

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection Is Mediated by the IgG Receptors FcγRIIA and FcγRIIIA but Does Not Contribute to Aberrant Cytokine Production by Macrophages

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01987-21>

ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ **SARS-CoV-2** มี **IgG Receptor** คือ **FcγRIIA** และ **FcγRIIIA** เป็นสื่อกลางแต่ไม่มีส่วนในการผลิตไซโตไคน์ที่ผิดปกติ โดย **Macrophage** (**Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection Is Mediated by the IgG Receptors FcγRIIA and FcγRIIIA but Does Not Contribute to Aberrant Cytokine Production by Macrophages**)

บทคัดย่อ (ABSTRACT)

การแพร่ระบาดของโรคโคโรนาไวรัส 2019 (โควิด 19) ทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับผลเสียของแอนติบอดี ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อกำลังเป็นข้อกังวลมากที่สุดเรื่องหนึ่ง ไม่เพียงแต่ในแง่ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลันรุนแรง (ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2) เมื่อเกิดการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) จากเชื้อไวรัสเหล่านั้น แต่ยังเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่อวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 อีกด้วย ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ประเมินภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อโดยใช้พลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ในระยะพักฟื้น (COVID-19 convalescent-phase plasma) และเซลล์ BHK ที่มีการแสดงออกของ human Fcγ receptors (FcγRs) เราพบว่า FcγRIIA และ FcγRIIIA เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) พอประมาณของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ถึงแม้ว่ามีการสังเกตพบว่ามีภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อใน macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 รวมทั้งสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กลายพันธุ์ (variant) ของเชื้อนี้ก็ตาม แต่การแสดงออกของ cytokine/chemokine ที่มีแนวโน้มให้เกิดการอักเสบก็ไม่ได้เพิ่มขึ้น (upregulate) ใน macrophage การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ทำให้มีการผลิตแอนติบอดีซึ่งกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อ แต่ว่าแอนติบอดีเหล่านั้นก็ไม่ได้มีส่วนในการผลิตไซโตไคน์ส่วนเกินโดย macrophage

สิ่งสำคัญ (IMPORTANCE) เชื้อไวรัสทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยผ่านทาง receptor ที่จำเพาะที่พื้นผิวเซลล์ ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อเป็นกลไกทางเลือกของการติดเชื้อสำหรับเชื้อไวรัสในการทำให้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการติดเชื้อซึ่งมีแอนติบอดีและ IgG receptors (FcγRs) เป็นสื่อกลาง ด้วยเหตุที่ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อมีส่วนให้

เกิดพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของไวรัสบางชนิด เช่น ไวรัสเด็งกี และเชื้อโคโรนาไวรัสในแมว ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญในการประเมินกลไกที่ถูกต้องแม่นยำของภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อและผลของมันที่มีส่วนในการเกิดพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในการศึกษาวิจัยนี้จากการใช้พลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ในระยะพักฟื้น เราพบว่า FcγRs, FcγRIIA และ FcγRIIIA จำนวน 2 ประเภทเป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ถึงแม้ว่ามีการสังเกตพบว่ามีภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 และสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กลายพันธุ์ (variant) ของเชือนี้เมื่อเร็ว ๆ นี้ก็ตาม แต่การผลิตไซโตไคน์ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ใน macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ก็ไม่ได้มีการเพิ่มขึ้น สิ่งที่ได้จากการสังเกตเหล่านี้ทำให้น่าเชื่อได้ว่า การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ทำให้มีการผลิตแอนติบอดีที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อ แต่แอนติบอดีเหล่านี้อาจจะไม่เกี่ยวข้องในการปลดปล่อยไซโตไคน์ที่ผิดปกติโดย macrophage ใน ระหว่าง การ ติด เชื้อ ไว รุ ส โ ค โ ร น า ส า ย พ ัน ธุ์ SARS- CoV- 2

บทนำ (INTRODUCTION)

เชื้อไวรัสทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลันรุนแรง (ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโคโรนาไวรัส 2019 (โควิด 19) ได้มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและระบาดทำลายล้างในวงกว้างไปทั่วโลก (1) นับถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2564 มียอดผู้ที่ติดเชื้อนี้มากกว่า 166,220,000 ราย และจำนวนผู้ที่เสียชีวิตสูงถึง 3,445,000 รายทั่วโลก (2) เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 และสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กลายพันธุ์ (variant) ของเชือนี้ยังคงสร้างความเสียหายต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์และเศรษฐกิจของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกต่อไป

ในระหว่างการระบาดของโรค การรณรงค์ให้มีการฉีดวัคซีนในทุก ๆ ประเทศทั่วโลกนับเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น เพื่อลดความเสี่ยงของการติดเชื้อและการแพร่กระจายของโรค (3) จนถึงขณะนี้วัคซีนมากมายหลากหลายชนิดได้รับการพัฒนาและอนุมัติ (4) แต่อย่างไรก็ตามความกังวลใหญ่หลวงที่สุดอย่างหนึ่งในด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับวัคซีนก็คือปรากฏการณ์ที่รู้จักกันว่า ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัส (5) ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อเป็นเรื่องหนึ่ง ที่ควรได้รับการพิจารณาเมื่อผู้ป่วยกำลังได้รับการบำบัดรักษาด้วยพลาสมาในระยะพักฟื้น (convalescent-phase plasma) หรือแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (5) นอกจากนี้ด้วยการอุบัติขึ้นของสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่กลายพันธุ์ (variants) ความเสี่ยงในการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ก็ยังเพิ่มความเป็นไปได้ในการเกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อ

ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อเป็นกลไกทางเลือก (alternative mechanism) ของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ (5-7) immune complex ของไวรัสและแอนติบอดี (ส่วนใหญ่เป็น

แอนติบอดีที่เป็นชนิด nonneutralizing หรือ cross-reactive) สามารถยึดเกาะกับโมเลกุลตัวรับ (receptor molecule) ที่เรียกว่า Fcγ receptors (FcγRs) บนเซลล์ภูมิคุ้มกันและสามารถเกิดการ internalize ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสได้ (5, 7) ด้วยเหตุที่ macrophage/monocyte มีการแสดงออกของ FcγRs (FcγRIA, FcγRIIA, และ FcγRIIIA) บนพื้นผิวของมัน (7-9) macrophage จึงได้รับการพิจารณาว่าเป็นตัวกระตุ้นหลัก (major inducer) ให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อ นอกจากนี้การอักเสบรุนแรง (hyperinflammation) บ่อยครั้งก็มีสาเหตุมาจากเซลล์ภูมิคุ้มกันซึ่งรวมทั้ง macrophage เมื่อมีภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ (10)

ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อเกิดขึ้นกับเชื้อไวรัสต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งไวรัสเดงกี ไวรัส RSV (respiratory syncytial virus) และไวรัสไข้หวัดใหญ่ รวมทั้งไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-1 และไวรัสโคโรนากลุ่มอาการโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS-CoV) (5, 6) มีการศึกษาวิจัยมากมายที่ศึกษาว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อหรือไม่ (11, 12) และมีการสังเกตพบภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในการศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดรักษาด้วยพลาสมาจากระยะพักฟื้น (12) ในขณะที่มีการรายงาน FcγRIIA เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในการศึกษาวิจัยนั้น แต่ก็ไม่ได้มีการอธิบายถึงกลไกที่ต้องแม่นยำอย่างชัดเจนมากนัก นอกจากนี้ก็ยังคงไม่เป็นที่แน่ชัดว่า FcγRIA และ FcγRIIIA มีความเกี่ยวข้องกับภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 หรือไม่ ถึงแม้ว่ามีการรายงาน FcγRIA และ FcγRIIIA เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโรคกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์และทางเดินหายใจในสุกรหรือโรคพอร์อาร์เอส (porcine reproductive virus and respiratory syndrome virus) (13) ไวรัสเดงกี (14) และไวรัสโรคไขสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) (15) ตามลำดับ นอกจากนี้ไม่เป็นที่ทราบว่าการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตไซโตไคน์ที่ผิดปกติใน macrophage หรือไม่ หรือภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อได้รับการกระตุ้นจากสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ต่าง ๆ (variants) ของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 หรือไม่

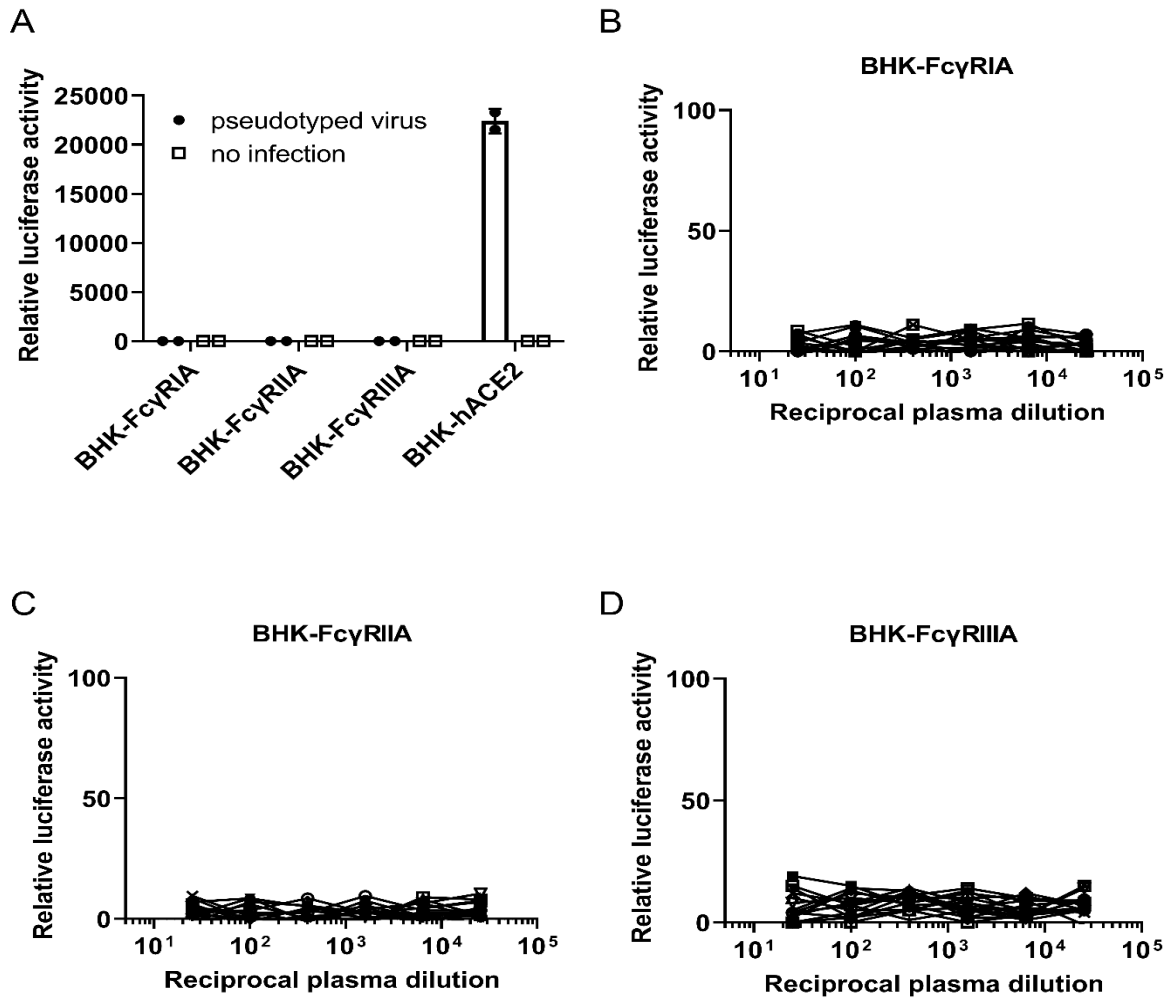
เพื่อที่จะคลี่คลายข้อสงสัยเหล่านี้ ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยใช้พลาสมาในระยะพักฟื้น (convalescent-phase plasma) จากผู้ป่วยโควิด 19 และพบว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อโดยหลัก ๆ แล้วมี FcγRs คือ FcγRIIA และ FcγRIIIA 2 ประเภทเป็นสื่อกลาง

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยและการอภิปราย (RESULTS AND DISCUSSION)

การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อ

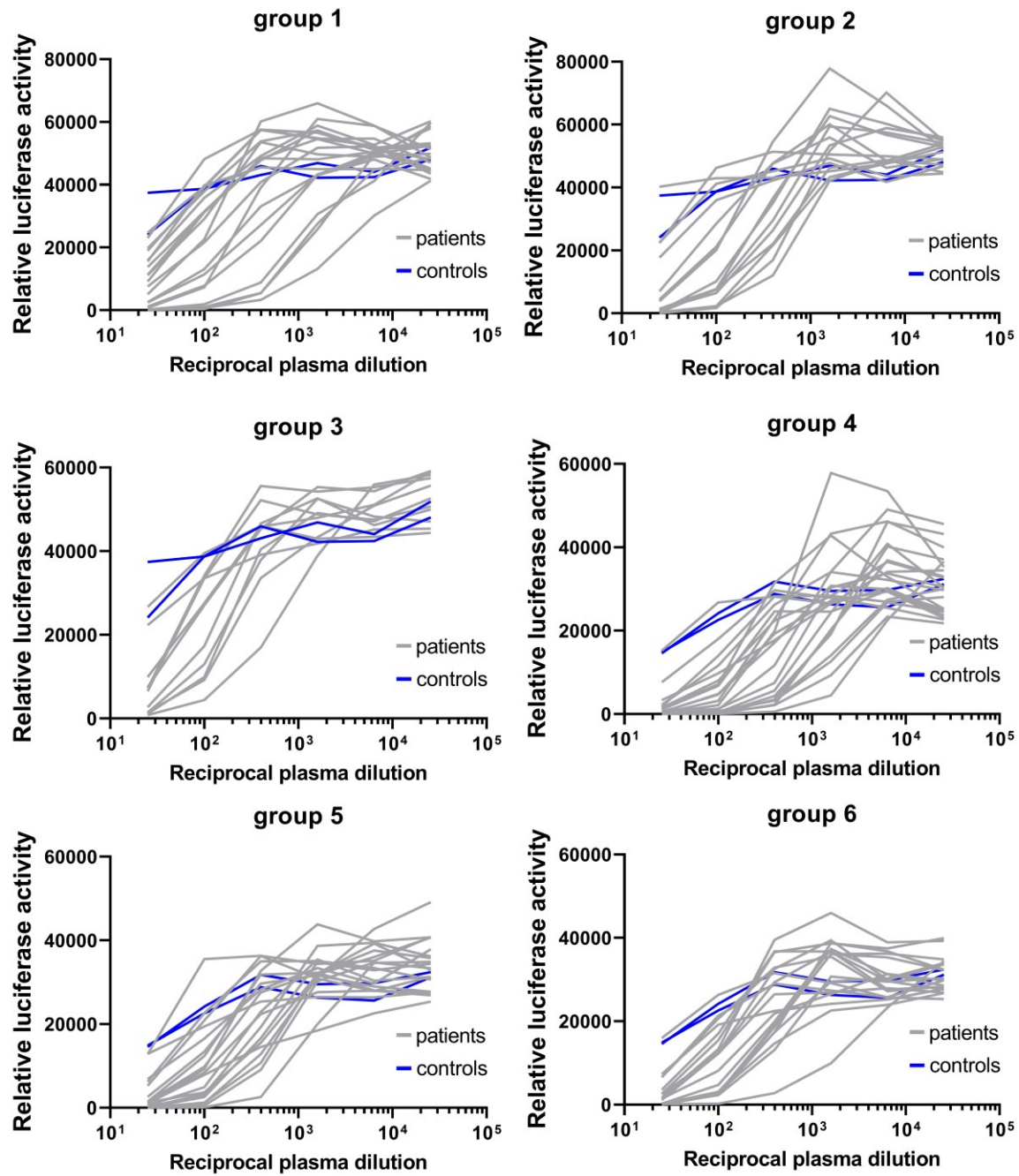
อันดับแรกเราตรวจหาว่า FcγRs โดยตัวมันเองแล้วเป็นสื่อกลางของการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 หรือไม่ เราได้ generate เซลล์ BHK ที่มีการแสดงออกอย่างมั่นคงไม่เปลี่ยนแปลงของ human FcγRs (FcγRIA, FcγRIIA, หรือ FcγRIIIA) หรือ human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) (เป็น entry receptor สำหรับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2) เพราะว่าเซลล์ BHK ที่เป็น wild type ไม่มีการแสดงออกของ human ACE2 และไม่อ่อนแอต่อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (16) ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงสามารถใช้ในการทดสอบว่าโปรตีนที่ได้รับการ transfect เหล่านี้เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 หรือไม่ เซลล์ BHK ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโรคปากอักเสบพุพอง (vesicular stomatitis virus - VSV) ซึ่งมีการแสดงออกของการเรืองแสงของหิ่งห้อย (firefly luciferase) ซึ่งไม่มียีน VSV-G และได้รับการ pseudotype กับหนามของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (VSV-SARS2-S) เซลล์ถูก lyse และปฏิกิริยาอาการการเรืองแสง (luciferase activity) ได้รับการประเมินหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (24 h postinfection (hpi)) และอย่างที่เราได้คาดหมายไว้ ถึงแม้ว่าเซลล์ BHK-hACE2 จะมีความอ่อนแอต่อหนามของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (VSV-SARS2-S) แต่เซลล์ BHK-FcγRIA, BHK-FcγRIIA, และ BHK-FcγRIIIA กลับไม่มีความอ่อนแอเนื่องจากไม่มี hACE2 (ดูใน [ภาพประกอบ S1A](#)) (16) ต่อจากนั้นเราได้ทำการทดสอบว่าพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 หรือไม่ เราใช้ตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นจำนวน 15 ตัวอย่างซึ่งสุ่มเลือกจากตัวอย่างพลาสมาจำนวน 110 ตัวอย่าง (ตามรายการใน [ภาพประกอบ S2A และ B](#)) และตัวอย่างพลาสมาจำนวน 1 ตัวอย่างจากผู้ที่ไม่ติดเชื้อ เซลล์ BHK-FcγRIA, BHK-FcγRIIA, และ BHK-FcγRIIIA ถูกทำให้ติดเชื้อมีหนามไวรัส VSV-SARS2-S ที่ได้รับการ incubate กับตัวอย่างพลาสมาที่มีการทำให้เจือจางโดยวิธี serially dilute และสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) ได้รับการประเมินหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง เราตรวจไม่พบสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) ใดๆ ในตัวอย่างเหล่านี้ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าเซลล์ BHK ซึ่งมีการแสดงออกของ FcγRs ด้วยตัวมันเองไม่ได้เป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ([ภาพประกอบ S1B](#) ถึง [D](#))

Supplemental Figure 1

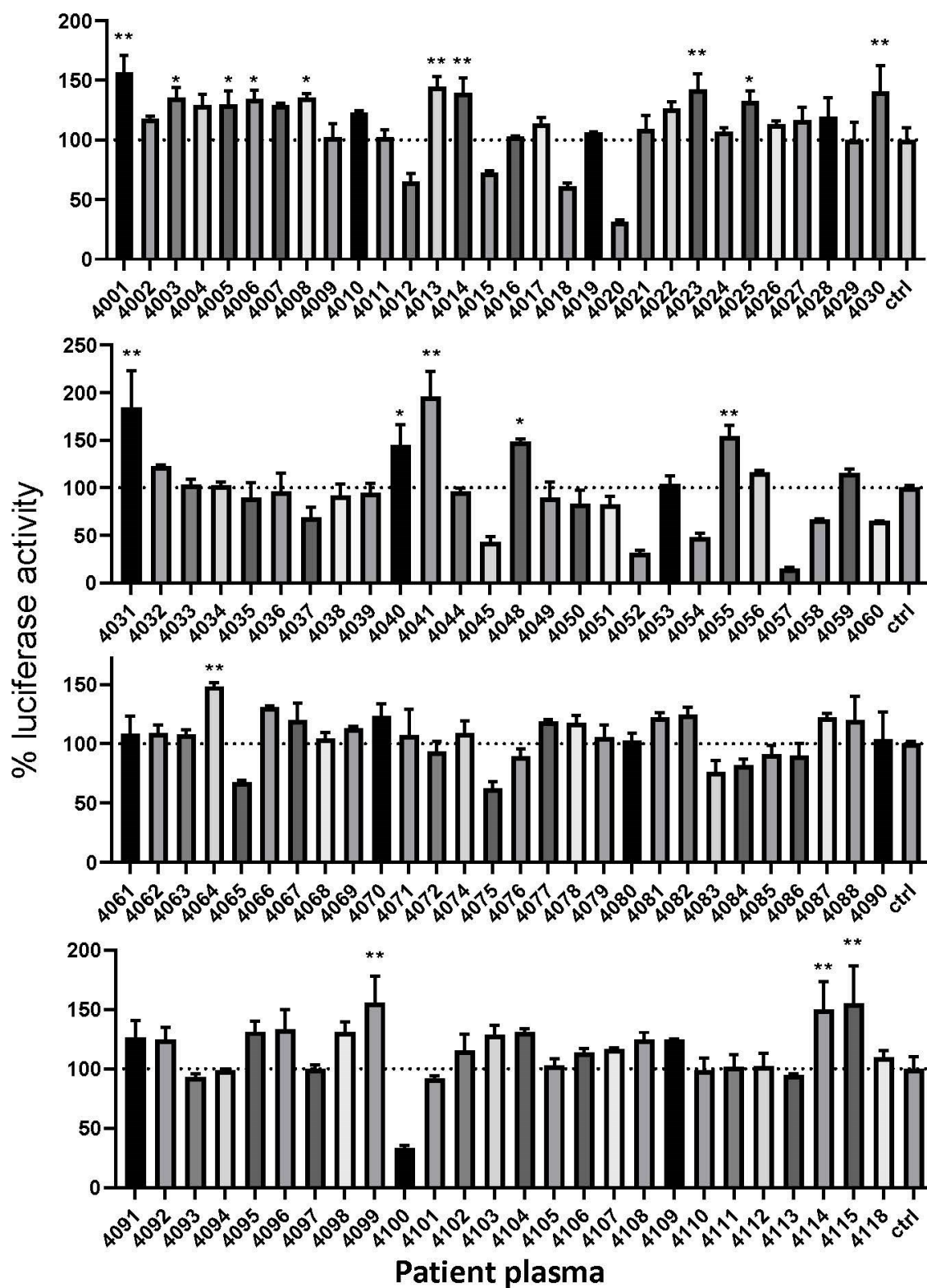


ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ไม่ได้มี FcγRs เป็นสื่อกลางด้วยตัวมันเอง. (A) เซลล์ที่ระบุถูกทำให้ติดเชื้อมีไวรัส VSV-SARS2-S และไม่ติดเชื้อมีไวรัส VSV-SARS2-S และปฏิกิริยาอาการการเรืองแสง (luciferase activities) ใน cell lysates ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง การทดลองทำกับตัวอย่าง 2 ชุด (duplicate samples) ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว. (B) ตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นที่เจือจางโดยวิธี serially dilute จากผู้ป่วยจำนวน 15 คนหรือพลาสมาควบคุม (control plasma) ที่ได้รับการ incubate กับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ถูกใช้ในการทำให้เซลล์ที่ระบุติดเชื้อ และปฏิกิริยาอาการการเรืองแสง (luciferase activity) ใน cell lysates ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง.

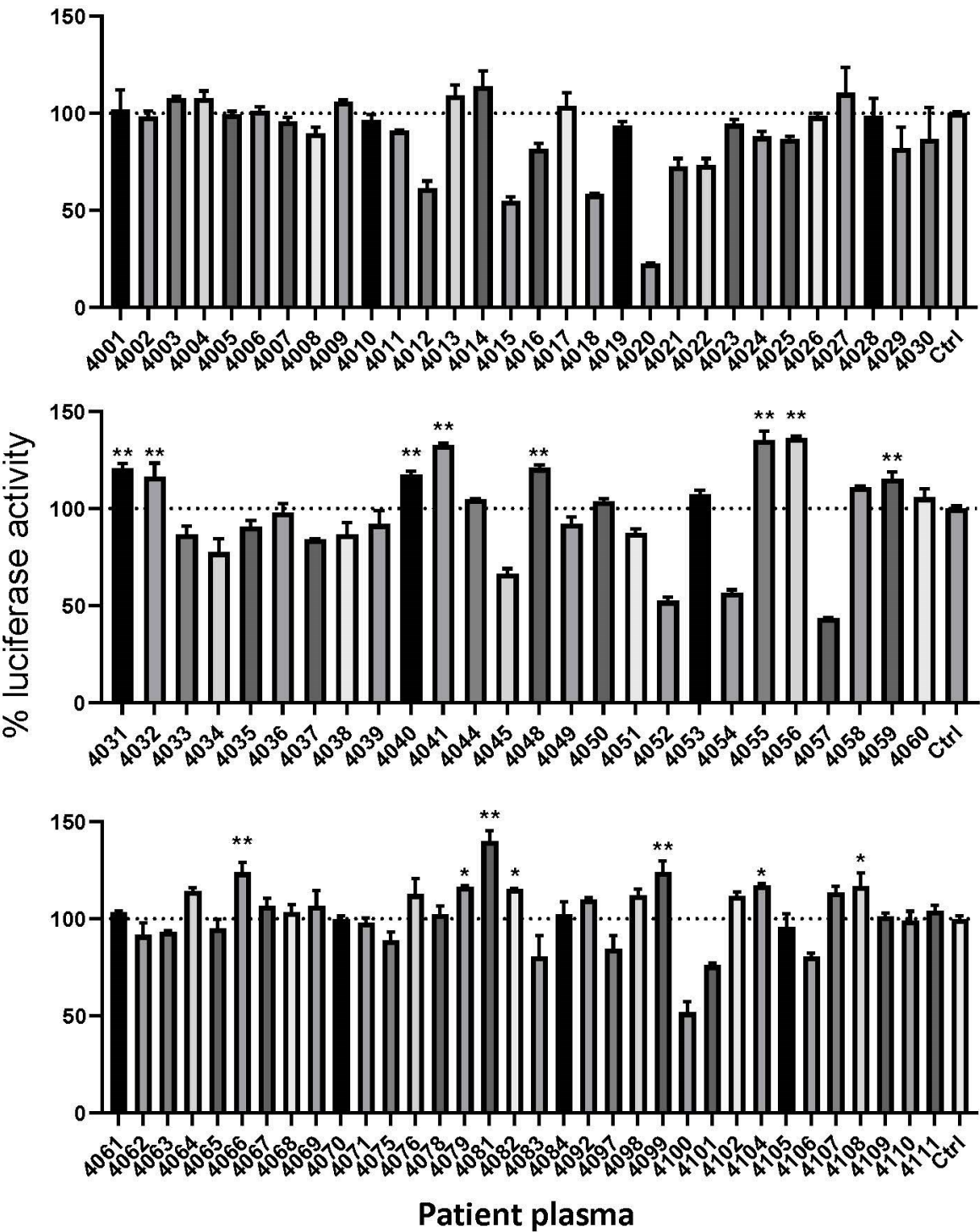
Supplemental Figure 2A



Supplemental Figure 2B

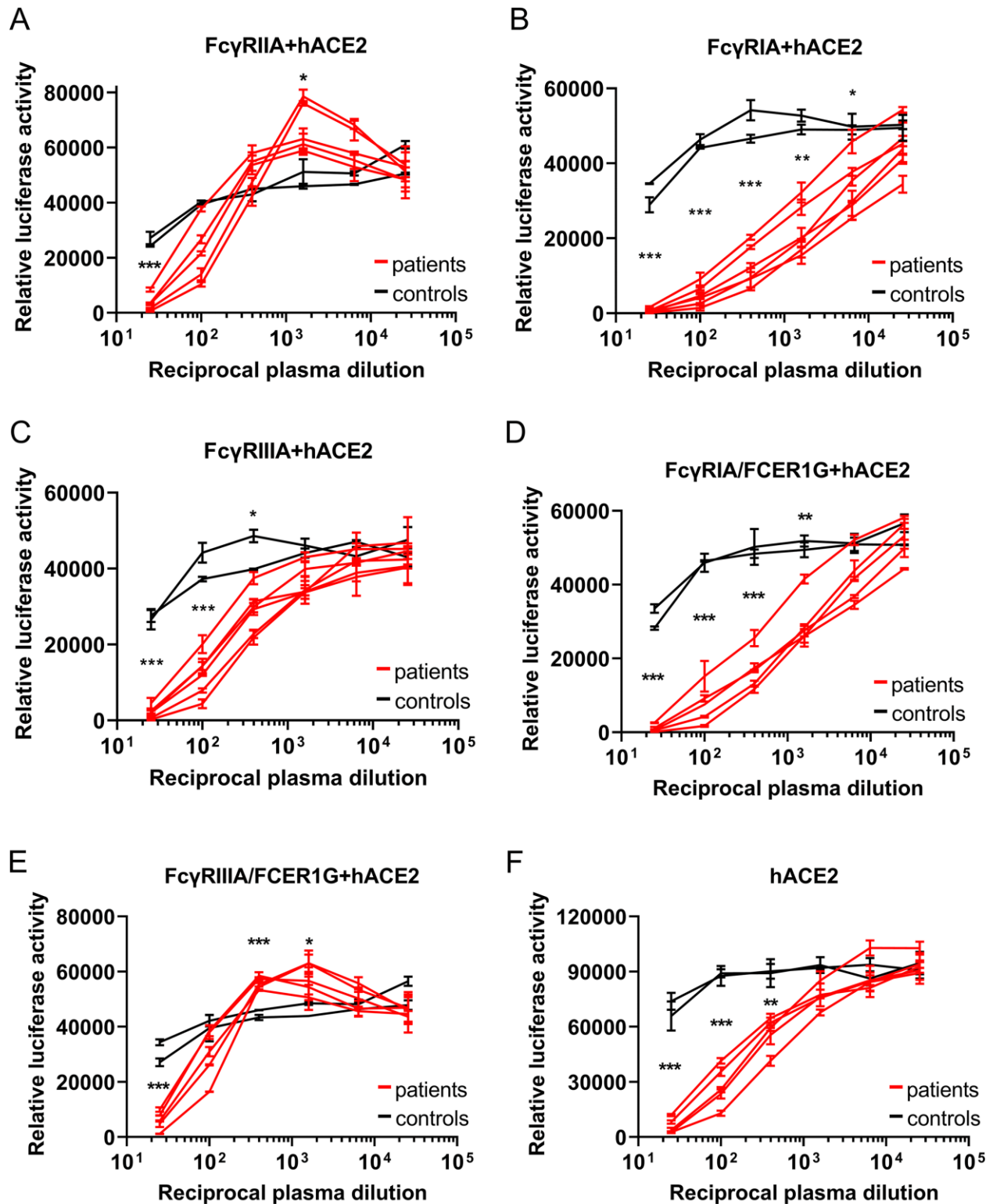


Supplemental Figure 2C



การตรวจคัดกรองสำหรับแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อในพลาสมาใน
 ระยะพักฟื้นจากผู้ป่วยโควิด 19. (A) ตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นที่เจือจางโดยวิธี **serially dilute** จากอาสาสมัครจำนวน 110 คนและ
 ตัวอย่างพลาสมาที่เป็นกลุ่มควบคุม (**control**) จำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งได้รับการ **incubate** กับหนามไวรัส **VSV-SARS2-S** ถูกใช้ในการ
 ทำให้มีการติดเชื้อมีเซลล์ที่ระบุซึ่งได้รับการ **transfect** กับ **hACE2 expression vector**; ปฏิริยาอาการการเรืองแสง
 (**luciferase activity**) ใน **cell lysates** ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง. ตัวอย่างพลาสมาจำนวน 110
 ตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มโดยการสุ่ม. เส้นสีเทาแสดงถึงพลาสมาจากผู้ป่วย เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงพลาสมาในกลุ่มควบคุม (**control**). (B และ
 C) ตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นจากอาสาสมัครที่ระบุและพลาสมาในกลุ่มควบคุม (**control**) ที่เจือจางในอัตรา 1:1,600 และ **incubate**
 กับหนามไวรัส **VSV-SARS2-S** ถูกใช้ในการทำให้มีการติดเชื้อมีเซลล์ (B) เซลล์ **BHK-FcγRIIA** หรือ (C) เซลล์ **BHK-**
FcγRIIA/FCER1G ที่ได้รับการ **transfect** กับ **hACE2 expression vector**; ปฏิริยาอาการการเรืองแสง (**luciferase**
activity) ใน **cell lysates** ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง. การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ **one-way**
ANOVA และตามด้วย **Dunnett's test**. ตัวอย่างพลาสมาที่แสดงการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของสัญญาณการเรืองแสง (**luciferase**
signal) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (**control**) ระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). การทดลองทำเป็น 2 ชุด
 (**duplicate**) ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว .

ต่อจากนั้นเราได้ทดสอบว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อได้รับการกระตุ้นเมื่อมี hACE2 หรือไม่ เราได้ทำการ **transfect** เซลล์ BHK-FcγRIIA กับ hACE2 expression vector หลังจากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อกับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ซึ่งได้รับการ **incubate** กับพลาสมาที่เจือจางด้วยวิธี **serially dilute** และประเมินสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) เราได้ตรวจคัดกรองตัวอย่างพลาสมาจำนวน 110 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 ตัวอย่างเหล่านี้ถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มโดยการสุ่ม (ดูใน [ภาพประกอบ S2A](#) สำหรับผลการตรวจคัดกรองที่ครบถ้วนสมบูรณ์) ใน [ภาพประกอบ 1](#) เราแสดงผลจากตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นจำนวน 5 ตัวอย่างที่แสดงสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) สูงสุดที่การเจือจางในอัตรา 1:1,600 (เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ใน [ภาพประกอบ S2A](#)) และตัวอย่างพลาสมาที่เป็นตัวควบคุม (control) จำนวน 2 ตัวอย่างที่เป็นข้อมูลที่เป็นตัวแทน (representative data) เราพบว่าระดับของ luciferase ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญสำหรับพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 ([ภาพประกอบ 1A](#), เส้นสีแดง) ภายใต้ภาวะที่มีการเจือจางในอัตรา 1:25 เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาควบคุม (control plasma) (เส้นสีดำ) ซึ่งบ่งบอกถึงการลบล้างฤทธิ์ (neutralization) ของหนามไวรัส VSV-SARS2-S ในทางตรงกันข้ามระดับของ luciferase สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญภายใต้ภาวะที่มีการเจือจางในอัตรา 1:1,600 สำหรับพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 ซึ่งบ่งชี้ว่าการติดเชื้อกับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ได้รับการส่งเสริมจากพลาสมาในระยะพักฟื้นโดยผ่านทาง FcγRIIA เมื่อมี ACE2 ([ภาพประกอบ 1A](#)) ต่อจากนั้นเราได้ประเมินภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อในเซลล์ BHK-FcγRIA และ BHK-FcγRIIA ที่ได้รับการ **transfect** กับ hACE2 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา 5 ตัวอย่างชุดเดียวกันที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ของการติดเชื้อในเซลล์ BHK-FcγRIIA และพบว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ไม่ได้รับการกระตุ้นผ่านทาง FcγRIA หรือ FcγRIIA แม้ว่ามี ACE2 อยู่ ([ภาพประกอบ 1B](#) และ [C](#))



ภาพประกอบ 1. ภาพการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอทีอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยหลัก ๆ แล้วมี FcγRIIA และ FcγRIIIA เป็นสื่อกลาง. (A ถึง E) พลาสมาในระยะพักฟื้นที่เจือจางโดยวิธี serially dilute จากผู้ป่วย 5

คนและตัวอย่างพลาสมาจำนวน 2 ตัวอย่างที่เป็น control ซึ่งได้รับการ incubate กับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ถูกใช้ในการทำให้เกิดการติดเชื้อกับเซลล์ที่ระบุซึ่งได้รับการ transfect กับ hACE2 expression vector; ปฏิบัติการอาการการเรืองแสง (luciferase activity) ใน cell lysates ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง. การทดลองทำกับตัวอย่าง 2 ชุด (duplicate sample); ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว. (F) พลาสมาในระยะพักพื้นที่เจือจางโดยวิธี serially dilute จากผู้ป่วย 2 คน และตัวอย่างพลาสมาจำนวน 2 ตัวอย่างที่เป็น control ซึ่งได้รับการ incubate กับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ถูกใช้ในการทำให้เซลล์ที่ระบุติดเชื้อ และปฏิบัติอาการการเรืองแสง (luciferase activity) ใน cell lysate ได้รับการวัดค่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง. การทดลองทำกับตัวอย่าง 2 ชุด (duplicate sample); ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว. การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ unpaired t test. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

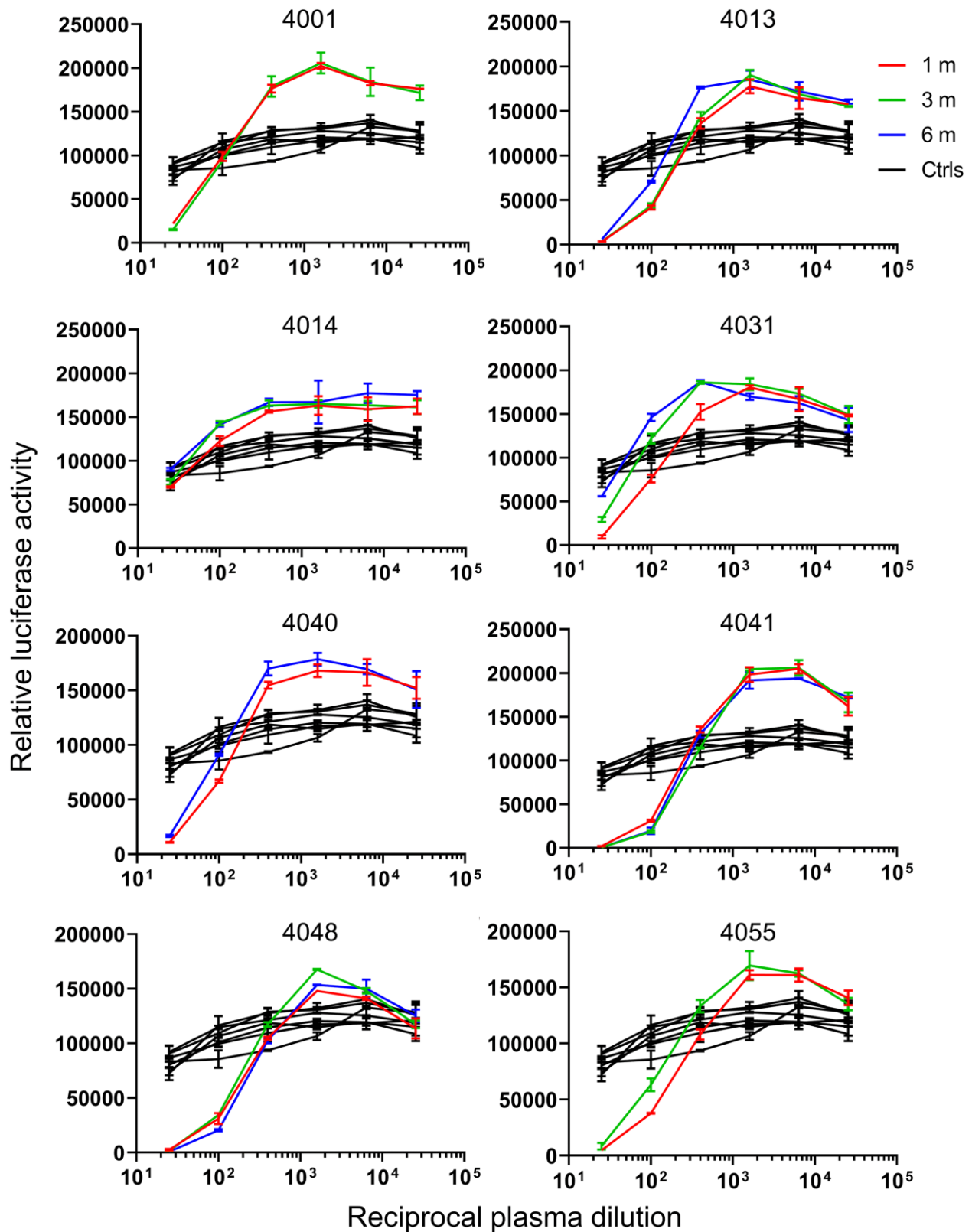
มีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งรายงานว่าความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ FcR γ subunit (Fc fragment ของ IgE receptor Ig [FCER1G]) เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องมีสำหรับการกระตุ้นและการทำงานของ Fc γ RIA และ Fc γ RIIA ที่พื้นผิวเซลล์ (8) ดังนั้นเราจึงได้ปรับเปลี่ยน (engineer) เซลล์ BHK-Fc γ RIA และเซลล์ BHK-Fc γ RIIA ให้มีการแสดงออกของ FCER1G อย่างมั่นคงไม่เปลี่ยนแปลง ต่อจากนั้นเราได้ทำการประเมินภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อในเซลล์ BHK-Fc γ RIA/FCER1G และเซลล์ BHK-Fc γ RIIA/FCER1G ที่ได้รับการ transfect กับ hACE2 expression vector ถึงแม้ว่าเราตรวจไม่พบภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อในเซลล์ BHK-Fc γ RIA/FCER1G (ภาพประกอบ 1D) แต่เราก็สังเกตเห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) ในเซลล์ BHK-Fc γ RIIA/FCER1G กับพลาสมาจากผู้ป่วยที่เจือจาง 1:400 ถึง 1:1,600 ซึ่งบ่งชี้ว่าการติดเชื้อจากหนามไวรัส VSV-SARS2-S มีการเพิ่มขึ้นจากพลาสมาระยะพักพื้นที่ไม่แค่เพียงผ่านทาง Fc γ RIIA เท่านั้นแต่ยังผ่านทาง Fc γ RIIA อีกด้วย (ภาพประกอบ 1E) นอกจากนี้แล้วเรายังตรวจไม่พบภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อในเซลล์ BHK ที่แค่เพียงมีการแสดงออกของ hACE2 เท่านั้น (ภาพประกอบ 1F) เมื่อรวมเข้าด้วยกันแล้วข้อมูลของเราได้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อในมนุษย์ ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ถูกสังเกตพบที่เกิดขึ้นผ่านทาง Fc γ RIIA และ Fc γ RIIA เมื่อมี hACE2 อยู่

ต่อจากนั้นเราได้ขยายขอบเขตของการประเมินภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไปยังตัวอย่างพลาสมาจำนวน 90 ตัวอย่างที่มีเซลล์ BHK-Fc γ RIIA/FCER1G เมื่อมี hACE2 เนื่องจากว่าเราสังเกตพบสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) สูงสุดกับพลาสมาที่เจือจางในอัตรา 1:1,600 (ภาพประกอบ S2A; ภาพประกอบ 1A และ E) ดังนั้นเราจึงตรวจคัดกรองตัวอย่างพลาสมาที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ได้ภายใต้สภาวะเงื่อนไขของการทดลองนี้ เราพบว่าตัวอย่างพลาสมาจำนวน 19 ตัวอย่าง (17.3%) และจำนวน 15 ตัวอย่าง (16.7%) มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) ในเซลล์ BHK-Fc γ RIIA และเซลล์ BHK-Fc γ RIIA/FCER1G ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาในกลุ่ม control (ภาพประกอบ S2B และ C) ในบรรดาพลาสมาที่เรา

ทดสอบมีอยู่จำนวน 6 ตัวอย่าง (6.7%) ที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อโดยผ่านทางทั้ง FcγRIIA และ FcγRIIA/FCER1G

แอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อคงอยู่อย่างน้อย 6 เดือนหลังการติดเชื้อ

เราได้รับพลาสมาในระยะพักฟื้นจากผู้ป่วยโควิด 19 หลังจากการตรวจวินิจฉัยเป็นเวลา 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน ดังนั้น เราจึงสามารถตรวจสอบช่วงระยะเวลาของแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อในผู้ป่วยโควิด 19 ได้ เราได้คัดเลือกตัวอย่างพลาสมาจำนวน 8 ตัวอย่าง (4001, 4013, 4014, 4031, 4040, 4041, 4048, และ 4055) ซึ่งมีผลตรวจเป็นบวกสำหรับภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อผ่านทาง FcγRIIA (ภาพประกอบ S2A and B) เซลล์ BHK-FcγRIIA ที่ได้รับการ transfect กับ hACE2 expression plasmid ถูกทำให้ติดเชื้อกับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ที่ incubate กับพลาสมาที่เจือจางโดยวิธี serially dilute และระดับของ luciferase ได้รับการประเมินหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พลาสมาที่เก็บหลังจากการตรวจวินิจฉัยเป็นเวลา 3 เดือน หรือ 6 เดือนมีการเพิ่มสัญญาณการเรืองแสง (luciferase signal) ในระดับเดียวกันกับที่พบในพลาสมาที่เก็บหลังจากการตรวจวินิจฉัยเป็นเวลา 1 เดือน (ภาพประกอบ 2) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) อาจยังคงอยู่อย่างน้อย 6 เดือนหลังการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2

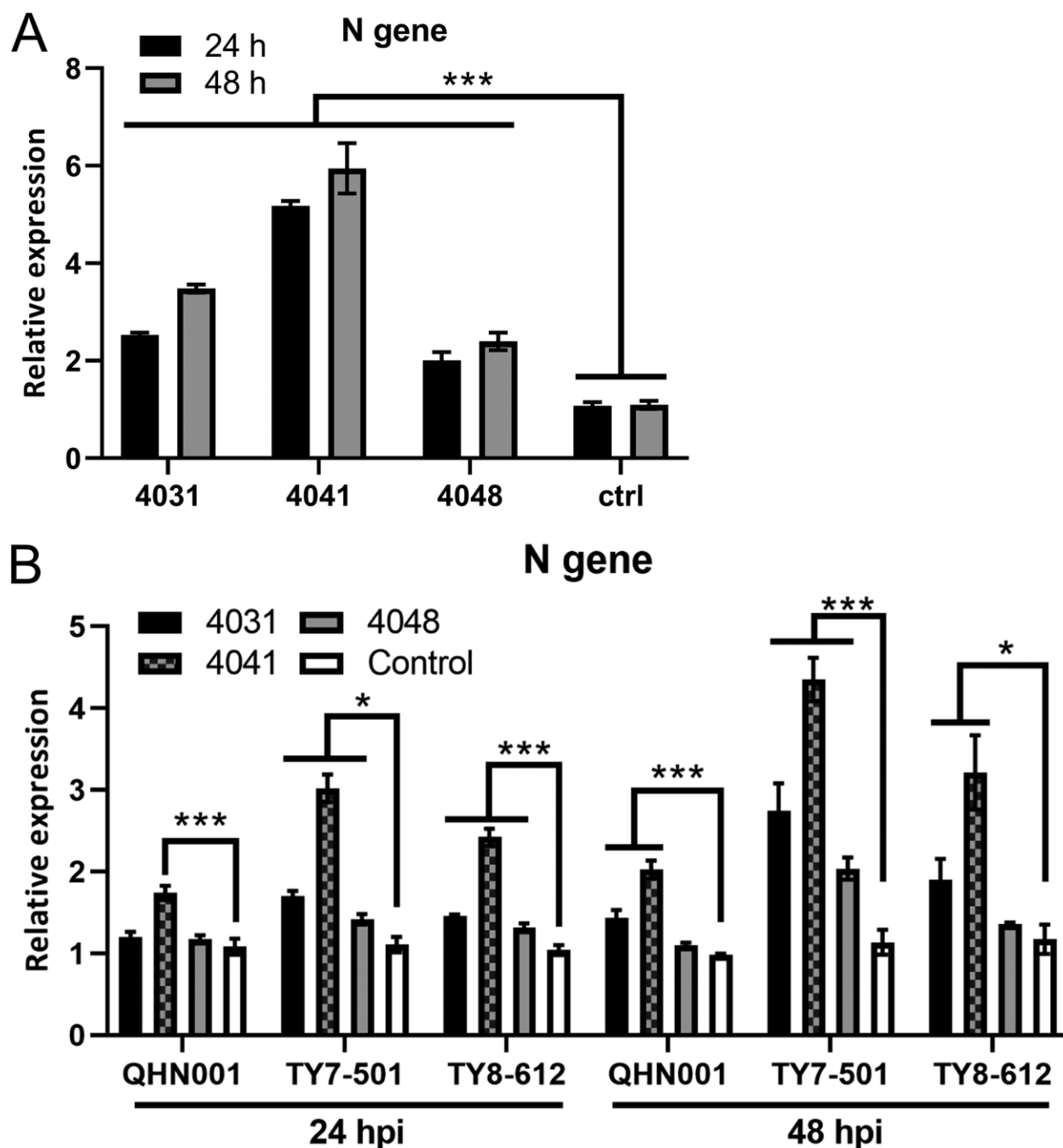


ภาพประกอบ 2. แอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) อาจยังคงอยู่อย่างน้อย 6 เดือน หลังจากการติดเชื้อ. ตัวอย่างพลาสมาในระยะพักพื้นที่เจือจางโดยวิธีการ serially dilute (เก็บหลังจากการตรวจวินิจฉัยด้วยเวลา 1 เดือน 3

เดือน และ 6 เดือน) จากผู้ป่วยที่ระบุและตัวอย่างพลาสมาที่เป็นตัว **control** จำนวน 7 ตัวอย่างที่ได้รับการ **incubate** กับหนามไวรัส VSV-SARS2-S ถูกใช้ในการทำให้เกิดการติดเชื้อมีเซลล์ BHK-FcyRIIA ซึ่งได้รับการ **transfect** กับ hACE2 expression vector; ปฏิบัติการอาการเรืองแสง (luciferase activity) ใน cell lysates ได้รับการวัดหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง. การทดลองทำกับตัวอย่าง 2 ชุด (duplicate sample); ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว.

การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับการส่งเสริมจากพลาสมาในระยะพักฟื้นใน primary macrophages

Macrophages มีการแสดงออก FcyRs จากภายใน (7-9) ด้วยเหตุนี้เพื่อที่จะตรวจหาว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อได้รับการกระตุ้นใน primary macrophage ของมนุษย์หรือไม่ เราจึงได้ทำให้ macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte เกิดการติดเชื้อมีเซลล์ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ตัวจริง (NCGM02) ซึ่งได้รับการ **incubate** กับพลาสมาในระยะพักฟื้นที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,600 เราได้คัดเลือกตัวอย่างพลาสมาในระยะพักฟื้นจำนวน 3 ตัวอย่างที่กระตุ้นภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) โดยผ่าน FcyRIIA และ FcyRIIA/FCER1G (4031, 4041, และ 4048) เป็นพลาสมาตัวแทนสำหรับการทดลองนี้ อาร์เอ็นเอได้รับการ **isolate** จากเซลล์หลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง และมีการตรวจด้วยวิธี reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) เพื่อหาปริมาณยีน N ของไวรัส เราพบว่าการแสดงออกของยีน N มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน macrophage ที่ได้รับการ **incubate** กับพลาสมาในระยะพักฟื้นหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 3A) ผู้ป่วยใน cohort ของเราได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ ป่วยเป็นโรคโควิด 19 ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2563 ซึ่งแสดงว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สายพันธุ์แต่แรก (early SARS-CoV-2 strains) ดังนั้นเราจึงทำการตรวจหาต่อไปว่าพลาสมาในระยะพักฟื้นเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อสำหรับเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สายพันธุ์เมื่อเร็ว ๆ นี้หรือไม่ เราได้ใช้ 3 สายพันธุ์ (variants) (คือ VOC202012/01 หรือ B.1.1.7 [QHN001]; VOC202101/02 หรือ P.1 [TY7-501]; และ VOC202012/02 หรือ B.1.351 [TY8-612]) และทำการทดลองซ้ำอย่างเช่นที่เราทดลองกับสายพันธุ์แรกเริ่มคือ NCGM02 ก่อนหน้านั้น เราพบว่า macrophage ที่ถูกทำให้ติดเชื้อมีเซลล์สายพันธุ์ (variants) เหล่านี้ซึ่งได้รับการ **incubate** กับพลาสมาในระยะพักฟื้นมีการแสดงของยีน N ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ **incubate** กับพลาสมาควบคุม (control plasma) (ภาพประกอบ 3B) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าพลาสมาในระยะพักฟื้นจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สายพันธุ์แต่แรกก็เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อสำหรับเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ด้วยเช่นกัน ถึงแม้ว่าการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน N ที่ได้รับการกระตุ้นจากภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อมีแนวโน้มที่จะต่ำกว่าในสายพันธุ์ (variants) เหล่านี้

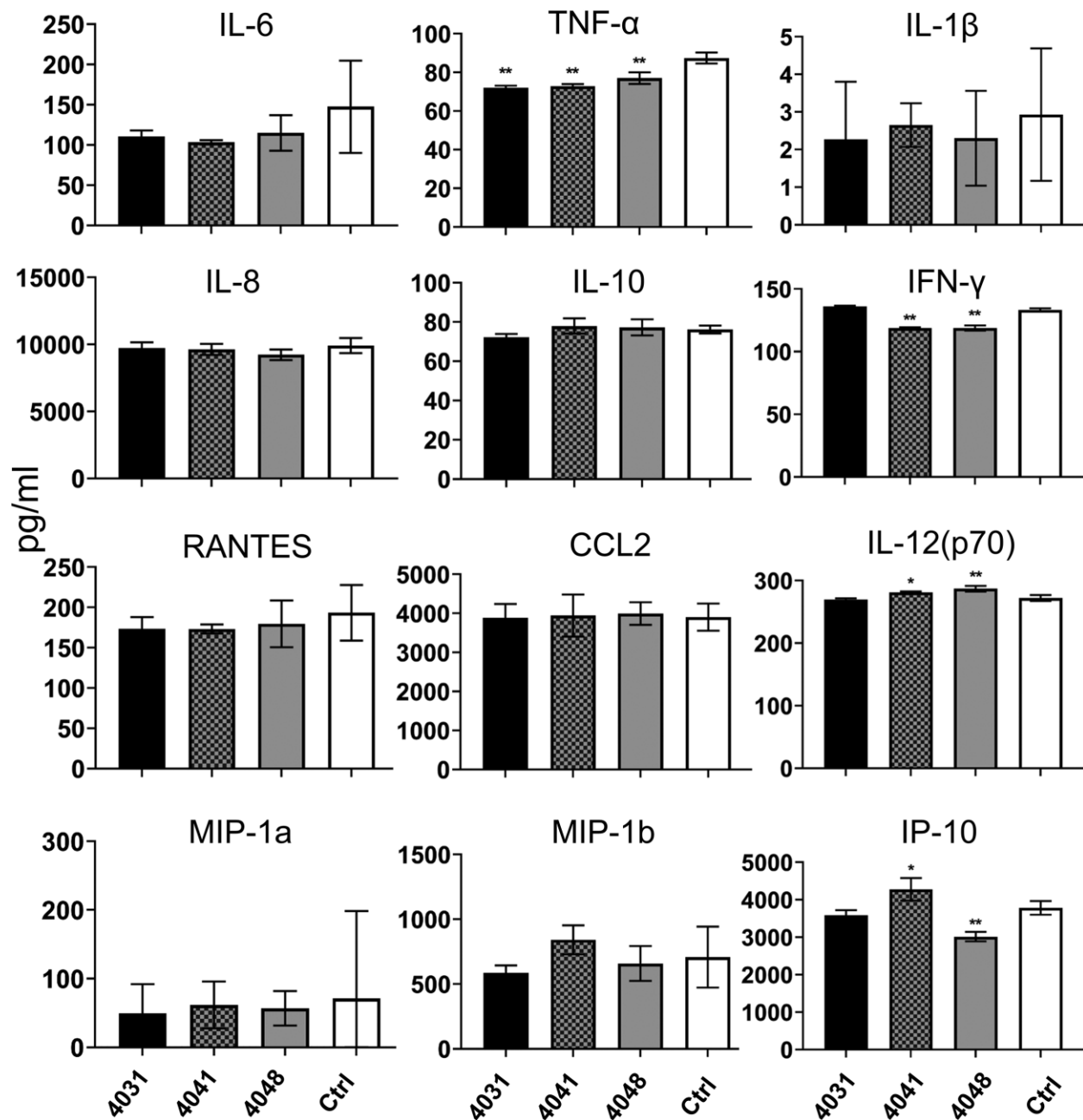


ภาพประกอบ 3. การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับการส่งเสริมจากพลาสมาในระยะพักฟื้นใน primary macrophages. ตัวอย่างพลาสมาที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี) ที่เป็นตัวแทนจำนวน 3 ตัวอย่าง (4031, 4041, และ 4048) รวมทั้ง control plasma ถูกใช้ในการทดลองเหล่านี้. Macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ถูกทำให้ติดเชื้อที่ multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 1 กับ (A) NCGM02 หรือ (B) QHN001, TY7-501, หรือ TY8-612 ที่ได้รับการ incubate กับพลาสมาที่ระบุไว้ซึ่งถูกเจือจางในอัตรา 1:1,600. อาร์เอ็นเอทั้งหมดได้รับการ isolate จากเซลล์หลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง. ยีน N ได้รับการวัดหาปริมาณโดยวิธี RT-qPCR. ผลที่ได้นำเสนอโดยเปรียบเทียบกับระดับของเซลล์ที่ treat กับ control plasma ($2^{\Delta\Delta CT}$). การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ one-way analysis of

variance (ANOVA) ตามด้วย Dunnett's test. ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$. การทดลองทำเป็น 3 ชุด (triplicate); ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงไว้แล้ว.

การส่งผลของภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ต่อการแสดงออกของ cytokine ใน macrophage

โควิด 19 กระตุ้นให้เกิดภาวะ hyperinflammatory state ในรายที่มีอาการรุนแรง ซึ่งก็บ่งบอกถึงการผลิตสาร cytokine ที่ผิดปกติ เช่น interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), และ CCL2 ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้ง macrophage (17-20). Zheng และคณะได้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนใน cytokine ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบมีการเพิ่มขึ้น (upregulate) ใน macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ภายหลังการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (21) เนื่องจากเราพบว่าพลาสมาในระยะพักฟื้นส่งเสริมให้เกิดให้เกิดการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ดังนั้นเราจึงได้ประเมินว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีส่วนให้เกิดการแสดงออกของ cytokine ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบใน macrophage หรือไม่ เราได้ทำให้ macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte มีการติดเชื้อกับ NCGM02 ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ซึ่งได้รับการ incubate กับพลาสมาในระยะพักฟื้นที่เจือจางในอัตรา 1:1,600 (4031, 4041, และ 4048) macrophages ถูกทำให้ติดเชื้อกับ NCGM02 ที่ multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 1.0 และส่วนที่เป็น supernatant ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและตรวจวิเคราะห์สำหรับ cytokine/ chemokine profiles เราพบว่าระดับของการแสดงออกของ inflammatory cytokines/chemokines ส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยพลาสมาที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ยกเว้นในกรณีที่ cytokine จำนวนน้อยมาก ๆ (ภาพประกอบ 4) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งบอกว่าแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) อาจจะไม่มีส่วนทำให้เกิดการผลิต cytokine ที่ผิดปกติใน macrophage



ภาพประกอบ 4. ภาพการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 และการแสดงออกของ cytokine ใน macrophage. ตัวอย่างพลาสมาที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ที่เป็นตัวแทนจำนวน 3 ตัวอย่าง (4031, 4041, and 4048) และพลาสมาควบคุม (control) ถูกใช้ในการทดลองเหล่านี้ Macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ถูกทำให้ติดเชื้อที่ multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 1 กับ NCGM02 ซึ่งได้รับการ incubate กับพลาสมาที่ระบุซึ่งได้รับการทำให้เจือจางในอัตรา 1:1,600. ส่วนที่เป็น supernatant ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและตรวจวิเคราะห์สำหรับการแสดงออกของ cytokine. การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's test. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.

ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ประเมินแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ในพลาสมาระยะพักฟื้นต่อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เราได้ประเมิน FcγRs ที่กระตุ้นจำนวน 3 ประเภทหลัก ๆ (คือ FcγRIA, FcγRIIA, และ FcγRIIIA) ซึ่งมีการแสดงออกบน monocytes/macrophages (7-9) และ FcγRIIIA มีการแสดงออกบนเซลล์ natural killer ด้วย เราใช้เซลล์ BHK เป็นโมเดลในการประเมินการเพิ่มประสิทธิภาพของการติดเชื้อผ่านทาง FcγRs ถึงแม้ว่าเซลล์เหล่านี้จะไม่ได้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อ(ภาพประกอบ S1B ถึง D) แต่เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการพบว่าจำเป็นจะต้องมี hACE2 รวมทั้ง FcγRIIA และ FcγRIIIA เพื่อเป็นสื่อกลางให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในเซลล์ BHK (ภาพประกอบ 1A และ E) สิ่งที่เราค้นพบนี้ทำให้น่าเชื่อได้ว่า FcγRIIA และ FcγRIIIA อาจจะทำหน้าที่เป็น coreceptor เมื่อมีภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อ ที่สำคัญควรแก่การสังเกตก็คือภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ซึ่งมี FcγR เป็นสื่อกลางมีปริมาณพอประมาณเมื่อเทียบกับกรณีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซึ่งเป็นที่รู้กันว่าการกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ที่แข็งแกร่ง (22) ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ก็ได้รับการระบุขึ้นใน primary macrophage ด้วย (ภาพประกอบ 3A) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า hACE2 มีการแสดงออกบน macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte และ FcγRs ซึ่งรายงานไปก่อนหน้านี้แล้ว (12)

จากอุบัติขึ้นมาของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ใหม่ ๆ หลาย ๆ สายพันธุ์ (variant) กระตุ้นให้เราประเมินความเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ซ้ำ เนื่องจากมีการรายงานว่าความสามารถของแอนติเจนในการสร้างการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (antigenicity) ของสายพันธุ์เหล่านี้มีความแตกต่างจาก antigenicity ของสายพันธุ์แต่แรก (early strains) (23, 24) ภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อได้รับการบ่งชี้สำหรับสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัยนี้ (ภาพประกอบ 3B) ในตัวอย่างจาก cohort ของเราสังเกตพบภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อเฉพาะในพลาสมาที่ได้รับการเจือจางมากกว่า 1:400 เท่านั้น และพบปฏิกิริยาอาการที่บล้างฤทธิ์ (neutralizing activity) ที่แข็งแกร่งในพลาสมาที่ได้รับการเจือจางต่ำ ๆ (ภาพประกอบ 2) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าการบล้างฤทธิ์ (neutralization) อาจจะมีกับพลาสมาที่มีแอนติบอดีชนิดบล้างฤทธิ์ (neutralizing antibody) ในปริมาณที่เพียงพอ แต่ว่าแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) อาจจะทำหน้าที่ความเข้มข้นต่ำกว่าแอนติบอดีชนิดบล้างฤทธิ์ (neutralizing antibody) จากการที่การศึกษาวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ที่แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีชนิดบล้างฤทธิ์ (neutralizing antibody) ของโปรตีนตรงส่วนหนาม (S protein) ของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สามารถคงอยู่ได้นานถึง 8 เดือน (25, 26) แอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) อาจจะไม่ได้อำนาจให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดดี้) ของการติดเชื้อเป็นเวลาหลายเดือน ความรู้ของเราเกี่ยวกับประชากรแอนติบอดีและช่วงระยะเวลาในผู้ที่ได้รับวัคซีนโควิด 19 ยังคงมีจำกัด การศึกษาวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้เปิดเผยให้เห็นถึงกลไกใหม่ในการเกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือ

ปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่ไม่ได้มี FcγR เป็นสื่อกลาง (27, 28) การศึกษาวิจัยเหล่านี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาในการตอบสนองต่อวัคซีนที่พัฒนาขึ้นมาโดยอ้างอิงสายพันธุ์แต่แรกของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 อาจจะสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อสำหรับสายพันธุ์เมื่อเร็ว ๆ นี้ รวมทั้ง B.1.617.2 (เดลต้า) ด้วย (27, 28) จำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อประเมินว่าแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) และแอนติบอดีชนิดบล็อกฤทธิ์ (neutralizing antibody) สามารถคงอยู่ได้นานมากน้อยเพียงใดในผู้ที่ได้รับวัคซีน

การศึกษาวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่ามีสหสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) กับความรุนแรงของโรคโควิด 19 (11) นอกจากนี้ก็ยังมีรายงานด้วยว่าภาวะ hypercytokinemia ซึ่งเป็นการปลดปล่อย inflammatory cytokine ที่ผิดปกติจาก macrophage เกิดขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 (17-20) เพื่อที่จะศึกษาว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อมีส่วนช่วยให้เกิดภาวะ hypercytokinemia หรือไม่ เราจึงได้ตรวจหาการปลดปล่อย inflammatory cytokine จาก macrophage ที่ได้รับการ incubate กับพลาสมาที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) อย่างไรก็ตามเราพบว่าระดับของ inflammatory cytokine ไม่ได้มีการเพิ่มขึ้นใน macrophage ที่ได้รับการ incubate กับพลาสมาที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ผลที่ได้เหล่านี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบแต่อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวต้านไวรัส (antiviral) ดักจับไวรัสใน macrophage ที่สำคัญควรแก่การสังเกตก็คือว่าเราสังเกตไม่พบการจำลองตัวเอง (replication) ของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ใน macrophage ในการทดลองของเรา (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยหลายชิ้นก่อนหน้านี้ (21, 29)

โดยสรุปแล้วการศึกษาวิจัยของเราได้เปิดเผยให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่เป็นตัวกระตุ้นภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อ และแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) คงอยู่เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือนหลังจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในมนุษย์ ถึงแม้ว่าภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ของการติดเชื้อมีส่วนใหญ่อาศัย FcγRIIA และ FcγRIIIA เป็นสื่อกลางแต่ก็สังเกตไม่พบการมีส่วนที่เป็นผลร้ายจาก macrophage จำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิจัยระยะยาว (longitudinal study) ในการประเมินผลกระทบของแอนติบอดีที่กระตุ้นให้เกิดภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอ็ดอี) ในการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ต่อไป

เครื่องมือและวิธีการ (MATERIALS AND METHODS)

คำแถลงเกี่ยวกับจริยธรรม (Ethics statement)

ตัวอย่างพลาสมาได้รับมาจากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ได้รับการปกปิด (deidentified) ภายใต้โครงการวิจัยที่ได้รับการตรวจพิจารณา สอบทวนโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนแห่งมหาวิทยาลัยวิสคอนซิน แมดิสัน

การแยก (isolation) พลาสมาในระยะพักฟื้นจากผู้ป่วย

ตัวอย่างเลือดได้รับการเก็บตัวอย่างในหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสาร EDTA (เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด) โดยเก็บจากผู้ป่วยจำนวน 110 คนที่ฟื้นตัวจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ตัวอย่างพลาสมาได้รับการ isolate โดยใช้น้ำยา Ficoll ตามคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตและจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งนำไปใช้ ตัวอย่างพลาสมาจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีซึ่งจัดเก็บก่อนปี พ.ศ. 2561 ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท Zenbio

เซลล์

เซลล์ BHK (จากไตของลูกหนูแฮมสเตอร์) ที่มีการแสดงออกอย่างมั่นคงไม่เปลี่ยนแปลงของ human FcγRIA (BHK-FcγRIA), FcγRIIA (BHK-FcγRIIA), FcγRIIIA (BHK-FcγRIIIA), FcγRIA และ FCER1G (BHK-FcγRIA/FCER1G), FcγRIIIA และ FCER1G (BHK-FcγRIIIA/FCER1G), และ human ACE2 (BHK-hACE2) ได้รับการ generate ดังต่อไปนี้: cDNA fragment ที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ของ FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIIA, hACE2, หรือ FCER1G ได้รับการ clone เข้าสู่ retroviral vector pMXs-IRES-Puro หรือ pMXs-IRES-Neo (Cell Biolabs) ซึ่งได้จาก murine leukemia virus ในการ generate รีโทรไวรัสนี้ เซลล์ Plat-GP (Cell Biolabs) ได้รับการ cotransfect กับ pMXs-IRES-Puro พร้อมด้วย expression vector สำหรับ VSV-G โดยการใช้น้ำยา Lipofectamine 2000 (Invitrogen) สองวันต่อมา culture supernatant ซึ่งมีรีโทรไวรัสนี้ได้รับการจัดเก็บและทำให้ใส (clarify) ผ่านตัวกรองที่มีขนาดของรูพรุน $0.45\ \mu\text{m}$ และหลังจากนั้นก็ถูกใช้ในการทำให้เซลล์ BHK เกิดการติดเชื้อ เซลล์คงสภาพ (stable cell) ได้รับการคัดเลือกโดยใช้ยา $4\ \mu\text{g/ml}$ puromycin และ/หรือ $300\ \mu\text{g/ml}$ G418 (InvivoGen) BHK cell line ทั้งหมด (ทั้งที่เป็น wild type และที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ของ FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIIA, hACE2, FcγRIA/FCER1G, หรือ FcγRIIIA/FCER1G) ได้รับการเลี้ยงใน Eagle's minimum essential medium (EMEM) ซึ่งมี 10% FBS และยาปฏิชีวนะที่มี puromycin และ G418 และที่ไม่มี puromycin และ G418 เซลล์ HEK-293T ถูกเลี้ยงใน high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, และยาปฏิชีวนะ เซลล์โมโนนิวเคลียร์ในเลือดส่วนปลายของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cells หรือ PBMCs) ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท Zenbio หรือบริษัท Cellular Technology Ltd. PBMCs ได้รับการเพาะเลี้ยงใน monocyte attachment

medium (Promocell) สำหรับการพัฒนาของ macrophage ใน culture plate ที่เคลือบ (coat) ด้วยสารละลาย ϵ -poly-L-lysine coating solution (Cosmo Bio) PBMCs ได้รับการ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถึง 1 ชั่วโมง 30 นาทีใน incubator โดยที่ไม่มีการกระทำการใด ๆ เพิ่มเติมอีก เซลล์ที่เกาะกับ plate ถูกล้าง 3 ครั้งด้วย monocyte attachment medium และ monocytes/macrophages ได้รับการเพาะเลี้ยงใน RPMI ซึ่งมี 10% FBS และยาปฏิชีวนะ เซลล์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂

ไวรัส

ไวรัสโรคปากอักเสบพุพอง (vesicular stomatitis virus – VSV) ที่มียีนแสดงการเรืองแสงของหิ่งห้อย (firefly luciferase gene) แทนที่ยีน VSV-G และได้รับการ pseudotype กับหนามของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (VSV-SARS2-S) รวมทั้ง VSV ตัวควบคุม (control) ที่มีการแสดงออกของ luciferase ซึ่งมีเฉพาะ VSV-G เท่านั้นได้รับการจัดเตรียม เพื่อที่จะ generate หนามของไวรัส VSV-SARS2-S เซลล์ HEK-293T ได้รับการ transfect เป็นเวลา 24 ชั่วโมงกับ SARS-CoV-2 S expression vector (SinoBiological) และต่อจากนั้นถูกทำให้ติดเชื้อมี VSV-G ที่ MOI of >1.0 Supernatant ได้รับการจัดเก็บ (collect) หลังจากการทำให้ติดเชื้อมีผ่านไป 24 ชั่วโมง และทำให้ใสผ่านตัวกรองที่มีขนาดของรูพรุน 0.45 μ m จากนั้นจึงนำไปใช้ในการทดลอง

Isolate NCGM02 จากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับการเพิ่มจำนวน (propagate) ในเซลล์ Vero E6 ใน Opti-MEM I (Invitrogen) ซึ่งมี 0.3% bovine serum albumin (BSA) และ 1 μ g ของ L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone treated-trypsin ต่อ ml หรือในเซลล์ Vero 76 ใน Eagle's minimal essential medium ซึ่งเสริมด้วย 2% fetal calf serum ที่อุณหภูมิ 37°C สายพันธุ์ (variant) ต่าง ๆ ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 (QHN001, TY7-501, และ TY8-612) ได้รับการเพิ่มจำนวน (propagate) ในเซลล์ Vero E6/TMPRSS2 ใน VP-SFM (Thermo Fisher Scientific)

การทดลองทั้งหมดกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (BSL3) ที่มหาวิทยาลัยโตเกียว ซึ่งได้รับความเห็นชอบอนุมัติสำหรับการใช้ประโยชน์ที่จำเป็นโดยกระทรวงเกษตร การป่าไม้และการประมงของประเทศญี่ปุ่น และในห้องปฏิบัติการที่มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (BSL3) ที่มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน แมดิสัน ซึ่งได้รับความเห็นชอบอนุมัติสำหรับการใช้ประโยชน์ที่จำเป็นโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐฯ และกระทรวงเกษตรของสหรัฐฯ

การประเมินการเข้าสู่เซลล์

เพื่อที่จะตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ (cell entry) ซึ่งมีหนามของไวรัส SARS-CoV-2 S เป็นสื่อกลาง BHK cell lines (ที่เป็น wild type และที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ของ FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIIA, หรือ hACE2) ถูกเติมลงใน plate สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด 96 หลุม แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนและลิปสไลด์ฤทธิ์ต่อโปรตีน VSV-G (clone I-1) ถูกใช้ในการลบความสามารถในการติดเชื้อภูมิหลัง (background infectivity) ของไวรัส parental VSV-G ใน virus stock ของหนามไวรัส VSV-SARS2-S ต่อจากนั้นเซลล์ถูกทำให้ติดเชื้อมี VSV-SARS2-S virus 24 ชั่วโมงต่อจากนั้นเซลล์ได้รับการ lyse และตรวจวิเคราะห์สำหรับปฏิกิริยาอาการเรืองแสงของหิ่งห้อย (firefly luciferase activity) โดยใช้ Steady-Glo luciferase assay system (Promega) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การประเมินภาวะการส่งเสริมโดยอาศัยแอนติบอดี (หรือปรากฏการณ์เอดีอี)

เพื่อที่จะตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ (cell entry) ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ผ่านทางแอนติบอดีจากผู้ป่วย เซลล์ BHK-hACE2, BHK-FcγRIA, BHK-FcγRIIA, BHK-FcγRIIIA, BHK-FcγRIIA/FCER1G, หรือ BHK-FcγRIIIA/FCER1G ถูกเติมลงใน plate สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด 96 หลุมที่มีหรือไม่มี การ transfection ของ vector ที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ของ hACE2 หนามไวรัส VSV-SARS2-S ได้รับการ treat กับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนและลิปสไลด์ฤทธิ์ต่อโปรตีน VSV-G (clone I-1) เพื่อลบความสามารถในการติดเชื้อภูมิหลัง (background infectivity) ของไวรัส parental VSV-G ตัวอย่างพลาสมาถูกทำลายโปรตีนที่จะรบกวนการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีโดยใช้ความร้อน (heat inactivate) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 56°C และเจือจางโดยวิธี serially dilute (จาก 1:25 ถึง 1:25,600) ก่อนได้รับการ incubate กับหนามไวรัส VSV-SARS2-S เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ต่อจากนั้นส่วนผสม (mixture) ระหว่างไวรัสกับพลาสมาที่ถูกใส่เข้าไปในเซลล์ที่ระบุและ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมงต่อมาเซลล์ได้รับการ lyse และตรวจวิเคราะห์สำหรับปฏิกิริยาอาการเรืองแสงของหิ่งห้อย (firefly luciferase activity) โดยใช้ Steady-Glo luciferase assay system (Promega) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต macrophage ที่พัฒนามาจาก monocyte ถูกนำลงไปเลี้ยงใน plate ชนิด 24 หลุมซึ่งเคลือบด้วยสารละลาย ε-poly-L-lysine coating solution และถูกทำให้ติดเชื้อและวิเคราะห์ตามที่ได้อธิบายมาแล้ว

RT-qPCR

อาร์เอ็นเอทั้งหมดถูกแยก (isolate) ออกจากเซลล์โดยใช้ชุด RNeasy minikit (Qiagen, Tokyo, Japan) เพื่อที่จะวัดหาปริมาณของยีน N ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เราทำการตรวจวิธี RT-qPCR แบบขั้นตอนเดียว (one step) โดยใช้เครื่อง LightCycler 96 system (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) ตามโปรโตคอลของสถาบันโรคติดต่อแห่งชาติ (National Institute of Infectious Disease) ประเทศญี่ปุ่น (30) ชุดตรวจ One Step TB Green PrimeScript RT-PCR kit II (TaKaRa, Tokyo, Japan) ถูกใช้ในการวัดหาปริมาณของ *GAPDH* ซึ่งใช้สำหรับการทำ normalization โปรแกรมที่ใช้สำหรับ *GAPDH* ได้แก่

5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (forward) และ

5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (reverse)

การตรวจวิเคราะห์ Cytokine

การตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจ Bio-Plex Pro human cytokine 27-plex assay (Bio-Rad) ถูกใช้ในการวัดหาปริมาณของ cytokine ใน supernatant ของ macrophage เครื่อง Bio-Plex 200 Systems (Bio-Rad) ถูกใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 9.1.1. ค่า *P* value ได้รับการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญ ถ้าหากว่าต่ำกว่า 0.05 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติที่เราใช้และจำนวนของ biological replicate รวมทั้งของ technical replicates สำหรับแต่ละการทดลองได้อธิบายไว้ในคำอธิบายสัญลักษณ์ของแต่ละภาพประกอบ