



Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study

Lancet Infect Dis 2020

臺北市立聯合醫院教研部
杜戎珪教學主治醫師
教學主治醫師群
邱婷芳主任
璩大成副總院長

Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study

- 病人自行收集**後口咽部唾液檢體**, 能減少醫護人員接觸病人的風險
- **高峰期病毒量**與患者**年紀**呈現**正相關**
- 大部分的COVID-19的患者在症狀出現**10天左右即會產生抗體**
- 即使病人已經產生抗體, 有部分病人在症狀出現20天後, 後口咽部唾液樣本仍然能偵測出病毒的RNA
- COVID-19病人解除隔離的條件是連續2套鼻咽或喉嚨檢體的RT-qPCR結果呈現陰性, 但部分患者在呈現陰性之後, 仍會再度出現陽性反應, 本研究顯示病毒量與抗體反應呈現負相關性, 因此在病人**準備解除隔離時, 應考慮檢測病毒量以及抗體反應**

本篇重點

- 病人自行收集後口咽部唾液檢體, 能減少醫護人員接觸病人的風險
- 高峰期病毒量與患者年紀呈現正相關
- 大部分的COVID-19的患者在症狀出現10天左右即會產生抗體
- 但即使病人已經產生抗體, 大約有1/3的病人在症狀出現20天後, 後口咽部唾液樣本仍然能偵測出病毒的RNA
- COVID-19病人解除隔離的條件是連續2套鼻咽或喉嚨檢體的RT-qPCR結果呈現陰性, 但部分患者在呈現陰性之後, 仍會再度出現陽性反應, 本研究顯示病毒量與抗體反應呈現負相關性, 因此在病人準備解除隔離時, 應考慮檢測病毒量以及抗體反應

前言

- MERS 跟 SARS感染的死亡率都比COVID-19高，但是SARS-CoV-2的傳染力比前兩者快很多
- MERS跟SARS病人的viral load高峰落在出現症狀後的7~10天, 其中SARS病人經過抗病毒藥物治療後viral load即會下降
- 病毒感染的檢驗大多於鼻咽處(nasopharyngeal) 或喉嚨處(throat)採檢,但容易誘發咳嗽或噴嚏,同時產生氣溶膠(aerosol),可能對醫護人員造成危害
- 過去研究發現從唾液採樣跟抽取鼻咽分泌物送檢有高度的相似性

前言

- 本研究之前曾報告過12位從後口咽部(posterior oropharynx), 即 deep throat, 採取唾液作為診斷及監測病毒量的方式
- 本研究採用請COVID-19確診病人自行收集後口咽部的唾液檢體送檢測病毒量的方式,減少醫護人員與病人的接觸機會
- 本研究同時也測量病人的血中抗體濃度做為比對

方法

(1)病人來源:

- 招募住在Princess Margaret Hospital 及 Queen Mary Hospital的COVID-19確診病患
- 病患起初的確診方式是採用鼻咽或是痰液檢體, 並送到香港的公共衛生實驗中心檢測

方法

(2) 檢測步驟

- 所有病人皆須於早上, 在刷牙跟吃早餐之前, 先收集從後口咽部來的唾液 (即清喉嚨後咳出唾液)
(因為早上此處的唾液會混和到鼻咽部流下來的分泌物, 以及晚上睡覺時經纖毛運動從氣管深處推擠出來的分泌物)
- 若病人是插管的狀態, 則抽取氣管內管的痰液代替
- 每個病人同時檢測血清中病毒抗體的濃度
- 若病患需要氧氣輔助, 需要在ICU照顧, 或是死亡, 則定義為「嚴重」

方法

(3)病毒檢測方式

- 使用reverse transcriptase quantitative PCR (**RT-qPCR**) 檢測SARS-CoV-2 RNA-dependent-RNA-polymerase-helicase gene region
- 使用**EIAs**檢測SARS-CoV-2 nucleoprotein(NP) 及 spike protein receptor binding domain (RBD)的存在
- 使用**Western blotting**做nucleoprotein(NP) 及 spike protein receptor binding domain (RBD)的純度分析
- 其他檢測包括:microneutralisation assays, virus culture, whole genome sequencing

結果

	Severe disease (n=10)	Mild disease (n=13)	p value
Age, years	66 (39-75)	56 (37-75)	0.10
Sex			
Female	4 (40%)	6 (46%)	>0.99
Male	6 (60%)	7 (54%)	..
Chronic comorbidities			
Hypertension	4 (40%)	2 (15%)	0.34
Chronic heart disease	0 (0%)	2 (15%)	0.49
Chronic lung disease	1 (10%)	0 (0%)	0.44
Chronic kidney disease	1 (10%)	0 (0%)	0.44
Diabetes	2 (20%)	2 (15%)	>0.99
Gout	2 (20%)	0 (0%)	0.18
Hyperlipidaemia	2 (20%)	0 (0%)	0.18
None	3 (30%)	9 (69%)	0.10

- 2020/01/22~2/12, 共有30位病人經過篩選, 最後有23位病人納入研究, 包含13位男性與10位女性
- 其中有10個病人是重症, 都需要氧氣輔助呼吸, 另外13個病人則是輕症
- 平均年齡: 62yr(37~75)
- 其中11人(48%) 有慢性病, 以高血壓最為常見
- 嚴重患者有慢性病的比輕症者多 (70% v.s. 31%)

結果

Presenting symptoms			
Fever	10 (100%)	12 (92%)	>0.99
Chills	2 (20%)	2 (15%)	>0.99
Dyspnoea	4 (40%)	0 (0%)	0.024
Cough	1 (10%)	4 (31%)	0.34
Runny nose	1 (10%)	1 (8%)	>0.99
Blocked nose	0 (0%)	1 (0%)	>0.99
Sore throat	1 (10%)	0 (0%)	0.44
Chest discomfort	1 (10%)	0 (0%)	0.44
Nausea	1 (10%)	0 (0%)	0.44
Diarrhoea	2 (20%)	0 (0%)	0.18
Myalgia	2 (20%)	0 (0%)	0.18
Malaise	2 (20%)	1 (8%)	0.56
Duration of symptoms before admission, days	4 (0-13)	4 (0-7)	0.41

- 最常見的症狀如下：
發燒22人(96%)，
咳嗽 5人(22%)，
寒顫4人(17%)，
呼吸喘4人(17%)
- 發病到住院的平均時間是
4天(0~13)

結果

Blood tests on admission

Haemoglobin, g/dL	12.8 (11.6–14.5)	13.5 (10.1–15.2)	0.69
Haemoglobin <13.7 g/dL (male) or <11.9 g/dL (female)	4 (40%)	6 (46%)	>0.99
Total white blood cell count, $\times 10^9$ per L	5.1 (2.4–10.4)	4.9 (3.3–8.1)	0.83
Total white blood cells < 3.7×10^9 per L	2 (20%)	2 (15%)	>0.99
Neutrophil count, $\times 10^9$ per L	3.6 (1.3–9.5)	3.8 (2.0–5.2)	0.78
Neutrophils > 5.8×10^9 per L	3 (30%)	0 (0%)	0.068
Lymphocyte count, $\times 10^9$ per L	0.65 (0.30–1.90)	1.03 (0.57–2.25)	0.088
Lymphocytes < 1.0×10^9 per L	8 (80%)	5 (38%)	0.090
Platelet count, $\times 10^9$ per L	170 (92–313)	182 (144–356)	0.34
Platelets < 145×10^9 per L	4 (40%)	1 (8%)	0.13
Sodium, mmol/L	138 (128–142)	139 (134–142)	0.38
Sodium <136 mmol/L	4 (40%)	1 (8%)	0.13
Potassium, mmol/L	3.7 (3.1–5.3)	3.8 (2.8–4.3)	0.74
Potassium <3.4 mmol/L	2 (20%)	2 (15%)	>0.99
Urea, mmol/L	3.9 (3.3–9.4)	4.2 (2.1–9.9)	0.74
Urea >7.4 mmol/L	2 (20%)	1 (8%)	0.56
Creatinine, $\mu\text{mol/L}$	76 (46–129)	62 (54–126)	>0.99
Creatinine >110 $\mu\text{mol/L}$	1 (10%)	1 (8%)	>0.99
Alkaline phosphatase, U/L	74 (56–149)	60 (38–118)	0.026
Alkaline phosphatase >97 U/L	2 (20%)	1 (8%)	0.56
Alanine aminotransferase, U/L	32 (16–88)	26 (9–133)	0.56
Alanine aminotransferase >53 U/L	1 (10%)	3 (23%)	0.60

- 嚴重病人ALT明顯比輕症病人高 (74U/L v.s. 60U/L)
- 嚴重病人較多有lymphopenia 跟neutrophilia
- 15位(65%)CXR有異常
- 17位(74%)CT可以看到ground-glass opacities
- 有18位(78%) 病人有接受 Lopinavir–ritonavir 治療, 有些人有合用 ribavirin 或 interferon beta 1b

結果

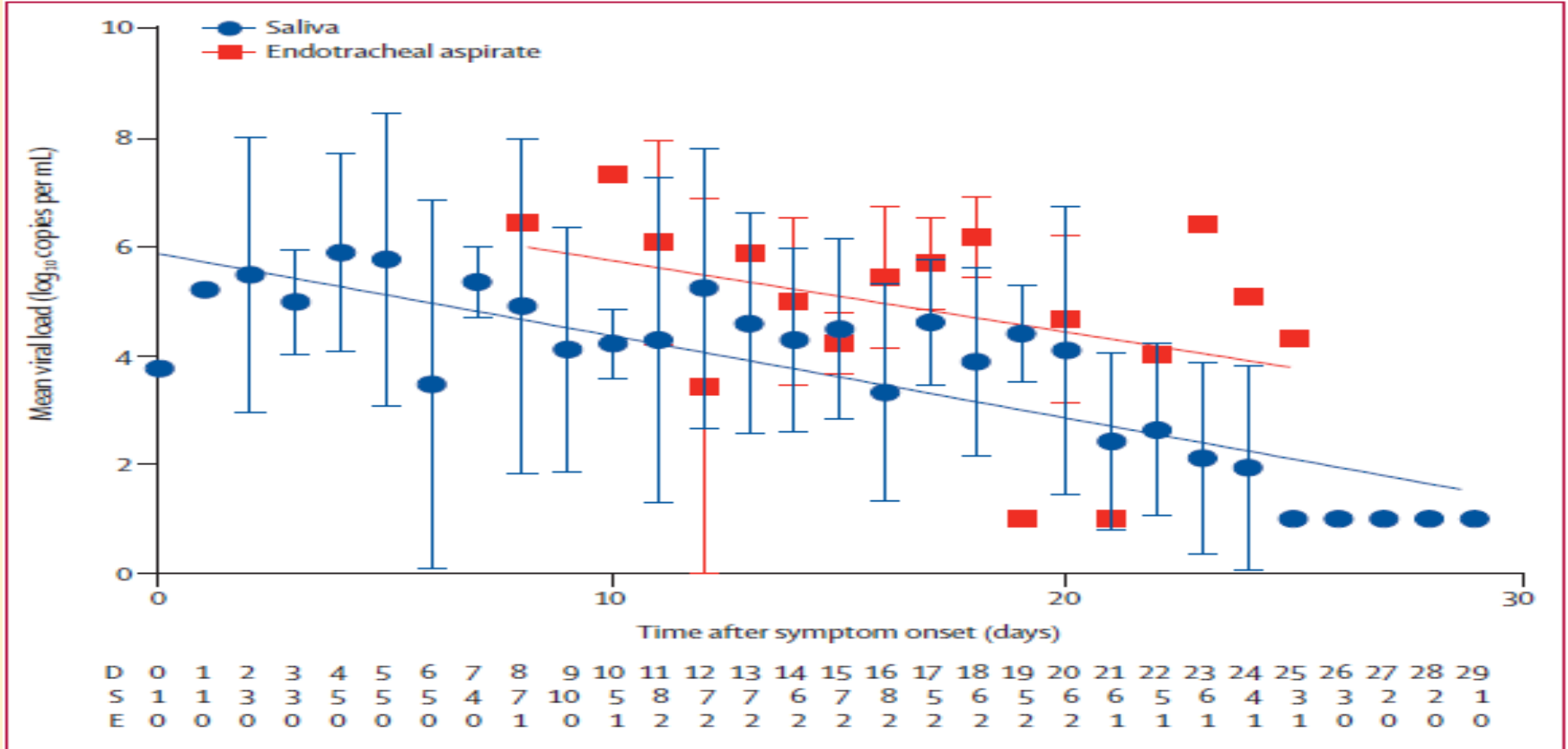
	Severe disease (n=10)	Mild disease (n=13)	p value
(Continued from previous page)			
Viral load in respiratory tract specimens			
Initial viral load, log ₁₀ copies per mL (IQR)	6.17 (4.18–7.13)	5.11 (3.91–7.56)	0.56
Peak viral load, log ₁₀ copies per mL (IQR)	6.91 (4.27–7.40)	5.29 (3.91–7.56)	0.52
Viral RNA detection			
≥20 days in saliva*	4 (50%)	3 (23%)	0.35
Blood	3 (30%)	2 (15%)	0.62
Rectal swab†	3 (38%)	1 (14%)	0.57
Urine‡	0 (0%)	0 (0%)	..

Data are n (%) or median (range), unless otherwise stated. For statistical analyses, the Mann-Whitney U test was done for continuous variables and Fisher's exact test was done for categorical variables. *For severe disease, the total number of patients was eight (two patients died <20 days after symptom onset). †For severe disease, samples were available for eight patients; for mild disease, samples were available for seven patients. ‡For severe and mild disease, samples were available for nine patients in each group.

Table: Patients' characteristics, by severity of disease

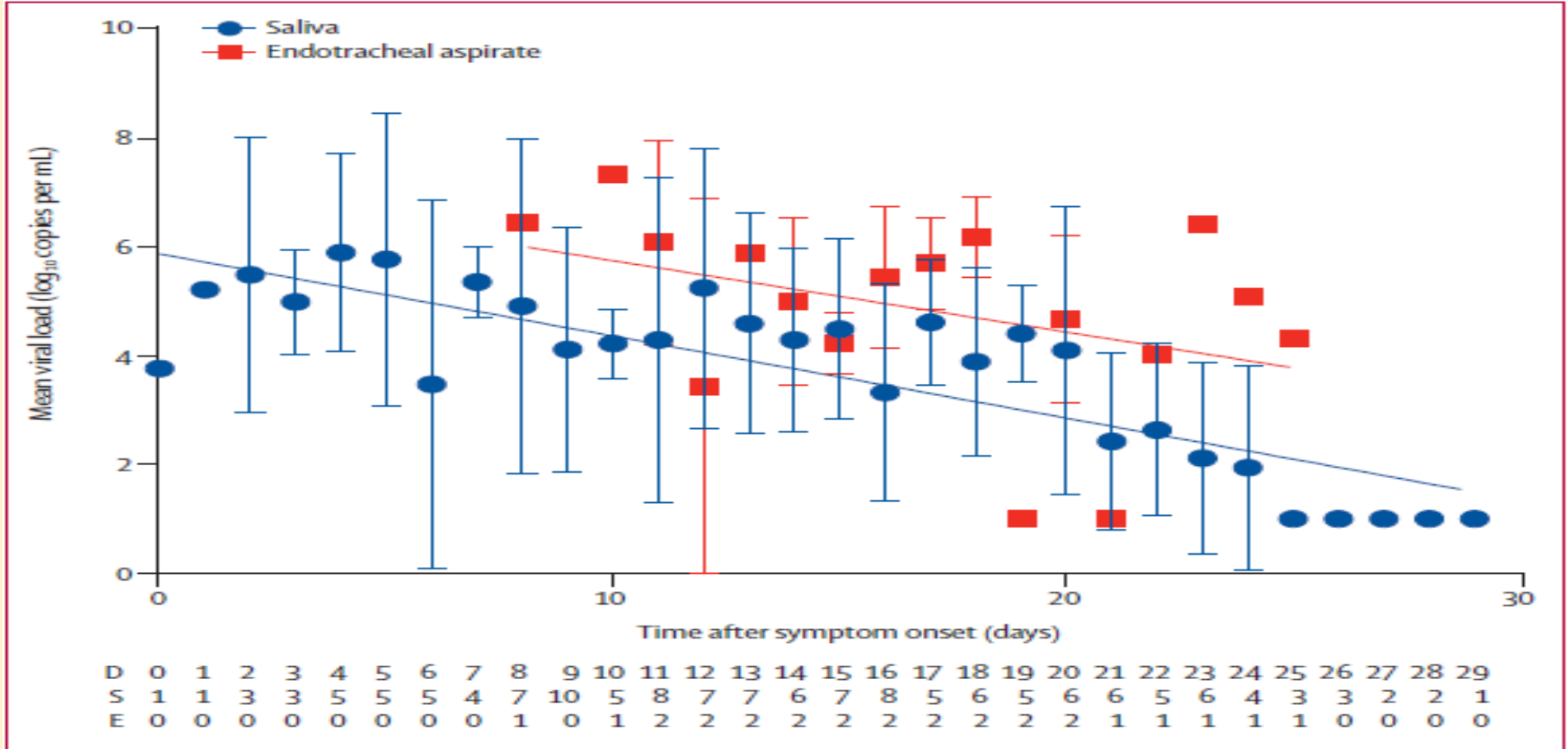
- 5位(22%) 的血液中可測到病毒RNA
- 4位(17%)的肛門拭子可測到病毒RNA
- 尿液檢體中測不到病毒RNA
- 173件呼吸道檢體中, 平均的viral load 是 5.2 log₁₀ copies per mL (IQR 4.1–7.0)
- 有三位患者的唾液中測不到病毒RNA (低於1 log₁₀ copies per mL)

結果



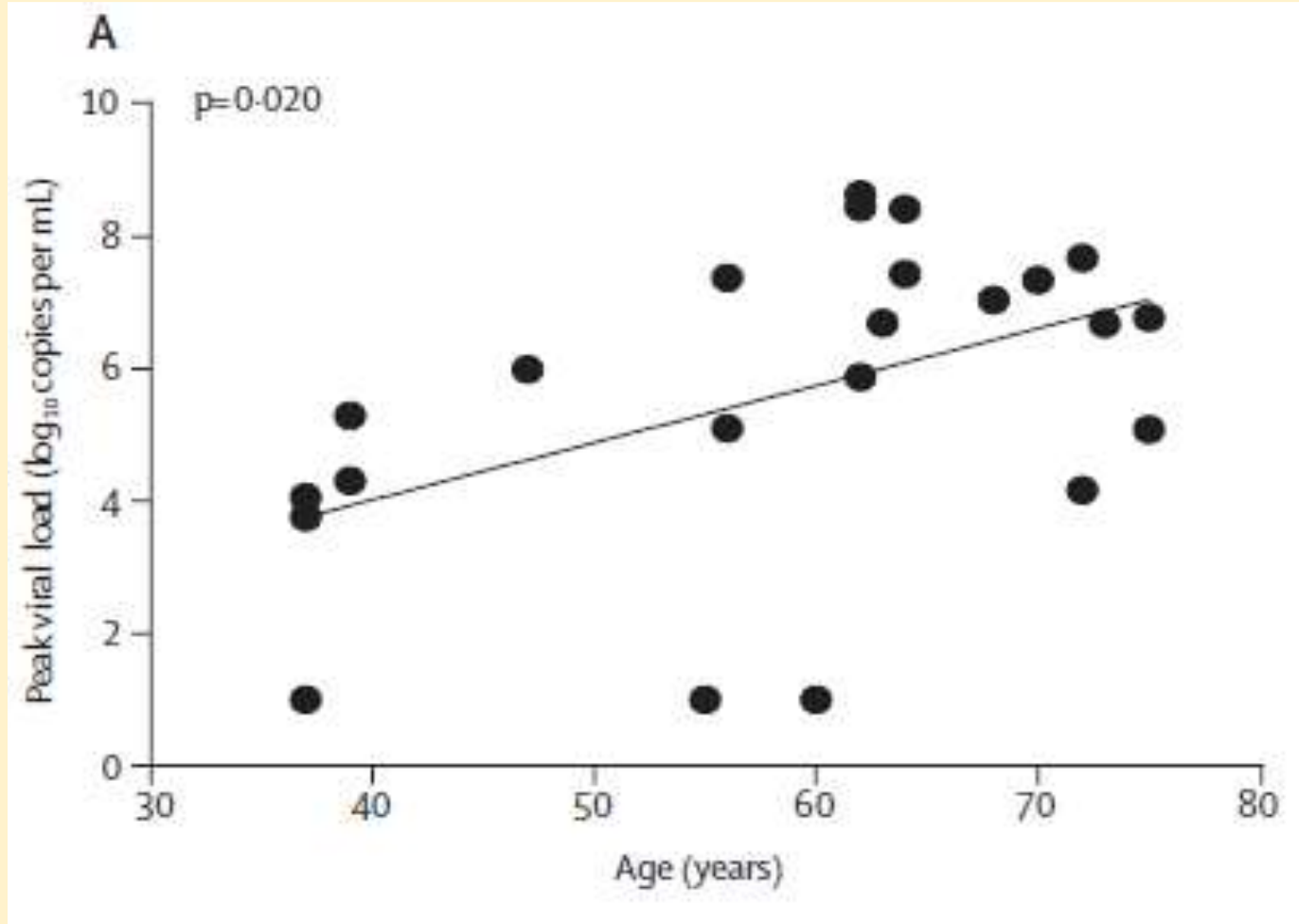
- 唾液中的病毒量在發病後第一週達到最高, 之後便慢慢減少
(slope -0.15 , 95% CI -0.19 to -0.11 ; $R^2=0.71$)
- 氣管內管抽取液的病毒量在發病後第8天後才能取得, 但是之後減少的趨勢較不明顯
(slope -0.13 , 95% CI -0.31 to 0.04 ; $R^2=0.15$)

結果



- 在21位存活的病人中, 有7位(33%)超過20天, 甚至更久, 都還測得到病毒RNA
- 超過20天以上還測得到病毒量跟疾病的嚴重度沒有相關性($p=0.35$)

結果

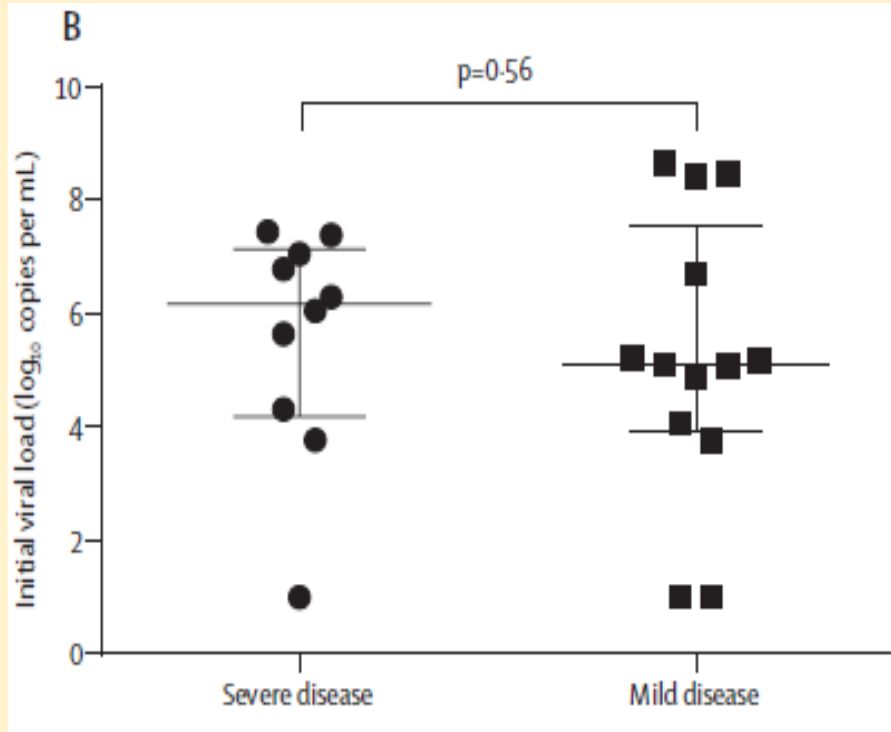


年齡與高峰期病毒量呈現正相關

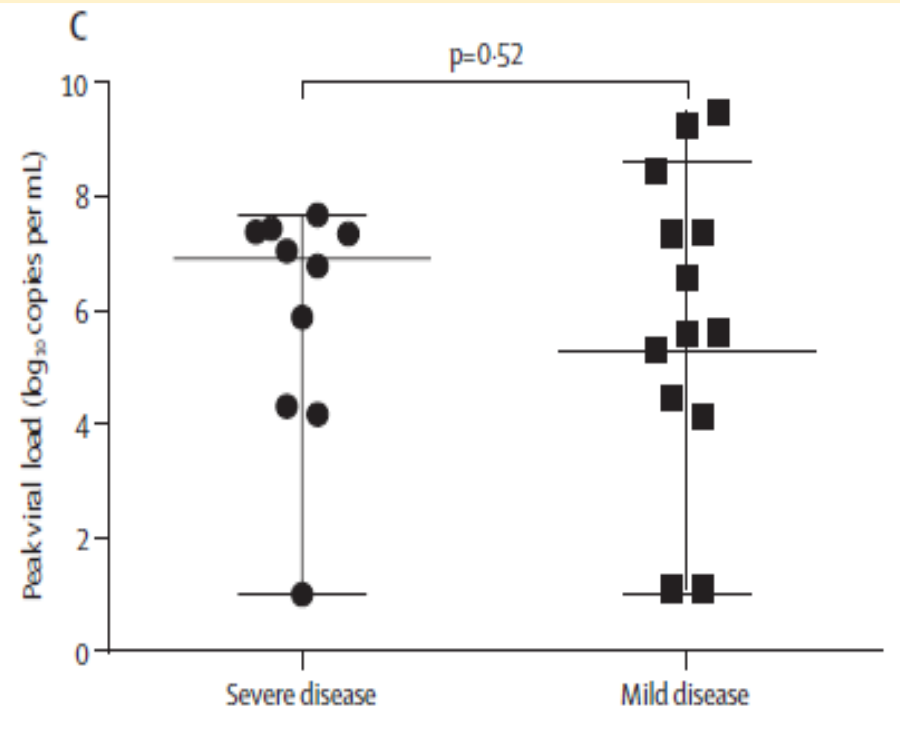
(Spearman's $\rho=0.48$, 95% CI 0.074–0.75; $p=0.020$)

結果

初始期病毒量



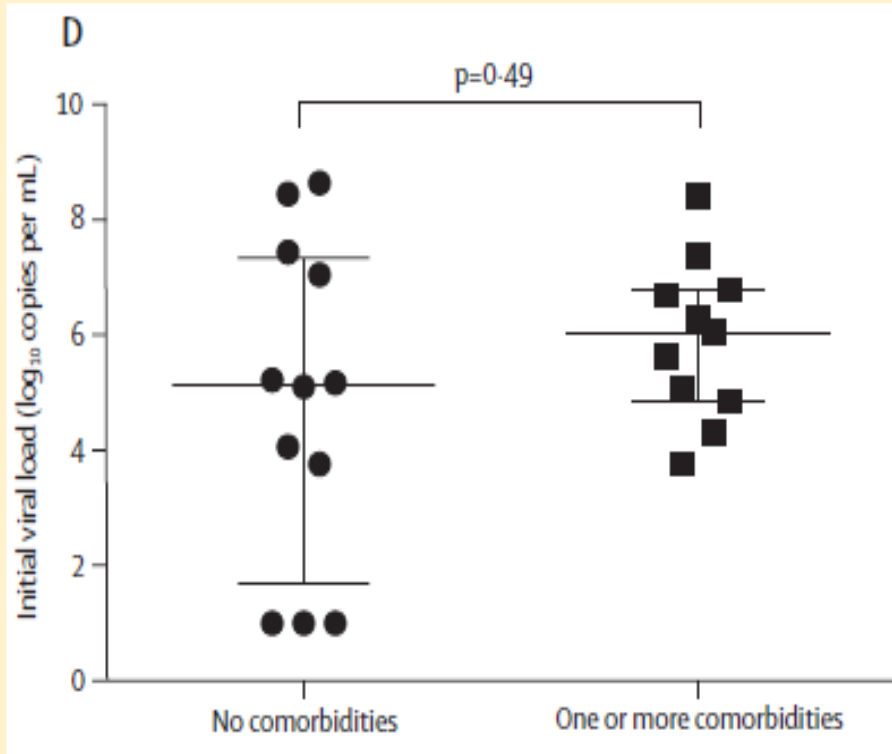
高峰期病毒量



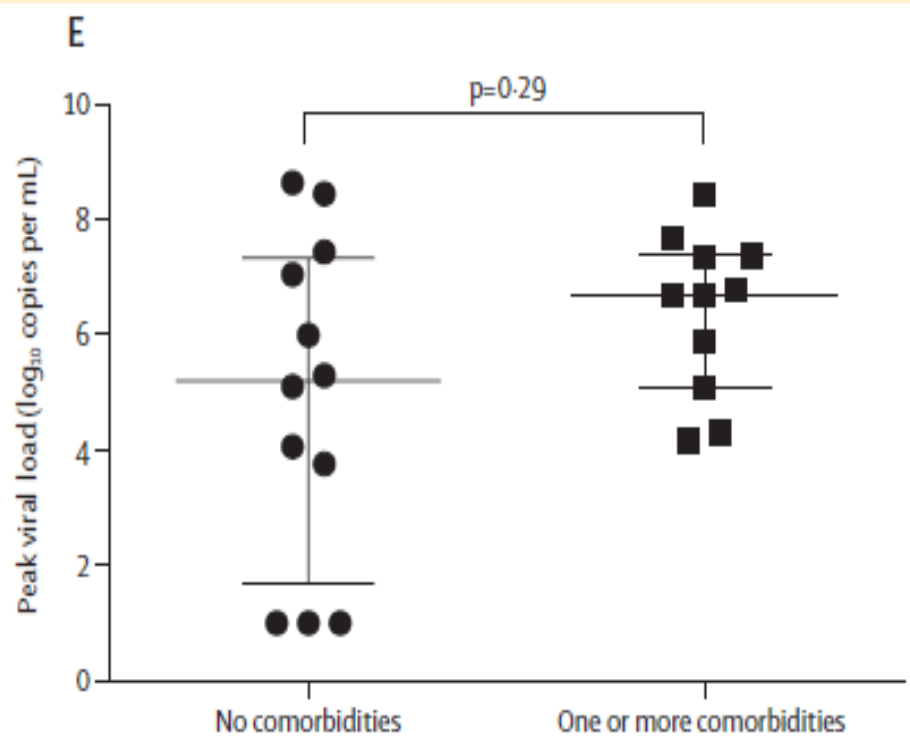
初始期病毒量(中位數)與高峰期病毒量(中位數)在嚴重患者都略高於輕症患者, 但都未達顯著差異 ($p=0.56$, v.s. $p=0.52$)

結果

初始期病毒量

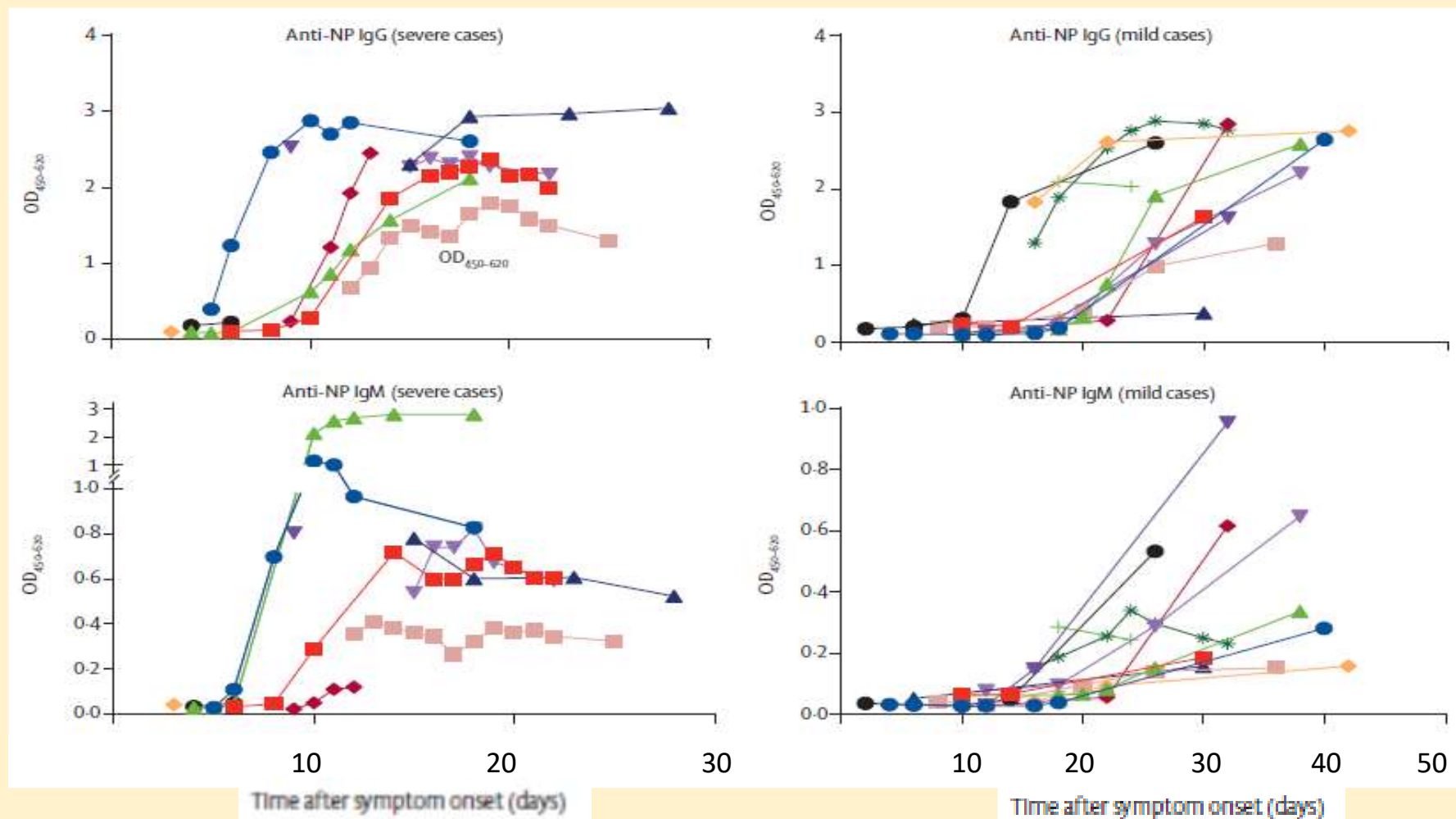


高峰期病毒量



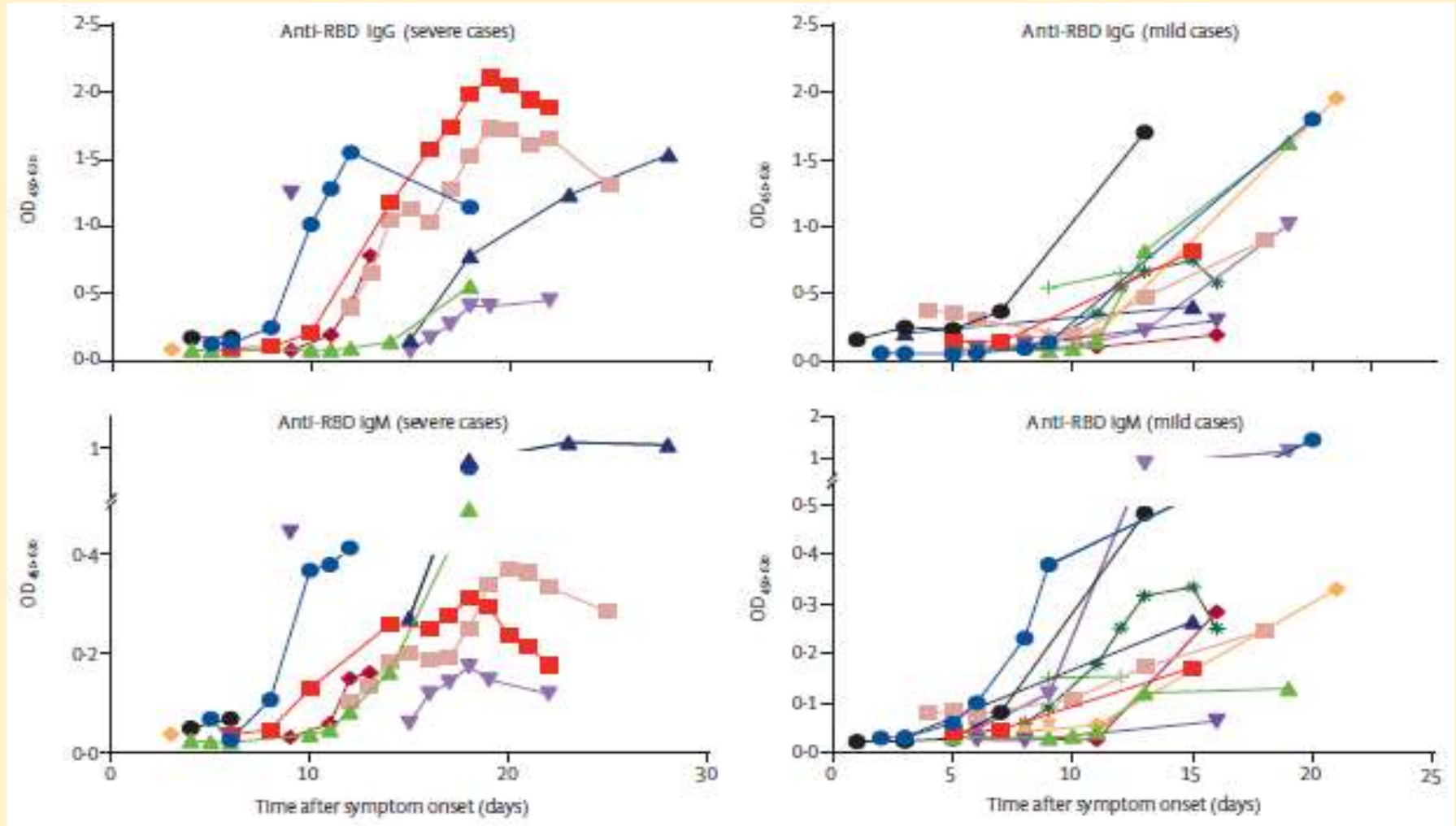
有慢性病跟沒有慢性病的患者, 初始期病毒量(中位數)與高峰期病毒量(中位數)並沒有差別 ($p=0.49$ v.s. $p=0.29$)

結果



23位患者共取得108份血清檢體, 所有病人的anti-NP IgG 或是anti-NP IgM都在發病後10天左右開始上升

結果



所有病人的anti-RBD IgG 或是anti-RBD IgM也都在發病後10天左右開始上升

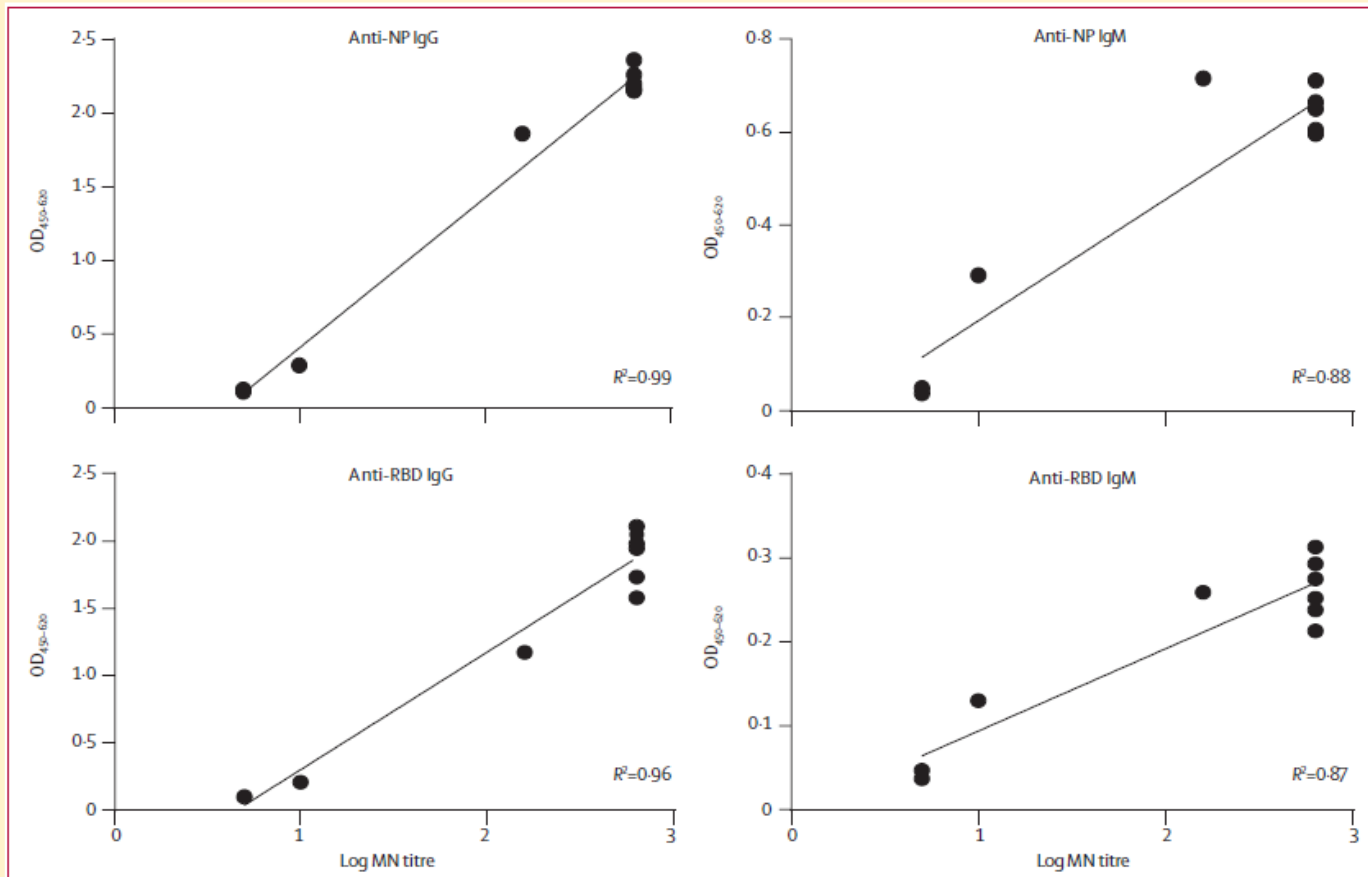
結果

- 比較anti-NP 及 anti-RBD的血清陽性率(seropositivity)
 - ➔多數患者的anti-RBD (包括IgG, IgM) 血清陽性率都比anti-NP(包括IgG, IgM)早出現
IgG: (RBD earlier, 10 [43%] of 23 vs NP earlier, 2 [9%] of 23) , IgM: (RBD earlier, 6 [26%] of 23 vs NP earlier, 4 [17%] of 23)
- 比較IgG及IgM的血清陽性率(seropositivity)
 - ➔不論是anti-RBD或anti-NP, 多數患者的IgG 血清轉換率(seroconversion)都比IgM 早
anti-NP (IgG earlier, 6 [26%] of 23 vs IgM earlier, 1 [4%] of 23) , anti-RBD (IgG earlier, 13 [57%] of 23 vs IgM earlier, 1 [4%] of 23)
- 有16位病人於發病後14天或更久的時間所取的血清檢體顯示
 - anti-NP IgG 血清陽性率為94% (n=15), IgM 為88% (n=14)
 - anti-RBD IgG 血清陽性率為100% (n=16), IgM 為94% (n=15)

結果

微量中和試驗 (microneutralization, 簡稱MN)

- 樣本的微量中和試驗 titre 小於10的, 定義數值為5; 若 titre 大於320的, 定義數值為640
- 每個患著的抗體微量中和試驗會做10次系列性的測試
- 實驗顯示, 不論是anti-RBD或anti-NP, 微量中和試驗(MN) 與 IgG 的相關性都比IgM好



討論

- 大部分的患者在症狀出現10天左右即會產生抗體
- 但即使病人已經產生抗體, 大約有1/3的病人在症狀出現20天後, 後口咽部 (oropharynx) 唾液樣本仍然能偵測出病毒的RNA
- 高峰期病毒量與患者年紀呈現正相關
- SARS-CoV-2的病毒量表現跟流感病毒類似, 都是在症狀初期即可達到高峰 (SARS是10天後, MERS是第2週左右), 這代表SARS-CoV-2可以在症狀很輕微的時候就有高度的傳染力, 所以也能高效率地人傳人而造成群聚感染
- 本研究團隊曾提出合併使用三種抗病毒藥物lopinavir–ritonavir and ribavirin能減少併發症(例如ARDS)或死亡
- Remdesivir (瑞德西偉)可能也有治療COVID-19的潛力

討論

- 過去病人能解除隔離的條件是連續2套鼻咽檢體或是喉嚨拭子檢體的RT-qPCR結果呈現陰性, 但是本研究發現有些人在RT-qPCR呈現陰性的2天之後, 再度出現陽性反應, 因此可以推測病人即使在臨床症狀復原之後, 病毒仍有低度排出的可能性
- 在考量病人能否解除隔離時, 應該考慮監測病毒量(viral load)以及檢測抗體反應, 因為本研究顯示病毒量與抗體反應確實呈現負相關
- 病人的抗體反應多在症狀出現10天後開始上升, 所以在恢復期時收集病人血清檢體會比測RT-qPCR更有用
- SARS-CoV-2的IgG抗體幾乎跟IgM抗體同時出現, 或是更早出現, 不過這項發現也可能是偵測IgM的EIAs敏感度較低的關係

討論

- 血清抗體濃度與臨床症狀嚴重度並未呈現相關性
- 本研究發現抗體濃度與病毒中和反應滴定量(titre)的相關性, 對於疫苗的研發特別重要
- 因為後口咽部(Posterior oropharynx)是鼻咽分泌物, 唾液腺, 還有呼吸道分泌物共同交會的地方, 所以採集此處的唾液能顯示來自上呼吸道及下呼吸道 virus shedding 的情況
- 另一方面, 因為病人於後口咽部採檢的接受度比鼻咽採檢或是喉嚨採檢高, 所以本研究平均每個病人可以收集到7.5份檢體, 數量夠大也有助於統計分析

討論

本研究仍有下列幾項侷限之處

1. 病人數量不夠多, 病毒量與抗體的偵測也非每日檢驗, 所以無法排除可能的干擾因素
2. 約48%的病人有慢性疾病, 遠高於之前一份大型研究的比例, 約24% (註), 雖然本研究發現慢性病患者的anti-RBD IgG濃度較低, 但仍需更多研究去確認
3. 從後口咽部採檢無發區分病毒來自鼻咽還是下呼吸道
4. 有些病人可能無法有效地將痰從喉嚨深部咳出, 因而降低檢測的敏感度
5. 本實驗中檢測SARS-CoV-2的anti-NP抗體與SARS-CoV的NP可能有抗體交叉反應的情況 (因為90%胺基酸序列相似), 另一方面, anti-RBD 抗體對SARS-CoV-2才具有專一性

註: Guan W, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. N Engl J Med 2020; published online Feb 28

延伸閱讀.....

- Zhang W, Du RH, Li B, et al. **Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes.** Emerg Microbes Infect 2020; 9: 386–89.
- Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. **Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China.** N Engl J Med 2020; published online Feb 28.
DOI:10.1056/NEJMoa2002032.
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. **Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.** Lancet 2020; 395: 565–74.