

• 个案分析 •

1 例 COVID-19 患者的实验室指标变化及意义^{*}

宣彬彬¹, 孙寒晓¹, 武娇祥¹, 周丽达¹, 陈佳婕¹, 谭美玉¹, 姜洁¹, 李阳², 陶生策², 盛慧明^{1△}

1. 上海交通大学医学院附属同仁医院检验科, 上海 200336; 2. 上海交通大学

系统生物医学研究院系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 淋巴细胞亚群; 细胞因子; 血清学抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.030

中图法分类号: R563.1

文章编号: 1673-4130(2021)09-1149-04

文献标志码: C

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是单链正义 RNA 病毒,属于 β 类冠状病毒,与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)同种属^[1-2]。现有的研究结果显示,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的传染性和病死率都非常高,围绕该病毒的诊断和治疗亟待突破。尤其是对病毒感染免疫的研究将在实验室诊断和疫苗的研发中发挥至关重要的作用。本文就上海首例 COVID-19 患者整个诊治过程中的实验室指标变化进行报道,为 COVID-19 的诊断治疗提供信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集上海交通大学医学院附属同仁医院收治的上海首例 COVID-19 患者门诊及住院治疗期间的相关实验室指标。患者,女,57 岁,汉族。出生地湖北。因“发热 5 d,伴干咳加重 2 d”于 2020 年 1 月 16 日收入上海交通大学医学院附属同仁医院,经过治疗后于 2020 年 2 月 24 日康复出院并随访。该患者在入院前 6 天(1 月 10 日)即有临床症状并曾于武汉中医院就诊,本研究中将此作为疾病发生第 1 天(D1),以此类推,至 2 月 24 日出院为 D46。本研究已获医院伦理批准和患者知情同意。

1.2 体格检查 患者体温升高,38.2℃,胸闷,咽部不适,畏寒无寒战,咳嗽,无咳痰,下肢乏力,背部及下肢肌肉酸痛,无呼吸困难,无盗汗,无胸痛,无鼻塞流涕,无头晕、头痛,无皮疹。查体:神志清醒,气平,发育正常,营养良好,急性病容,表情正常,自主体位,正常步态,对答切题,查体合作。脉搏 92 次/分钟,呼吸 24 次/分钟,血压 105/65 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),心率 92 次/分钟,律齐,各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音和额外心音;无心包摩擦音。无水冲脉,无

股动脉枪击音,无毛细血管搏动征。肺部检查:双侧胸廓呼吸运动对称,双侧语颤对称正常,双肺叩诊清音,双肺下叶闻及湿啰音。肝脾肋下未及,双肾区无叩击痛,肢体无水肿及皮疹。X 线片检查结果:两肺多发炎症。

1.3 检测方法

1.3.1 标本采集 患者的血液标本均由临床护士采集,根据检测项目不同采用不同抗凝剂真空采血管,并经过离心后留取标本进行检测。咽拭子等呼吸道标本则由临床医生采集并及时送检。

1.3.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 FACS CantoTM II 流式细胞仪、MultitestTM 6-color TBNK 试剂盒、绝对计数管;青岛瑞斯凯尔 12 项细胞因子检测试剂盒;深圳迈瑞 BC-5390 全自动五分类血液细胞分析仪;德国西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪;丹麦雷度 ABL90 血气分析仪;北京热景生物技术有限公司 SARS-CoV-2 IgM 抗体检测试剂盒(胶体金免疫层析法);北京新兴四寰生物技术有限公司 SARS-CoV-2 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)。

1.3.3 检测项目 本次研究针对患者不同时间节点的标本进行检测,包括血常规、凝血 6 项等常规项目检测,并对患者的淋巴细胞亚群分布、炎症指标及细胞因子进行连续监测。此外,也将患者的咽拭子、痰液、肺泡灌洗液等标本送往上海市疾病预防控制中心病原生物检定所病毒检测实验室进行 SARS-CoV-2 核酸检测。该患者 D8 血浆标本在上海交通大学医学院附属同仁医院 PCR 实验室采用圣湘生物(长沙)新型冠状病毒检测试剂盒进行核酸检测。并将患者血清标本送至上海交通大学系统生物医学研究院通过蛋白芯片检测患者血清中 SARS-CoV-2 的 S1 蛋白和 N

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81672083、81702071)。

[△] 通信作者, E-mail: shm2783@shtrhospital.com。

本文引用格式:宣彬彬,孙寒晓,武娇祥,等. 1 例 COVID-19 患者的实验室指标变化及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1149-

蛋白抗体表达情况。

2 结 果

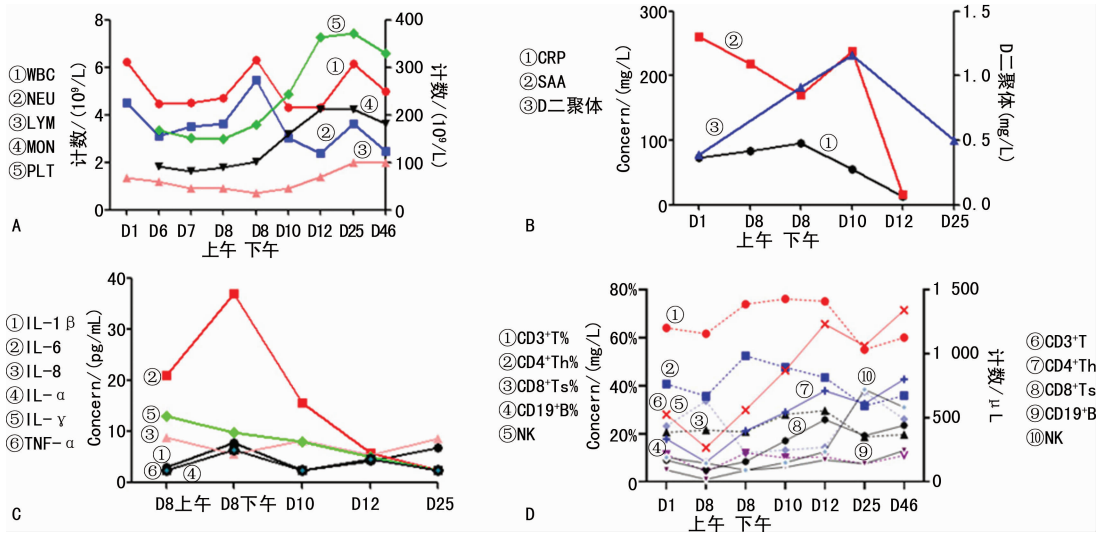
2.1 一般实验室检测结果 本研究收集该例患者在入院诊治过程中不同时间点的血液标本并进行相关检测(表 1)。在感染早期,患者的白细胞略有降低,且淋巴细胞的数量低于正常值,血小板出现过程性消耗后逐步恢复(图 1A)。炎症指标 C 反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白 A(SAA)水平在疾病进展过程中持续保持升高的状态,SAA 水平变化差异较 CRP 水平更加明显,继发纤溶指标 D 二聚体水平有阶段性升

高,与血小板消耗相吻合(图 1B)。为了更好地探究淋巴细胞数降低对患者免疫功能的影响,将淋巴细胞亚群的百分比、绝对计数的结果也进行汇总,发现各细胞亚群数量均降低,并随着患者病情的好转逐渐恢复,而淋巴细胞亚群的百分比则呈波动状态(图 1C)。对该患者外周血的细胞因子分泌情况的检测发现,白细胞介素(IL)-6 等水平均高于正常范围,从折线图中可以看出患者在 D8 存在病情加重的情况,除细胞因子的结果外,该患者的淋巴细胞亚群的分布变化也与这一病程相符(图 1C、D)。

表 1 常规实验室检查结果

指标	正常值	D1	D6	D7	D8 上午	D8 下午	D10	D12	D25
红细胞 (×10 ¹² /L)	3.80~5.10	—	3.71 ^a	3.53 ^a	3.34 ^a	3.48 ^a	3.34 ^a	3.60 ^a	4.17
血红蛋白 (g/L)	115.00~150.00	120.00	119.00	111.00 ^a	106.00 ^a	108.00 ^a	105.00 ^a	114.00 ^a	131.00
总蛋白 (g/L)	65.00~85.00	—	—	69.60	—	69.60	65.00	74.70	—
清蛋白 (g/L)	40.00~55.00	—	—	34.70 ^a	—	35.00	39.00	37.00	—
肌酐 (μmol/L)	41.00~81.00	—	—	49.20	—	47.60	41.00	46.60	—
尿素 (mmol/L)	2.60~8.80	—	—	2.73	—	2.09 ^a	2.40 ^a	1.28 ^a	—
丙氨酸氨基转移酶 (U/L)	7.00~50.00	—	—	32.00	—	37.00	31.00	43.00	—
天门冬氨酸氨基转移酶(U/L)	13.00~35.00	—	—	34.00	—	—	33.00	32.00	—
钾 (mmol/L)	3.50~5.50	—	—	3.37 ^a	—	3.29 ^a	3.40 ^a	3.60	—
钙 (mmol/L)	2.20~2.70	—	—	2.08 ^a	—	2.06 ^a	2.13 ^a	2.18 ^a	—
凝血酶原时间 (s)	9.00~13.00	—	—	11.20	—	11.20	10.90	11.90	—
纤维蛋白原(g/L)	2.00~4.00	—	—	4.80 ^b	—	5.10 ^b	5.20 ^b	4.40 ^b	4.00
D 二聚体(mg/L)	0.00~0.55	—	—	0.39	—	0.91 ^b	1.16 ^b	1.45 ^b	0.50
pH	7.35~7.45	—	—	7.50 ^b	7.46 ^b	—	7.41	7.41	—
二氧化碳分压(kPa)	4.27~6.00	—	—	4.09 ^a	4.60	—	5.14	5.44	—
氧分压(kPa)	11.10~14.40	—	—	10.40 ^a	9.50 ^a	—	7.60 ^a	9.80 ^a	—
二氧化硫(%)	95.00~99.00	—	—	97.50	95.90	—	92.60 ^a	94.90 ^a	—
通气状态	—	—	—	正常	正常	—	正常	正常	—

注: ^a 表示低于正常值, ^b 表示高于正常值;—表示无数据。



注: A 表示白细胞相关检测结果;B 表示 CRP、SAA 及 D 二聚体检测结果;C 表示淋巴细胞亚群及其绝对计数;D 表示细胞因子分泌情况。

图 1 患者部分实验室结果的变化趋势

2.2 分子生物学检测结果 鉴于患者在上海交通大学医学院附属同仁医院就诊时其临床表现和流行病学特点提示可能为 COVID-19 的感染者。故在入院后对其采样,送检进行实时荧光定量 PCR(qPCR)及测序分析,检测结果如表 2 所示,在病情加重时可以在血液标本中检测出病毒的存在。

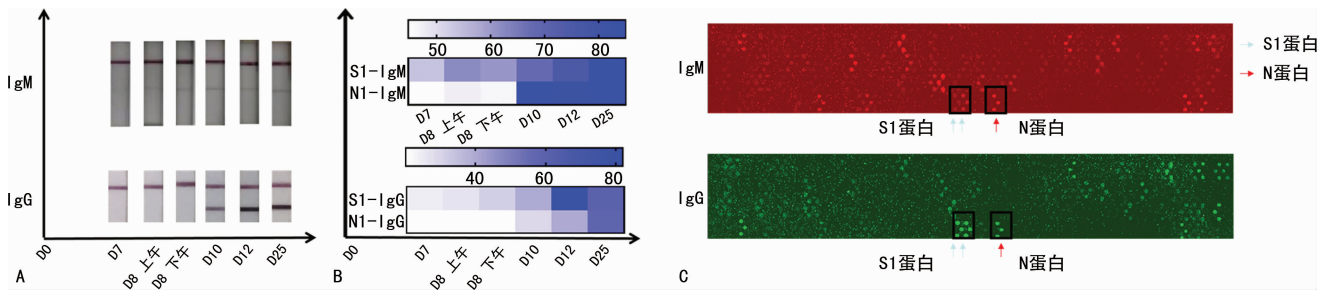
2.3 血清学病毒抗体结果 对患者不同时间点采取的血清标本,检测其 IgM 和 IgG 含量。患者发病后 1 周左右(D8)就可见到 IgM 的表达,而 IgG 抗体则在 D10 才可以用胶体金法检测出来(图 2A)。为了更好地了解患者血清中针对病毒抗体的种类,进行了蛋白芯片检测。根据检测结果可以看出,患者血清中抗 S1

蛋白抗体和抗 N 蛋白抗体的出现时间及含量存在差异,对抗 S1 蛋白抗体而言,无论是其 IgM 还是 IgG 的出现均早于抗 N 蛋白抗体,并且表达量也明显较高(图 2B、C)。

表 2 患者核酸检测相关结果

检测方法	样本类型	D7	D8	D12	D13
qPCR	鼻咽拭子	弱阳性	阳性	阴性	阴性
qPCR	痰液	弱阳性	NT	阴性	阴性
qPCR	血浆	阴性	阳性	阴性	NT
全基因组测序	鼻咽拭子	NT	阳性	NT	NT
全基因组测序	肺泡灌洗液	NT	阳性	NT	NT

注:NT 表示未检测。



注:A表示患者血清标本IgM和IgG胶体金免疫层析法检测结果;B表示患者血清标本SARS-CoV-2的S1蛋白及N蛋白的抗体变化(颜色越深抗体检测含量越高);C表示蛋白芯片结果(D25);该蛋白芯片除包含SARS-CoV-2的S蛋白及N蛋白以外,其余为S蛋白的S1和S2部分切割成的200余条小肽,各蛋白质以斜三点点阵附着在蛋白芯片上。

图 2 患者 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 的检测结果

3 讨 论

COVID-19 病毒潜伏期一般为 3~7 d,但亦可长达 14 d 以上。临床上以发热、乏力、干咳为主要表现。但重症病例多在 1 周后出现呼吸困难,严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍。在发病早期外周血白细胞总数正常或减低。多数患者 CRP 和红细胞沉降率升高,降钙素原水平正常。严重者 D 二聚体水平升高,外周血淋巴细胞进行性减少,与本次研究患者基本相符(图 1A、B)。在本次研究中,该患者于 D1 在武汉因口咽部不适就诊,并在回上海后出现发热症状并且咳嗽加重,故于 D6 前往上海交通大学医学院附属同仁医院就诊。经过对该名患者多个时间节点进行实验室检查,可以看出随着其病程变化,各项指标的变化规律(表 1、图 1)。

该名患者住院期间白细胞总数虽有波动但基本处于正常范围之内,对疾病的诊断及监测意义并不明确,但是淋巴细胞数持续处于下降的状态;CRP 与 SAA 水平在疾病期均高于正常范围,并且与 CRP 水平相比,SAA 水平的增高更加明显,能够更好地反映患者体内的炎症状况;血小板的数量在发病期间也明显低于恢复期,其原因可能是在发病期间体内存在凝

血激活,这也可与其 D 二聚体水平升高的表现相互印证(图 1A、B)。根据患者的病程发展,其在 D8 这一天有明显的症状加重过程,包括出现 D 二聚体水平升高,各淋巴亚群数量明显减低,血气结果异常,并且总 T 细胞,CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的数量大大减少,D8 下午的检测结果仅分别为 267/ μ L,154/ μ L 和 93/ μ L,T 细胞耗竭严重(图 1D)。说明 COVID-19 患者其淋巴细胞及各亚群数量的下降可能与其疾病程度密切相关。而与淋巴细胞亚群绝对计数相比,各淋巴细胞亚群百分比的变化却并不能很好地体现这一点,整体来说变化幅度一般,没有如 CD3⁺ T 细胞绝对数那样在 D8 明显下降,且随着疾病好转不断恢复上升。所以与淋巴细胞亚群相对比例比较,绝对计数的临床价值更大。患者的细胞因子结果尤其是 IL-6 的数值在 D8 明显升高,且患者 D10 的检测结果显示其血氧饱和度仅为 92.6%提示患者病情加重(表 1),故可推测细胞因子的相关指标变化可以更早期地提示患者的免疫状况,反映病情进展,在观测患者疾病程度变化过程中存在预警性的临床价值(图 1C)。目前有相关文献认为,外周血中 T 细胞数量与血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平呈负相关,而该患者在 D8 表现为 IL-6 水平升高,T 细胞数量明显下降^[3](图 1C、D)。而该患者虽

然淋巴细胞数量明显下降, IL-6 水平明显升高, 但未产生细胞因子风暴现象, 疾病得到控制, 并在治疗下逐渐好转至出院。

目前对于 SARS-CoV-2 实验室检查的确诊方式还是病毒核酸检测及 DNA 测序, 常用的核酸检测靶标有 ORF1ab 基因、N 基因、E 基因^[4]。而病毒核酸检测结果的准确性受多种因素影响, 包括采样方式、病毒载量、运输保存及实验操作等。本研究中患者 D7 结果中鼻咽拭子查出 ORF1ab 基因、N 基因、E 基因均为弱阳性, 而痰液标本只有 ORF1ab 基因、N 基因检测出弱阳性, 血液标本未检出。为此 D8 重新采样复查结果阳性, 并且基因测序结果也与其相符。对血液标本进行 ORF1ab 基因、N 基因检测发现 ORF1ab 基因结果阳性(表 2)。说明不同标本类型对检测结果的影响不同, 不同基因片段的检测结果也存在差异。而结合患者在 D8 这一天存在症状加重的情况, 提示可能出现一过性病毒血症, 导致可以在血液标本中检测出 SARS-CoV-2。

人体对于病原体感染的抵抗, 主要依赖自身的免疫系统, 随着病毒感染, 体内逐渐产生针对病原体的抗体对抗病毒损伤。IgM 作为初次体液免疫应答中最早出现的抗体, 能在短时间内起到对机体的保护作用, 而 IgG 出现则略晚。根据胶体金免疫层析法研制生产的试剂盒由于其检测快速的优点可以作为核酸检测的补充, 为临床诊断及治疗提供依据。对于本次研究的患者而言, 其在发病 1 周左右可以检测出 IgM 抗体, 而 IgG 抗体的检出则要晚几天。随着患者临床症状的好转, IgG 抗体的数量明显增加, 并且 IgM 抗体的含量仍然较高^[5], 直到 D46 仍可检出(图 2A)。而一般病毒的 IgM 抗体的持续时间为 2 周到 1 个月, SARS-CoV-2 的 IgM 抗体持续时间较长的原因尚待探究, 但应该警惕病毒感染由急性转为慢性的可能。为了更进一步研究患者体内的抗体变化, 将标本进行了蛋白芯片相关检测。发现患者外周血中刺突蛋白 S1 对应的抗体, 无论是 IgM 还是 IgG 均早于核心蛋白 N 对应的抗体。而 N 蛋白对应的抗体, IgM 和 IgG 这两种抗体出现的时间十分接近, 并且含量较高(图 2B、C)。由此可见, SARS-CoV-2 的 S 蛋白抗体在监测病毒早期诊断上面的价值要优于 N 蛋白抗体, 并且

已有相关研究证明 SARS-CoV-2 可以通过 S 蛋白与 ACE2 受体结合参与病毒侵入细胞内部的生物学过程^[6]。而通过蛋白芯片的结果可以发现, S 蛋白内的很多小肽也可以和患者血清标本中的抗体结合, 说明 SARS-CoV-2 的 S 蛋白上存在丰富的抗原表位, 在实际检测中需要考虑 S 蛋白抗体假阳性的可能。

从上海首例 COVID-19 的整个收治过程中, 对患者体内免疫细胞和细胞因子指标的变化有了一个动态、系统性的观察, 发现淋巴细胞亚群绝对计数及细胞因子结果对其疾病进程的发展有着重要的提示作用。血清抗体的动态观察发现 COVID-19 患者体内产生的 S1 和 N 蛋白的 IgM、IgG 抗体的出现时间、持续时间及表达强度存在差异, 但如何更好地诊断和治疗 SARS-CoV-2 感染, 仍有待继续扩大样本量进行更进一步的研究。

参考文献

- [1] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(1223): 497-506.
- [2] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3): 2000045.
- [3] DIAO B, WANG C, TAN Y J, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)[J]. Front Immunol, 2020, 11: 827.
- [4] SHIRATO K, NAO N G, KATANO H, et al. Development of genetic diagnostic methods for detection for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan[J]. Jpn J Infect Dis, 2020, 73(4): 304-307.
- [5] THEVARAJAN I, NGUYEN T O, KOUTSAKOS M, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19[J]. Nat Med, 2020, 26(4): 453-455.
- [6] WANG Q, ZHANG Y, WU L L, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2[J]. Cell, 2020, 181(4): 894-904.

(收稿日期: 2020-09-12 修回日期: 2020-12-25)