

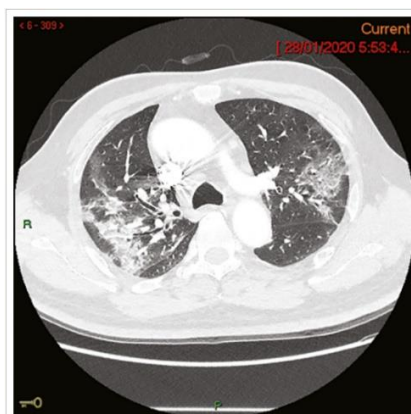
Выделение и быстрое распространение нового коронавируса 2019 года (SARS-CoV-2) от первого пациента с диагнозом COVID-19 в Австралии

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.5694/mja2.50569>

Основными принципами борьбы с любым инфекционным заболеванием являются эффективные стратегии профилактики, диагностики и лечения. Для вирусных патогенов распространение живого вируса и своевременное распространение вирусного изолята среди Австралийских и международных научных учреждений и учреждений общественного здравоохранения имеют решающее значение. Быстрый обмен материалами позволил лабораториям подтвердить свои диагностические тесты и подтвердить их способность обнаруживать SARS-CoV-2. В этом отчете описывается клиническое течение и лабораторные особенности первого зарегистрированного случая COVID-19 в Австралии вместе с выделением, секвенированием и визуализацией вируса.

58-летний мужчина из Ухани, Китай, почувствовал себя плохо в день его прибытия в Мельбурн (19 января 2020 года). В Китае у него не было контактов с живыми пищевыми рынками, людьми, у которых, как известно, есть COVID-19, или с больницами. Его история болезни включала сахарный диабет 2 типа, и он бросил курить четыре года назад. 20 января у него поднялась температура, а 23 января - кашель с выделением мокроты; 24 января он поступил в медицинский центр Монаш, Мельбурн, из отделения неотложной помощи с прогрессирующей одышкой. Его температура составляла 38,1°C, частота сердечных сокращений 95 ударов в минуту и насыщение кислородом 94% на воздухе помещения. Рентгенография грудной клетки показала едва различимые непрозрачные помутнения в средних зонах с двух сторон и в левой нижней зоне. Компьютерная томография грудной клетки на четвертый день приема выявила обширные затемнения по типу матового стекла с перибронховосудистым и периферическим распределением в средних и верхних зонах легких (вставка 1). Результаты исследования крови включали: количество лимфоцитов $0,80 \times 10^9/\text{л}$ (референтный диапазон $1,0\text{--}4,0 \times 10^9/\text{л}$). Концентрация С-реактивного белка достигла пика на 6-й день приема при 182 мг/л (референтный диапазон, 0–5 мг/л). Нарушения функционального теста печени достигли пика на 12-й день приема - щелочная фосфатаза, 210 ед/л (референтный диапазон, 30–110 ед/л); γ -глутамилтрансфераза, 416 ед/л (референтный диапазон, 30–110 ед/л); аланинаминотрансфераза, 183 ед/л (референтный диапазон, 5–40 ед/л) - и стеатоз печени был выявлен при УЗИ печени. Внутривенное введение цефтриаксона (2 г/день) и азитромицина (500 мг/день) началось на 4-й день приема для лечения потенциальной вторичной бактериальной пневмонии, хотя бактериальный патоген не был идентифицирован. Кислород с низким расходом (максимум 3 л/мин через носовые канюли) вводился до 10-го дня приема. Пациент постепенно улучшался; жар, продуктивный кашель и одышка разрешились к 12-му дню госпитализации, и он был выписан из больницы 7 февраля (15-й день госпитализации).

Вставка 1. Торакальная компьютерная томография (КТ) изображения пациента на 4-й день поступления



Тестирование полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на SARS-CoV-2 проводили на материале из исходного мазка из носоглотки в 200 мкл вирусной транспортной среды и отдельно для образцов мокроты, мочи, фекалий и сыворотки. Вкратце, был разработан внутренний RT-PCR-анализ в реальном времени, и все положительные тесты были подтверждены вложенной RT-PCR с использованием ранее описанных методов.

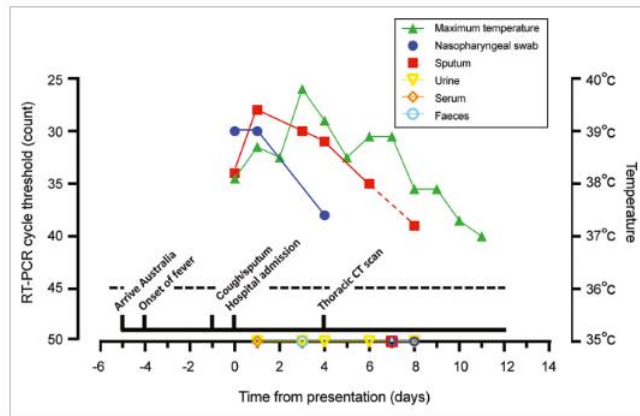
Материал из исходного мазка из носоглотки использовали для инокуляции клеточной линии Vero / hSLAM (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур [ECACC] # 04091501). Колбы контролировали на предмет развития вирусного цитопатического эффекта и каждые 48 часов удаляли аликвоты по 140 мкл для оценки вирусной нагрузки с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для электронной микроскопии аликвоту 4 мл супернатанта из клеточных культур, выращенных в присутствии 4 мкг/мл трипсина, инактивировали 0,5% глутаровым альдегидом в течение 12 часов и осветляли центрифугированием при 1000 g в течение 3 минут. Супернатант подвергали отрицательному окрашиванию 3% фосфорновольфрамовой кислотой (pH 7,0) и исследовали с помощью электронного микроскопа FEI Tecnaï T12 при 80 кВ. Оставшийся осадок окрашивали в блоке и закапывали в смолу; Срезы 70 нм были исследованы с помощью электронного микроскопа FEI Tecnaï F30 при 200 кВ (Supporting Information, 2.1–2.2).

Был извлечен РНК для секвенирования всего генома вирусного изолята. Вкратце, РНК была извлечена из осветленного супернатанта клеточной культуры и случайно амплифицированной кДНК, полученной с помощью независимой от последовательности амплификации с одним праймером (SISPA).

Носоглоточный мазок и мокрота, собранные при представлении, были положительными для SARS-CoV-2 при анализе RT-PCR в реальном времени. Серийное ежедневное RT-PCR-тестирование мазков из носоглотки и мокроты от пациента показало постепенное снижение вирусной нагрузки в мокроте между 1 и 8 днями приема, а также снижение вирусной нагрузки и исчезновение из мазков из носоглотки к 7-му дню поступления, образцах мочи, фекалиях (3-й день поступления) и образцах плазмы (1-й день поступления) (вставка 2).

Вставка 2. Клинический курс первого австралийского случая COVID-19, включая лабораторные исследования



Филогенетический анализ показал, что последовательность генома изолята BetaCoV/Australia/VIC01/2020 показала идентичность последовательности более 99,99% с другими общедоступными геномами SARS-CoV-2, что согласуется с эпидемиологическими особенностями вируса, который появился в Ухане.