Штучна вентиляція	Високопоточна назальна оксигенація
4	Рибірівірин 0.5 г 1р/день, в/в	Лінезолідин в/в Імпенем/Циластатин в/в	Метилпреднізалон в/в	Штучна вентиляція	Високопоточна назальна оксигенація
5	Арбідол 0.2 г 1р./8 год, о. Ремдесивір 0.2 г 1р/день, в/в ІФН-α 500 ММО, інг	Моксифлоксацин в/в Цефоперазон натрію в/в Тазобактам в/в	Метилпреднізалон в/в	Низькопоточна назальна оксигенація	Низькопоточна назальна оксигенація
6	Арбідол 0.2 г 1р./8 год, о.	Цефоперазон натрію в/в Левофлоксацин в/в	Метилпреднізалон в/в	Високопоточна назальна оксигенація	Високопоточна назальна оксигенація
7	Арбідол 0.2 г 1р./	Цефоперазон натрію	Метилпреднізалон	Високопоточна назальна	Немає

	8 год, о.	в/в Тазобактам в/в Флуконазол в/в	в/в	оксигенація	
8	Арбідол 0.2 г 1р./ 8 год, о. Рибірівірин 0.5 г 1р/день, в.в. Арбідол 0.2 г 1р./ 8 год, о.	Немає	Немає	Немає	Немає
9	Осельтамавір 75 мг 1р/12 год., о.	Немає	Немає	Низькопоточна назальна оксигенація	Низькопоточна назальна оксигенація (за потреби)
10	Арбідол 0.2 г 1р./ 8 год, орально ІФН-α 500 ММО, інг	Цефоперазон натрію в/в Каспифунгін в/в	Метилпреднізолон в/в	Високопоточна назальна оксигенація	Високопоточна назальна оксигенація

о. – орально; в/в – внутрішньовенна ін'єкція; інг – інгаляція, ММО – мільйони міжнародних одиниць.

Репрезентативні КТ знімки пацієнтів 9 та 10 подано на Рис.1. На знімках легень пацієнта 9 – 49-річна жінка, госпіталізована на 1-й день після появи перших ознак хвороби (пппох) – спостерігалось найзначніше покращення. На 10-й день пппох, пацієнту було перелито одну дозу РП, об'ємом 200 мл. Аналіз на РНК SARS-CoV-2 став негативним на 12 день пппох. Масивна інфільтрація та субплевральні фокуси, ущільнення за типом «матового скла», виявлені на 7-1 день пппох, зникли на КТ-знімках, зроблених на 13-й день пппох, і разом з цим покращилося функція зовнішнього дихання. Пацієнту 10 – 50-річний чоловік, госпіталізований на 3-й день пппох – було перелито 200 мл РП на 20-й день пппох. На КТ його грудної клітки, зробленому під час госпіталізації, видно масивну інфільтрацію та багато субплевральних фокусів, ущільнень за типом «матового скла». В нього спостерігалось поступове зникнення уражень легень вже з 5-го дня після переливання РП. Аналіз на РНК SARS-CoV-2 став негативним на 25 день пппох.

Покращення періодичних лабораторних показників та функції зовнішнього дихання.

Лімфоцитопенія – важливий показник для прогнозування результатів для пацієнтів з COVID-19 (2) – покращувалася після переливання РП (середнє значення: 0.65×10^9 на л в порівнянні з 0.76×10^9 на л), в 7 з 10 пацієнтів спостерігалось збільшення кількості лімфоцитів (Рис.2). Що стосується інших лабораторних аналізів, то ми спостерігали тенденцію до зменшення показників запалення та/чи порушень роботи печінки в порівнянні зі станом пацієнта перед переливанням РП. До цих показників належать: С-реактивний білок (СРБ) (середнє значення: 55.98 мг/л в порівнянні з 18.13 мг/л), аланін амінотрансфераза (середнє значення: 42.00 МО/л в порівнянні з 34.30 МО/л) та аспартатамінотрансфераза (середнє значення: 38.10 МО/л в порівнянні з 30.30 МО/л) (Таблиця 3). Загальний білірубін (середнє значення: 12.40 мкмоль /л в порівнянні з 13.98 мкмоль /л) залишився незмінним, за винятком випадку очевидного зростання в пацієнта 1 (Рис. 2). В більшості пацієнтів в нашому дослідженні постійно спостерігалось збільшення показників SaO_2 (середнє значення: 93.00% в порівнянні з 96.00%), котре, як було з'ясовано, може свідчити про відновлення функції легень. Ці швидкі зміни були помітними, навіть попри те, що пацієнти отримували максимальне підтримуюче лікування та антивірусні препарати.

Слід відзначити, що пацієнт 1 – 46-річний чоловік, якого госпіталізували на 8-й день пппох – дуже швидко одужав, що значно покращило результати лабораторних аналізів. При госпіталізації він отримував лікування антивірусними препаратами (арбідол і рибавірин) та високопоточною налаальною оксигенацією. На 10-й день пппох його було переведено на штучну вентиляцію в рамках інтенсивної терапії. Переливання РП було проведено на 11-й день пппох. На 12-й день пппох, аналіз на SARS-CoV-2 став негативним, і водночас відбулося різке зниження СРБ з 65.04 мг/л до 23.57 мг/л та збільшення SaO_2 з 86% до 90% (Рис.3). Його успішно зняли зі штучної вентиляції на 2 день після переливання. На 15-й день пппох спостерігалось постійне збільшення кількості лімфоцитів та зменшення рівня амінофери – це вказувало на покращення імунної та печінкової функції.

Підвищення титрів нейтралізуючих антитіл та зникнення РНК SARS-CoV-2 RNA. Ми провели визначення титрів нейтралізуючих антитіл до та після переливання РП в усіх пацієнтів, крім одного (пацієнт 2) (Таблиця 4). Титри нейтралізуючих антитіл п'яти пацієнтів збільшилися, а в чотирьох пацієнтів залишилися на тому ж рівні, що й після переливання. Аналіз на РНК SARS-CoV-2, зроблений перед переливанням РП за допомогою полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі, дав позитивний результат в семи пацієнтів та негативний – в трьох. Варто зазначити, що у трьох пацієнтів РНК SARS-CoV-2 зменшилася до рівня, коли її неможливо виявити, на 2-й день, ще у трьох – на 3-й день, і в одного пацієнта – на 6-й день після лікування РП. Ці результати свідчать про нейтралізуючий ефект РП на сироватку SARS-CoV-2.

Результати пацієнтів, яких лікували за допомогою РП, в порівнянні з ретроспективною контрольною групою. Ретроспективну контрольну групу було сформовано шляхом випадкового вибору 10 пацієнтів з тих, які проходили лікування в тих самих лікарнях і які були схожими на 10 осіб, що брали участь в нашому дослідженні, по віку, статі та важкості форми. Основні показники пацієнтів з групи, яка отримувала лікування РП, та контрольною групою не показали значних відмінностей, але клінічні результати лікування цих двох груп були різними: трьох пацієнтів з групи РП виписали, у семи значно покращився статус і їх можна було виписувати, а в контрольній групі – три смерті, шість пацієнтів – у стабільному стані, і в одному випадку стан пацієнта покращився. ($P < 0.001$; Дод. Матеріали Додаток, Таблиця S1).

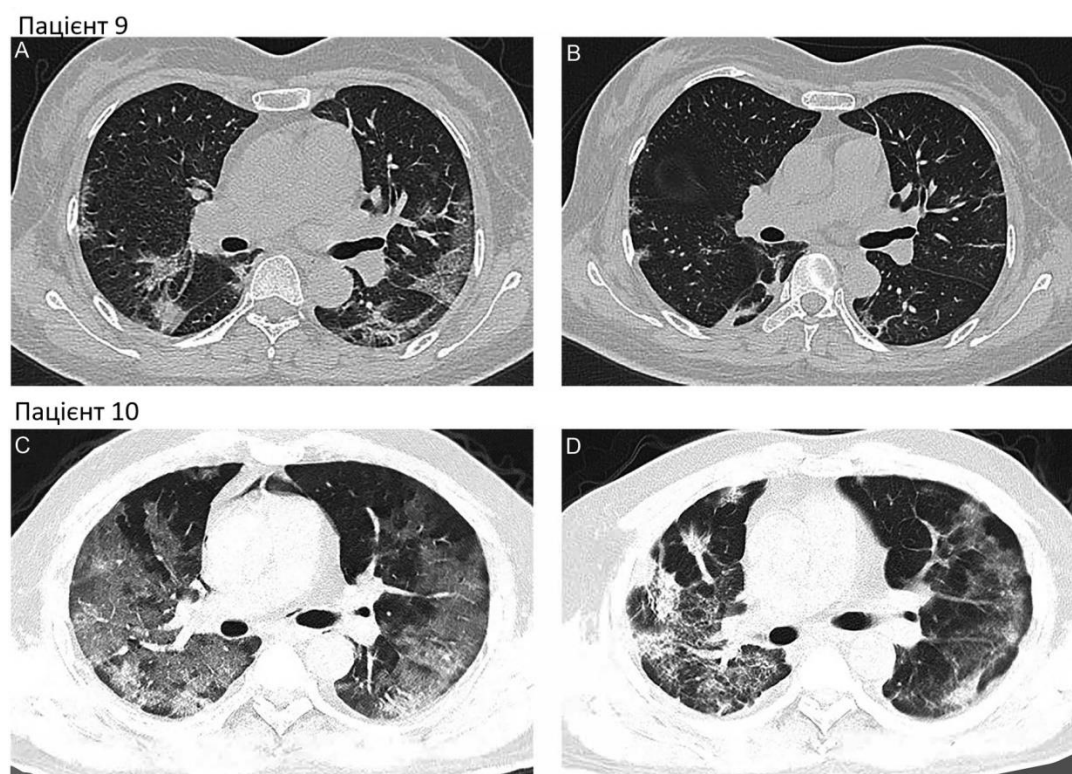


Рис. 1. КТ грудних кліток двох пацієнтів. (А) На КТ грудної клітки пацієнта 9, зроблене 9 лютого (7-й день пппох) перед переливанням РП (10-й день пппох), видно субплевральні фокуси, ущільнення за типом «матового скла» в численних долях сегментів обох легень. Тіні контуру серця – не чіткі. Ураження близько до плеви. (В) На КТ грудної клітки пацієнта 9, зроблене 15 лютого (13-й день пппох) після переливання РП видно зменшення білатеральних субплевральних фокусів, ущільнень за типом «матового скла». (С) КТ грудної клітки пацієнта 10, зроблене 8 лютого (19-й день пппох) перед переливанням РП (20-й день пппох). Яскравість обох легень була зменшеною, і видно численні тіні високої щільності в обох легенях. (D) На КТ грудної клітки пацієнта 10, зроблене 18 лютого (29-й день пппох) після переливання РП видно зменшення уражень.

Побічні ефекти переливання РП. В пацієнта 2 з'явилися червоні точки на обличчі, які швидко зникли. Не помічено жодних серйозних побічних небезпечних реакцій після переливання РП.

Дискусія

В нашому дослідженні розглядається РП-терапія для лікування COVID-19. Всі пацієнти з важкою формою COVID-19, які брали участь в дослідженні, показали первинні та вторинні критерії ефективності. Пацієнти добре перенесли вливання однієї дози РП, об'ємом 200 мл, протягом 3-х днів клінічні симптоми значно полегшилися і сатурація оксигемоглобіну підвищилася, вірусемія – швидко нейтралізувалася.

Тяжка пневмонія, викликана коронавірусом людини, характеризується швидкою реплікацією вірусу, масивною запальною інфільтрацією клітин та підвищеним рівнем постзапальних цитокінів чи навіть цитокінової бурі в альвеолах в легенях – все це призводить до гострого пошкодження легень та гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) (17). Останні дослідження COVID-19 показали, що кількість лімфоцитів в периферійній крові були значно зниженими, а рівень цитокінів в плізмі пацієнтів, що потребували лікування в інтенсивній терапії (ІТ), включно з IL-6, IL-10¹, ФНП-α² та гранулоцито-макрофагальним колонієстимулюючим фактором,

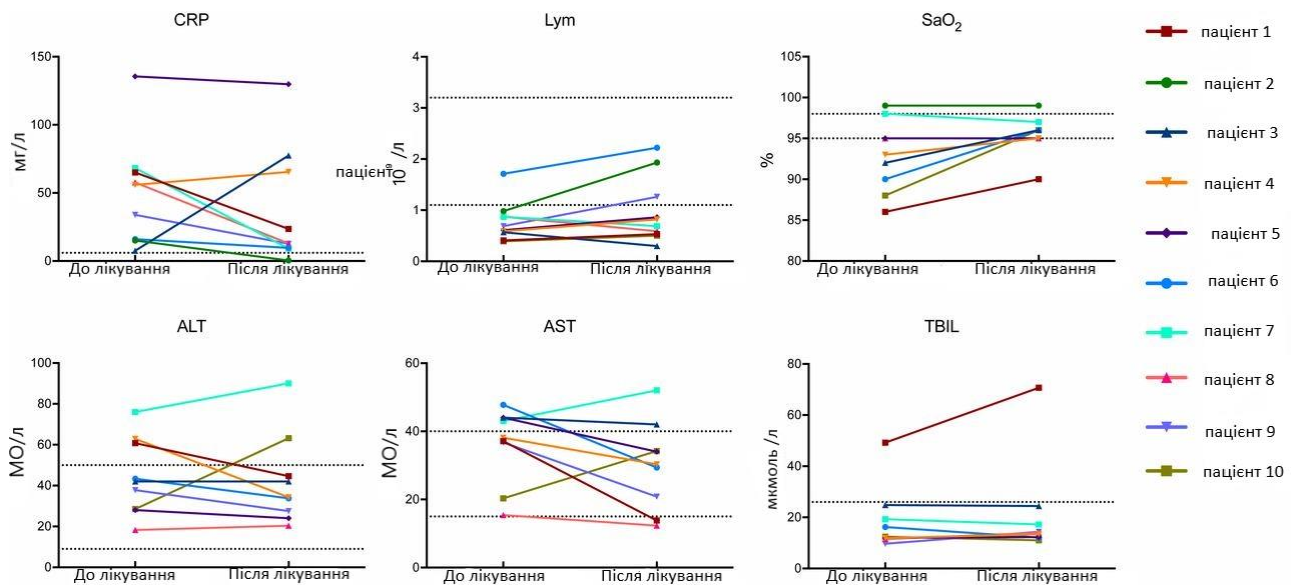


Рис. 2. Динаміка змін лабораторних показників усіх пацієнтів. Нижня пунктирна лінія – це діапазон референтних значень. SaO₂ – сатурація оксигемоглобіну; TBIL – загальний білірубін; ALT – аланін амінотрансфераза; AST – аспартатамінотрансфераза; Lym – лімфоцити; CRP – С-реактивний білок.

¹ IL-6 – Інтерлейкін-6; IL-10 – Інтерлейкін-10 (прим. пер.)

² Фактор некрозу пухлини-альфа (прим. пер.)

Таблиця 3. Порівняння лабораторних показників пацієнтів до та після переливання

Клінічний показник	До переливання РП	Після переливання РП
СПБ (мг/л, нормальний діапазон – від 0 до 6)	55.98 (15.57 до 66.67)	18.13 (10.92 до 71.44)
Лімфоцити (10^9 на л, нормальний діапазон – від 1.1 до 3.2)	0.65 (0.53 до 0.90)	0.76 (0.52 до 1.43)
Аланін амінотрансфераза (ІО/л, нормальний діапазон – від 9 до 50)	42.00 (28.25 до 61.85)	34.30 (25.75 до 53.90)
Аспартатамінотрансфераза (ІО/л, нормальний діапазон – від 15 до 40)	38.10 (28.50 до 44.00)	30.30 (17.30 до 38.10)
Загальний білірубін (мкмоль /л, нормальний діапазон – від 0 до 26)	12.40 (11.71 до 22.05)	13.98 (12.20 до 20.80)
SaO ₂ (% ,нормальне значення $\geq$ 95)	93.00 (89.00 до 96.50)	96.00 (95.00 до 96.50)
SaO ₂ – сатурація оксигемоглобіну		

були значно вищими, ніж в тих, хто не потребував лікування в умовах ІТ (2, 18). Реконвалесцентна плазма, отримана від пацієнтів, що одужали від COVID-19 і розвинули гуморальний імунітет проти вірусу, містила велику кількість нейтралізуючих антитіл здатних нейтралізувати SARS-CoV-2 та знищувати патогени в кровотоці та тканинах легень (19). В цьому дослідженні, після переливання РП у всіх пацієнтів аналіз сироватки на РНК SARS-CoV-2 був негативним, крім того в них підвищилася сатурація кисню та збільшилося число лімфоцитів, а також покращилася функція печінки та СРБ. Результати свідчать, що запалення та надмірна реакція імунної системи полегшилися завдяки антитілам, що містилися в РП. Відсоток смертності (BC) в цьому дослідженні складає 0% (0/10), що можна порівняти з BC від SARS, який варіюється від 0% (0/10) до 12.5% (10/80) в чотирьох непорівнюваних дослідженнях лікування за допомогою РП (9, 20–22). Ґрунтуючись на наших попередніх результатах, можна сказати, що РП-терапія може бути легкодоступним, перспективним та безпечним варіантом порятунку пацієнтів з важкою формою COVID-19. Тим не менше, потрібно зазначити, що загоснення ушкоджень легень часто відбувалося повільніше, ніж полегшення клінічних симптомів, як видно на прикладі пацієнтів 9 і 10 в цьому дослідженні.

Перший ключовий фактор в РП-терапії, – це титр нейтралізуючих антитіл. Невелике пробне дослідження інфекції MERS-CoV показало, що РП-терапія буде ефективною, якщо титр нейтралізуючих антитіл перевищує 1:80 (12). Необхідна умова успіху – знайти придатних донорів, в яких може бути високий рівень нейтралізуючих антитіл. В роботі Цао та ін. (23) вказано, що рівень специфічних нейтралізуючих антитіл до SARS-CoV поступово зменшувався протягом 4-х місяців після хвороби і у 25.6% (імуноглобулін) та 16.1% (нейтралізуючі антитіла) пацієнтів досягав рівнів, які не можна визначити, вже через 36 місяців після перенесення захворювання. Дослідження пацієнтів, інфікованих MERS-CoV, та медичного персоналу, який наражався на ризик, показало, що кількість випадків зі серореактивним імуноглобуліном до MERS-CoV була дуже низькою (2.7%), а титр антитіл швидко знижувався протягом 3 місяців (24). В цих дослідженнях висловлено припущення, що нейтралізуючі антитіла – це короткотермінова реакція гуморального імунітету, і плазма від донорів, які тільки недавно одужали, мала би бути ефективнішою. Донорами в цьому дослідженні були пацієнти з місцевих лікарень, які нещодавно одужали від COVID-19 і в яких титр нейтралізуючих антитіл до SARS-CoV-2 був вищим, ніж 1:640. Середній вік донорів був меншим, ніж пацієнтів (42 роки в порівнянні з 52.5 роками). В п'яти пацієнтів з дев'яти клінічних випадків у цьому дослідженні титри нейтралізуючих антитіл зросли до 1:640 протягом 2 днів, а в інших пацієнтів

залишилися на тому самому рівні. Таким чином титри антитіл в РП, яка використовувалася для лікування COVID-19, були вищими, ніж в тій, якою лікували пацієнтів з MERS (1:80) (12).

Другий ключовий фактор, пов'язаний з ефективністю, - це час лікування. Кращі результати лікування спостерігалися в ти пацієнтів зі SARS, яким ввели РП до 14-го дня пппох (58.3% в порівнянні з 15.6%; $P < 0.01$) – це вказує на те, що важливо вчасно забезпечити лікування (9). Середній час, який пройшов від початку захворювання до переливання РП, становив 16.5 днів. Як і в попередньому дослідженні, всім трьом пацієнтам було перелито плазму до 14-го дня пппох (пацієнти 1, 2 і 9)

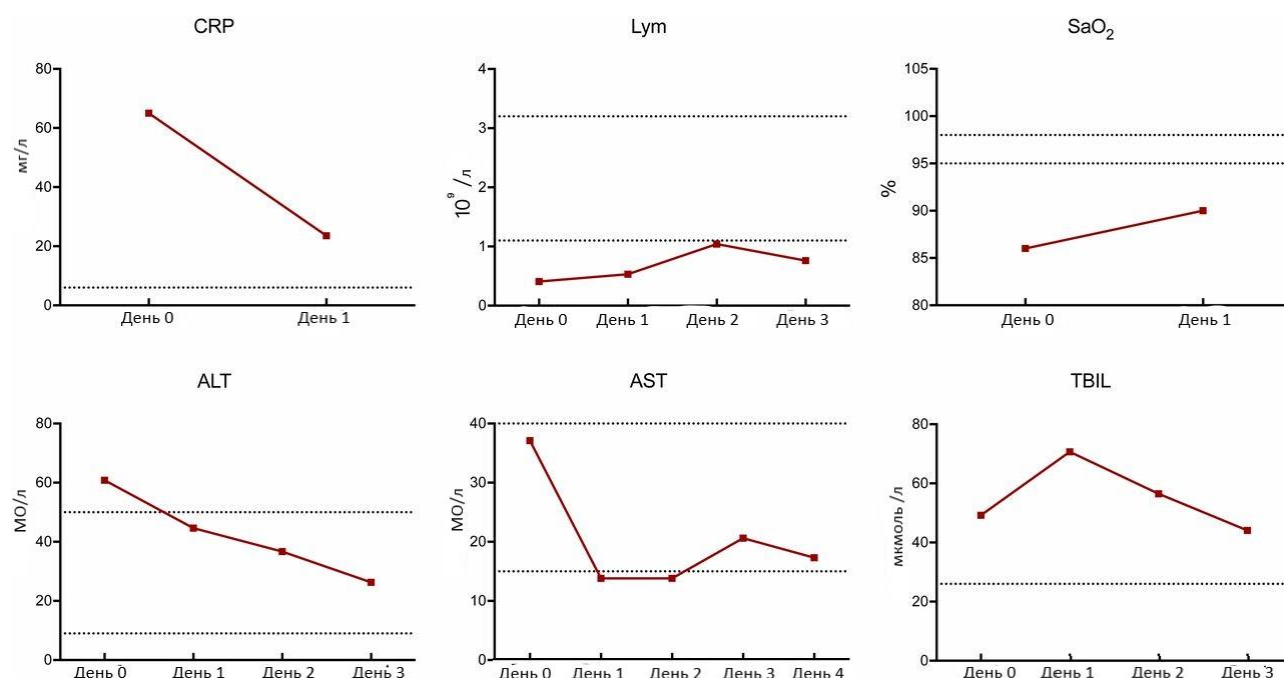


Рис.3. Динаміка лабораторних показників пацієнта 1. Вісь x – це день після переливання РП. Пунктирна горизонтальна лінія – це діапазон референтних значень.

Таблиця 4. Порівняння титрів нейтралізуючих антитіл в сироватці і вірусне навантаження РНК SARS-CoV-2 до та після РП-терапії

Пацієнт №	Дата переливання РП	Дата	Титри нейтралізуючих антитіл сироватки	Вірусне навантаження сироватки РНК SARS-CoV-2 (показник Ct)	Після переливання РП		
					Дата	Титри нейтралізуючих антитіл сироватки	Вірусне навантаження сироватки РНК SARS-CoV-2 (показник Ct)
1	9 лютого	8 лют.	1:160	37.25	10 лютого	1:640	Відсутнє
2	9 лютого	8 лют.	Інформація недоступна	35.08	11 лютого	Інформація недоступна	Відсутнє
3	13 лютого	12 лют.	1:320	38.07	14 лютого	1:640	Відсутнє
4	13 лютого	12 лют.	1:160	37.68	14 лютого	1:640	Відсутнє
5	12 лютого	11 лют.	1:640	Відсутнє	14 лютого	1:640	Відсутнє
6	12 лютого	11 лют.	1:640	Відсутнє	14 лютого	1:640	Відсутнє
7	12 лютого	11 лют.	1:320	34.64	14 лютого	1:640	Відсутнє
8	12 лютого	11 лют.	1:640	35.45	14 лютого	1:640	Відсутнє
9	12 лютого	11 лют.	1:160	Відсутнє	14 лютого	1:640	Відсутнє
10	9 лютого	8 лют.	1:640	38.19	14 лютого	1:640	Відсутнє

В нашому дослідженні спостерігалось стрімке збільшення числа лімфоцитів і зменшення СРБ, а також помітне загоєння уражень легень на КТ. Важливо зазначити, що в пацієнтів, яким перелили РП після 14-го дня, як наприклад, пацієнт 10, спостерігалось менш помітне покращення. Проте динаміка вірусемії SARS-CoV-2 – не зрозуміла, тож оптимальний час для переливання ще потрібно визначити в майбутньому.

В цьому дослідженні не було спостерігалось жодних тяжких побічних ефектів. Один з ризиків переливання плазми – потенційна передача патогенна. Для інактивації потенційних залишків вірусу та збереження максимальної активності нейтралізуючих антитіл в цьому дослідженні застосовувався фотохімічна реакція з використанням метиленового синього, адже цей метод вважається кращим, ніж використання ультрафіолетових (УФ)-С променів (25). Перед переливанням вірусу не було виявлено. Повідомлялося про гостре ураження легень спричинене переливанням серед тих жінок з хворих на вірус Еболи, котрих лікували за допомогою переливання РП (26). Хоча таке явище й не поширене в загального населення, якому проводять переливання крові, та про цю конкретну побічну реакцію не потрібно забувати, особливо при роботі зі критично хворими пацієнтами зі значними ураженнями легень (27). Потрібно згадати про ще один рідкісний ризик під час РП-терапії, а саме – антитілозалежне посилення інфекції, яке трапляється під час переливання напівнейтралізуючих концентрацій плазми, яка може пригнітити природні противірусні системи і таким чином уможливити логарифмічне внутрішньоклітинне розмноження вірусу (28). Специфічне посилення інфекції можна також спостерігати при внутрішньоутробному інфікуванні SARS-CoV (29). В наших пацієнтів не зафіксовано таких уражень легень чи посилення інфекції, найімовірніше через високий рівень нейтралізуючих антитіл в РП, вчасне переливання та правильний об'єм плазми.

В цьому дослідженні були і свої обмеження. По-перше, окрім переливання РП, пацієнти отримували і стандартне лікування. Всім пацієнтам проводилася антивірусна терапія, хоча й ефективність препаратів, що застосовувалися, – не з'ясована. Саме тому не можна заявляти про те, що ці антивірусні препарати могли посприяти одужанню цих пацієнтів чи, що вони підсилили терапевтичний ефект РП. Крім того, деякі пацієнти отримали лікування глюкокортикоїдами, котрі могли перешкодити імунній реакції та відтермінувати знищення вірусу. По-друге, середній час від початку симптомів до переливання РП становив 16.5 днів (IQR – від 11.0 днів до 19.3 днів). Попри те, що кінетика вірусемії під час природнього перебігу захворювання залишається нез'ясованою, то взаємозв'язок між зниженням РНК SARS-CoV-2 та РП-терапією, як і оптимальна концентрація нейтралізуючих антитіл та графік лікування, потрібно встановлювати в подальших дослідженнях. По-третє, динаміка зміни цитокінів під час лікування не досліджувалася. Та не зважаючи на все це, попередні результати цього дослідження виглядають багатообіцяючими, і обґрунтовують доцільність проведення рандомізованого клінічного дослідження за участі більшої кількості пацієнтів.

І на завершення потрібно зазначити, що це дослідження РП-терапії свідчить про потенційний терапевтичний ефект та низький рівень ризику під час лікування пацієнтів з важкою формою COVID-19. Одна доза РП з високою концентрацією нейтралізуючих антитіл може швидко зменшити вірусне навантаження та посприяти покращенню результатів лікування. В майбутньому потрібно провести подальші рандомізовані клінічні дослідження для того, аби визначити оптимальне дозування, час лікування і конкретні клінічні переваги застосування РП-терапії.

Матеріали та методи

Пацієнти. З 23 січня 2020 року по 19 лютого 2020 року в це пілотне дослідження було взято 10 пацієнтів з трьох лікарень-учасниць (лікарня Цзін'їнтана у Вухані, Цзянсіська районна лікарня інтегрованої традиційної китайської та західної медицини у Вухані, Перша народна лікарня провінції Цзянсі у Вухані). У всіх пацієнтів було діагностовано важку форму COVID-19 згідно з Тимчасовим керівництвом ВООЗ та Протоколом по діагностуванню та лікуванню COVID-19 Національної комісії по охороні здоров'я Китаю (версія 5.0) (31), а підтвердження здійснювалося за допомогою

полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі. Критерії для прийняття в дослідження: одна з умов 2 – 4 плюс 1-а умова: 1) вік ≥ 18 років; 2) респіраторний дистрес, ЧД $\geq$ вд/хв.; 3) сатурація кисню в стані спокою менша, ніж 93%; а також 4) парціальний тиск оксигену (PaO_2)/ концентрація кисню (FiO_2) ≤ 300 мм рт.ст. (1 мм рт.ст. = 0.133 кПа). Критерії відсіювання були такими: 1) попередня історія алергій на плазму чи компоненти (цитрат натрію); 2) особи з такими серйозними загальними захворюваннями, як функціональна недостатність органів, які не придатні для переливання РП. Згідно з Хельсінкською декларацією пацієнти чи їх офіційні працівники підписали поінформовану згоду. Етичний комітет компанії China National Biotec Group Co., Ltd. дозволив проведення цього дослідження (Дозвіл № 2020-0001). Реєстраційний № цього дослідження - ChiCTR2000030046.

Донори реконвалесцентної плазми для переливання. В трьох лікарнях-учасниках було залучено десять донорів-пацієнтів, які одужали від COVID-19. Застосовувалися такі критерії одужання: 1) нормальна температура тіла трималася довше, ніж 3 дні; 2) відсутність будь-яких симптомів з боку органів дихання; а також 3) два негативні аналізи мокротиння на SARS-CoV-2 за допомогою полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі, здійснені один за одним (інтервал забору зразків – 1 день). Забір донорської крові здійснювався по 3-х тижнях після початку захворювання та по 4-х днях з моменту виписки. Кожен пацієнт підписав поінформовану згоду.

Процедура підготовки плазми та контролю якості. Аферез здійснювався за допомогою сепаратора клітин крові Baxter CS 300 (Baxter). Реконвалесцентну плазму для лікування було взято у 40 донорів. Їх середній вік становив 42.0 роки (IQR – від 32.5 років до 49 років). Залежно від віку та маси тіла, в кожного донора було взято від 200 до 400 мл резус-фактор сумісних порцій, залежно від віку та маси тіла, кожен порцію було поділили на аліквоти об'ємом 200 мл і зберігали при температурі 4 °C без будь-яких детергентів чи термічної обробки. Після було здійснено 30-хвилинну обробку РП за допомогою метиленового синього та дії світла в медичному кабінеті для інактивації вірусів в плазмі (Shandong Zhongbaokang Medical Appliance Co., Ltd).

Серологічний аналіз та полімеризаційна ланцюгова реакція на SARS-CoV-2 та інші патогени в реальному часі. Нейтралізуючу дію плазми було визначено за допомогою класичної реакції нейтралізації вірусних бляшок з використанням попередньо виділених штамів вірусу SARS-CoV-2 в лабораторії з високим рівнем біозахисту (4-й рівень біозахисту) у Вуханському інституті вірусології Китайської академії наук. Нейтралізуючим титром вважалася найрозчинніша сироватка з 50% зменшенням числа бляшок, і вона порівнювалася із пустою пробою – числом бляшок в лунках, коли немає антитіл до нового антивірусу. Нейтралізуюча дія рецепторно-зв'язуючих доменів антитіл в РП визначалася за допомогою імуноферментного аналізу зі сендвічною технікою (ELISA). Імуноглобуліни до SARS-CoV-2 перевірялися за допомогою ELISA. PHK SARS-CoV-2 виявлялися за допомогою полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі, в результаті якої було визначено значення порогового циклу(Ct) (Shanghai BioGerm Medical Biotechnology Co., Ltd). Залишки метиленового синього виявлялися перевіреним УФ методом. Серологічний скринінг на гепатити В та С, ВІЛ та сифіліс дав негативний результат. Протоколи для перевірки нейтралізації, серологічного тестування, полімеризаційної ланцюгової реакції в реальному часі на виявлення PHK SARS-CoV можна знайти в Додатку в Додаткових матеріалах.

Лікування. Всіх пацієнтів було госпіталізовано в ІТ, де вони отримували антивірусне лікування та іншу підтримуючу терапію, але водночас деякі пацієнти також за необхідності отримували антибіотики, протигрибкові препарати, глюкокортикоїди та кисневу підтримку. Згідно з протоколом ВООЗ по переливанню крові, протягом 4 годин пацієнтам було перелито одну дозу інактивованої РП з нейтралізуючою дією $>1:640$, об'ємом 200 мл.

Збір даних. Клінічну інформацію про всіх пацієнтів, що брали участь в дослідженні, включно з демографічними даними, тривалістю захворювання, наявними симптомами, різними типами

обстежень та методами лікування, було взято з електронної лікарняної системи. Перевірка на бактеріальне коінфікування здійснювалася шляхом аналізу культур з дихальних шляхів, сечі та крові протягом 48 годин після госпіталізації. Дані про такі ускладнення, як гостра ниркова недостатність, гострий коронарний синдром, міокардит, ГРДС та інфекції носоглотки, записувалися. Дані про використання допоміжної штучної вентиляції, інтраназального введення оксигену та режим прийому препаратів записувалися. Протягом усього лікування здійснювався моніторинг РНК SARS-CoV-2 зі зразка сироватки.

Вимірювання результатів та визначення. Лікарі щодня записувати дані про клінічні симптоми. Аналізи крові та біохімічні аналізи здійснювалися кожних 1-2 дні. Аналіз на виявлення РНК SARS-CoV-2 проводився кожна 2-3 дні. КТ повторювали кожних 3-5 днів. Першим критерієм цього дослідження є безпечність переливання РП. Другий критерій - це полегшення симптомів та лабораторних та радіологічних показників протягом 3-х днів після переливання. Полегшенням клінічних симптомів вважається нормалізація температури тіла, полегшення утрудненого дихання, а нормалізація сатурації кисню та покращення рентгенівських знімків вважалися ознаками загоєння уражень легень різного ступеня.

Статистичний аналіз. Безперервну змінну представлено у вигляді середніх значень та IQR. Графіки склалися за допомогою GraphPad Prism 7.0. Серед іншого статистичного програмного забезпечення використовувалось також SPSS 24.0.

Заява щодо доступності даних. Всі дані, що стосуються цієї роботи, і до яких автори на момент публікації мали доступ можна знайти в основному тексті або в Додатку в Додаткових матеріалах. Детальнішу інформацію про пацієнтів, яка обґрунтовує це дослідження розміщено на платформі Open Science Framework (<https://osf.io/gahz5>).

Подяка. Фінансування цього дослідження здійснювалося в рамках Ключових проектів Міністерства науки і технологій Китаю «Підготовка спеціальної плазми в спеціального глобуліну, в'язкої в пацієнтів, які одужали від інфекції COVID-19» (Проект 2020YFC0841800). Шанхайський Гуанчський Фонд розвитку трансляційної медицини. Ми висловлюємо вдячність всім пацієнтам і донорам, які брали участь в цьому дослідженні.