
BASIC LABORATORY ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF COVID 19 PNEUMONIA

Jelena Zdravković

Department of Laboratory Diagnostic, Health Center Vranje, Serbia,
Academy of Applied Technical and Preschool Studies, Department of Vranje, Serbia,
jellena.zdravkovic@gmail.com

Jasmina Todorović

Department of Infectious Diseases, Health Center Vranje, Serbia,
Academy of Applied Technical and Preschool Studies, Department of Vranje, Serbia,
jaselaki@gmail.com

Abstract: Role of laboratory diagnostic tests is not very important for the diagnosis of Covid 19 pneumonia, but also for assessing the severity of the disease, deciding on antibiotic therapy and monitoring the effect of therapy. By monitoring of some basic parameters such as blood count, % of neutrophils, % of lymphocytes, monitoring LDH, CRP and ferritin levels in patients with Covid 19 pneumonia, we could say that these routine analyzes can also be used by the clinician to assess the severity of the clinical disease and these allow clinicians to undertake further therapeutic procedures. The SARS-COV-2 virus causes Covid 19 disease, which is characterized by a wide clinical spectrum. Some patients are completely asymptomatic, some have a mild clinical illness and some patients develop acute respiratory distress syndrome. SARS-COV 2 virus belongs to the group of Corona viruses, similar to the SARS-COV virus that caused the SARS epidemic in 2003. A total of 60 patients with Covid-19 were followed in this study. Following laboratory parameters were analyzed: complete blood count, CRP, LDH, ferritin. Total leukocyte counts, % of neutrophils, CRP, LDH, and ferritin were elevated, and % of lymphocytes were statistically decreased for patients with pneumonia on oxygen therapy compared to patients with pneumonia who did not require oxygen, indicating that patients with severe clinical illness require frequent clinical reevaluations in order to determine, which patients need intensive care treatment. Progressive leukocytosis with an increasing neutrophil count and declining lymphocytes are prognostically unfavorable factors. Lymphopenia indicates a reduced immune response to the virus present in the body and is not a good prognostic sign in patients with Covid 19. CRP and ferritin values correlate with the degree of inflammation. Significantly elevated levels of ferritin found in the serum of Covid 19 patients indicate an unfavorable prognosis. Biochemical analyzes as complete blood count, LDH, CRP, ferritin are of immeasurable importance in the diagnosis of Covid 19 pneumonia.

Keywords: blood count, CRP, LDH, ferritin

LABORATORIJSKE ANALIZE U DIJAGNOZI I PROGNOZI COVID 19 PNEUMONIJE

Jelena Zdravković

Služba za laboratorijsku dijagnostiku, Zdravstveni centar Vranje, Srbija,
Akademija tehničko-vaspitačkih strukovnih studija, Odsek Vranje, Srbija, jellena.zdravkovic@gmail.com

Jasmina Todorović

Odeljenje za infektivne bolesti, Zdravstveni centar Vranje, Srbija,
Akademija tehničko-vaspitačkih strukovnih studija, Odsek Vranje, Srbija, jaselaki@gmail.com

Rezime: Uloga laboratorije u dijagnozi Covid 19 pneumonije nije bila samo u inicijalnom određivanju osnovnih laboratorijskih parametara bitnih za potvrđivanje dijagnoze, već i za procenu težine bolesti, za donošenje odluke o primeni antibiotske terapije kao i za praćenje efekta terapije. Praćenjem najosnovnijih parametara kao što su kompletna krvna slika, % neutrofilnih leukocita, % limfocita, praćenjem nivoa LDH, CRP i feritina kod dve grupe pacijenata sa Covid 19 pneumonijom i činjenicom da postoji statistički značajna razlika u odnosu na referentne vrednostikoja koja može da ukaže na tok bolesti, možemo da kažemo da i te rutinske analize mogu kliničaru da posluže za procenu težine kliničke slike i pravovremenog preduzimanja daljih terapijskih procedura. Virus SARS-COV-2 uzrokuje bolest Covid 19 koja se karakteriše širokim kliničkim spektrom. Neki pacijenti su kompletno bez simptoma, neki imaju lakšu kliničku sliku, dok neki pacijenti razvijaju akutni respiratorni distres

sindrom. SARS-COV 2 virus pripada grupi Corona virusa, sličan je SARS-COV virusu koji je uzorkovao epidemiju SARS-a 2003. godine.

U ovom radu je praćeno ukupno 60 pacijenata sa Covid-19. Analizirani su sledeći laboratorijski parametri: kompletna krvna slika, CRP, LDH, feritin. Vrednosti ukupnog broja leukocita, % neutrofila, CRP, LDH i feritina su povišene, a % limfocita statistički sniženi za pacijente sa upalom pluća na kiseoničnoj terapiji u odnosu na pacijente sa pneumonijom koji nisu zahtevali primenu kiseonika što nam ukazuje da pacijenti sa teškom kliničkom slikom zahtevaju stalan nadzor zbog eventualnog transporta u jedinice intenzivne nege. Progredijentna leukocitoza sa stalno rastućim brojem neutrofila i opadanjem limfocita su prognostički nepovoljni faktori. Limfopenija ukazuje na smanjen imunološki odgovor na prisutan virus u organizmu i kod pacijenata sa Covid 19 nije dobar znak. Vrednosti CRP i feritina koreliraju sa stepenom izraženosti inflamacije. Signifikantno povišene vrednosti feritina nađene u serumu Covid 19 pacijenata ukazuju na nepovoljnu prognozu. Biohemijske analize, pa čak i one rutinske, kompletne krvna slika, LDH, CRP, feritin imaju nemerljiv značaj u dijagnostici Covid 19 pneumonije.

Ključne reči: krvna slika, CRP, LDH, feritin

1. UVOD

Idektifikacijom i sekvenciranjem virusa SARS-COV i SARS-COV 2 utvrđeno je da imaju 80% istu strukturu (1,2). Virion je prečnika 50-200 nm i kao i ostali koronavirusi, sadrži 4 strukturalna proteina i to: S-protein (spike), M-protein (membrane), E-protein (envelope) i N-protein (nukleokapsid). Upravo je S protein taj koji je odgovoran za napad na ćelije domaćina i za fuziju sa membranom istog (2,3). Ulazni receptor koji koristi SARS-COV 2 je receptor za angiotenzin-konvertujući enzim 2 (ACE2-receptor) (4). ACE2 receptor je transmembranska metaloperoksidaza tipa 1 i nalazi se u plućima, bubrezima, gastrointestinalnom traktu, u endotelu vaskularnih ćelija i u Lajdigovim ćelijama testisa (5,6). Bitnu ulogu igra proteolitička obrada ovog kompleksa transmembranskom proteazom tipa 2 (TMPRSS2) koja dovodi do cepanja ACE2 receptora i aktivacije S proteina virusa (5,6). Obzirom da S-protein igra glavnu ulogu u procesu ulaska u ćeliju verovatno je došlo do mutacije u S proteinu i nukleokapsidnom N proteinu koji omogućava da se SARS-COV 2 tako čvrsto veže za ćeliju i razvije infekciju (7). Za ulazak SARS-COV 2 u ćeliju domaćina, njegov S se mora otopiti ćelijskim proteazama na 2 mesta da bi se virusne i ćelijske membrane mogle spojiti (8). Kod virusa SARS-a to odvajanje ide teško, kod virusa SARS-COV 2 most koji spaja dve subjedinice razgrađuje enzim furin. Kako su pluća bogata furinom, furin razotkriva i stabilizuje virus povećavajući mu virulenciju, a i patogeni efekat na plućima.

SARS-COV 2 pogađa ljude na različit način. Različitu kliničku sliku pokazuju Covid pozitivni pacijenti. Klinički se Covid 19 klasifikuje u lakše slućajeve, slućajeve srednje težine sa snimkom pluća koji ukazuje na pneumoniju, teške slućajeve, gde je frekvencija disanja >30 udisaja u min, saturacija $O_2 \leq 94\%$ pri mirovanju, parcijalni arterijski pritisak O_2 / koncentracija O_2 (FIO₂) ≤ 300 mmHg uz infiltraciju pluća $>50\%$ i kritične slućajeve - pacijenti sa teškim oblikom respiratornog distres sindroma, sa mogućnošću razvoja septičkog šoka i sindromom multiorganske disfunkcije.

Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC), je 26.3.2020 godine publikovala informativni vodić za Covid 19, sa listom preporučenih laboratorijskih testova za dijagnozu obolelih od Covid 19, kao i preporuke za određivanje pojedinih parametara tokom trajanja bolesti (9).

Kada govorimo o laboratorijskim ispitivanjima možemo slobodno reći da je laboratorija predstavljala bitnu kariku u lancu aktivnosti potrebnih za dijagnozu i prognozu Covid 19 pacijenata, naroćito pacijenata sa srednje teškom i teškom kliničkom slikom. Covid 19 pneumonija je bila veliki izazov za laboratorijsku dijagnostiku.

Uloga laboratorije u dijagnozi Covid 19 pneumonije nije bila samo u inicijalnom određivanju osnovnih laboratorijskih parametara bitnih za potvrđivanje dijagnoze pneumonije, već i za procenu težine bolesti, za donošenje odluke o primeni antibiotske terapije, kao i za praćenje efekta terapije.

Lista preporučenih osnovnih laboratorijskih testova kod Covid 19 pneumonije - minimum laboratorijske obrade u našoj laboratoriji: kompletne krvne slike, LDH, CRP, feritin.

Određivanje kompletne krvne slike kod covid 19 pneumonije podrazumevalo je određivanje ukupnog broja leukocita sa diferencijacijom na subpopulaciju leukocita, (% neutrofila, % limfocita, % monocita, % eozinofila, % bazofila, % LUC - Large uncolored cells), određivanje broja trombocita i trombocitnih parametara MPV, PDW, određivanje broja eritrocita, merenje hemoglobina, određivanje hematokrita, MCV, MCH, MCHC, RDW.

Određivanje enzima Laktat dehidrogenaze - LDH je enzim koji je veoma rasprostranjen u organizmu čoveka, uključujući srce, bubrege, skeletne mišiće, pluća, eritrocite. Određivanje ukupnog LDH ima veliki značaj kod pacijenata obolelih od pneumonije i njegovo povećanje kao nespecifićnog markera može u kombinaciji sa drugim markerima i sa kliničkom slikom da služi za dijagnozu i praćenje pacijenata obolelih od Covid 19.

Određivanje markera inflamacije - CRP i feritina. CRP-kao pozitivnog reaktanta akutne faze, tj. reaktanta koji najbrže i najviše raste, ali se i najbrže vraća na normalu kao znak uspešne terapije. Određivanje feritina kao reaktanta akutne faze koji takođe raste ali se kasnije vraća na normalu.

2. MATERIJAL I METODE

Praćeni su rezultati 2 grupe pacijenata: u prvoj grupi su bili pacijenti sa srednje teškom kliničkom slikom, pozitivnim PCR ili AG testom na Covid 19, sa radiološkim znacima pneumonije, ali bez kiseonične terapije, oba pola. Drugu grupu su činili pacijenti sa pozitivnim PCR ili AG testom, radiološkim znakovima pneumonije, na kiseoničnoj terapiji kroz nazalni kateter ili masku sa protokom kiseonika 10-15 litara u minuti, takođe oba pola. Praćeni su rezultati 60 pacijenata.

Krv je pacijentima uzorkovana iz kubitalne vene, vakutajner sistemom u odgovarajuće epruvete (hematološka epruveta sa K3 EDTA kao antikoagulantom, serum epruveta sa gelom 5 ml).

Svi parametri su analizirani u bolničkoj laboratoriji ZC Vranje.

Kompletna krvna slika određivana je na automatskom hematološkom analizatoru SIEMENS ADVIA 120. Analizator koristi tehnologiju peroksidaznog bojenja leukocita. Ova tehnologija omogućava dvostruko brojanje ukupnog broja leukocita, što predstavlja unutrašnju kontrolu hematološkog analizatora i proveru kvaliteta samog uzorka. Ova jedinstvena tehnologija bojenja leukocita omogućava diferenciranje leukocita na 6 parametara što kliničaru daje dodatne informacije o subpopulacijama leukocita. Aparat koristi direktno merenje ćelijskog hemoglobina, određivanje broja trombocita, pri čemu se iz ukupnog broja trombocita isključeni mali eritrocitni fragmenti ćelija.

LDH je određivan korišćenjem metode konverzije laktata u piruvat na automatskom analizatoru ABBOTT Alinity C.

CRP je određivan imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru ABBOTT Alinity C.

Feritin je određivan na automatizovanom imunohemijskom analizatoru ABBOTT Alinity I CMIA (Chemiluminescent Micropartikel ImmunoAssay) metodom.

3. REZULTATI

Neutrofilija i limfopenija se javljaju kod obe grupe pacijenata, tj. i kod pacijenata sa srednje teškom i teškom kliničkom slikom. Kod pacijenata sa srednje teškom kliničkom slikom srednja vrednost procenta neutrofila iznosi 77,15 +/- 4,80, a kod pacijenata sa teškom kliničkom slikom srednja vrednost procenta neutrofila 87,40 +/- 4,31. Srednja vrednost procenta limfocita u prvoj grupi iznosi 15,04 +/- 2,65, a u drugoj srednja vrednost procenta limfocita je 6,7 +/- 2,71. Uočavamo da kod prve grupe %limfocita ima manji pad u odnosu na referentnu vrednost nego kod druge grupe pacijenata, tj. pacijenti sa srednje teškom kliničkom slikom imaju manje izraženu limfopeniju. CRP je povećan kod svih pacijenata. Povećanje se beleži i kod pacijenata sa srednje teškom i sa teškom kliničkom slikom. Prva grupa ima povećanje CRP 91,49 +/- 62,72 mg/L, a druga grupa 193,49 +/- 87,73 mg/L.

LDH je povećan kod svih pacijenata, sa time što kod pacijenata bez kiseonične potpore srednja vrednost povećanja LDH iznosi 273,47 +/- 109,59 U/L, a kod pacijenata koji su zahtevali kiseonik 465,95 +/- 229,34 U/L.

Povećanje feritina je evidentno kod svih pacijenata. Srednja vrednost kod prve grupe je 498,5 +/- 167,1 µg/L, a kod pacijenata na kiseoniku 1067,05 +/- 402,06 µg/L.

Istraživanjem smo hteli da ispitamo i da li postoje značajne razlike u ukupnom broju leukocita, vrednostima neutrofila, limfocita, CRP, LDH i feritina u odnosu na pol pacijenata bez obzira kojoj grupi pripadaju pacijenti, tj. bez obzira na težinu kliničke slike. Za ispitivanje razlike u odnosu na pol korišćen je t-test nezavisnih uzoraka. Nivo značajnosti t-testa je veći od graničnog nivoa značajnosti ($p=0.05$) za sve posmatrane parametre na osnovu čega zaključujemo da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na pol u obe ispitivane grupe. Vrednosti neutrofila, LDH, CRP, feritina, povišene su u odnosu na referentne vrednosti i kod muškaraca i kod žena u obe grupe, dok su vrednosti za limfocite ispod referentnih vrednosti i kod muškaraca i kod žena i kod pacijenata obolelih od covid 19 pneumonije bez kiseonične terapije i kod pacijenata koji su na terapiji kiseonikom.

Istraživanjem smo hteli da ispitamo da li postoje značajne razlike u ukupnom broju leukocita, vrednostima neutrofila, limfocita, CRP, LDH i feritina u odnosu na grupu kojoj pripadaju. Za ispitivanje razlike u odnosu na grupu pacijenata korišćen je t-test nezavisnih uzoraka. Nivo značajnosti t-testa je manji od graničnog nivoa značajnosti ($p=0.05$) za sve posmatrane parametre, na osnovu čega zaključujemo da postoji statistički značajna razlika u odnosu na grupu pacijenata. Vrednosti ukupnog broja leukocita, % neutrofila, CRP, LDH i feritina su povišene, a % limfocita statistički sniženi za pacijente sa upalom pluća na kiseoničnoj terapiji u odnosu na pacijente sa pneumonijom koji nisu zahtevali primenu kiseonika što nam ukazuje da pacijenti sa teškom kliničkom slikom zahtevaju stalan nadzor zbog eventualnog transporta u jedinice intenzivne nege.

Tabela 1. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na pol pacijenta

	Muškarci (N=42)	Žene (N=18)	t vrednost	Značajnost (p vrednost)
	Srednja vrednost			
Ukupan broj leukocita	10.02 ± 5.76	10.87 ± 11.03	-0.394	0.695
Vrednosti za neutrofile	81.04 ± 6.55	81.38 ± 7.56	-0.174	0.862
Vrednosti za limfocite	11.64 ± 5.04	11.54 ± 5.03	0.075	0.941
Vrednosti za CRP	140.69 ± 92.78	112.69 ± 77.34	1.123	0.266
Vrednosti za LDH	346.40 ± 182.71	368.05 ± 219.56	-0.392	0.697
Feritin	737.36 ± 410.41	699.41 ± 377.66	0.336	0.738

Tabela 2. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na grupu pacijenta

	Grupa II (N=36)	Grupa III (N=24)	t vrednost	Značajnost (p vrednost)
	Srednja vrednost			
Ukupan broj leukocita	7.79 ± 3.92	14.00 ± 10.10	-2.868	0.008*
Vrednosti za neutrofile	77.15 ± 4.80	87.40 ± 4.31	-8.302	<0.0005*
Vrednosti za limfocite	15.04 ± 2.65	6.47 ± 2.71	12.160	<0.0005*
Vrednosti za CRP	91.49 ± 62.72	193.49 ± 87.73	-5.254	<0.0005*
Vrednosti za LDH	273.47 ± 109.59	465.95 ± 229.34	-3.816	0.001*
Feritin	498.59 ± 167.14	1067.05 ± 402.06	-6.559	<0.0005*

*statistička značajnost na nivou od 0.05

4. DISKUSIJA

Progredijentna leukocitoza sa stalno rastućim brojem neutrofila i opadanjem limfocita su prognostički nepovoljni faktori. Limfopenija ukazuje na smanjen imunološki odgovor na prisutan virus u organizmu i kod pacijenata sa Covid 19 nije dobar znak, jer može ukazivati na opasnost pokretanja tzv. citokinske oluje. Leukocitoza sa neutrofilijom ukazuje na mogućnost razvoja bakterijske infekcije (12). Pretpostavlja se da kod pacijenata sa SARS-COV 2 upravo od moći organizma da mobilise nove limfocite zavisi i samo preživljavanje (13,14). Povećanje nivoa LDH nije parametar samo izolovanog oštećenja pluća, već i marker potencijalne štete nastale na drugim organima i kao nespecifičan marker zajedno sa drugim specifičnijim parametrima može služiti za procenu težine Covid 19 pneumonije. Kao procenu odgovora organizma na inekciju, merenje CRP i feritina, reaktanta akutne faze zapaljenja, kao testova koji su lako dostupni u našoj laboratoriji, ukazuje da vrednosti CRP i feritina koreliraju sa stepenom izraženosti inflamacije. Visoke vrednosti CRP izmerene u našoj laboratoriji poklapaju se sa literaturom (15). Takođe signifikantno povišene vrednosti feritina nađene u serumu Covid 19 pacijenata ukazuju na nepovoljnu prognozu (13).

5. ZAKLJUČAK

Biohemijske analize, pa čak i one rutinske, kompletna krvna slika, LDH, CRP, feritin imaju nemerljiv značaj u dijagnostici Covid 19 pneumonije. One su kliničarima omogućavale inicijalnu procenu statusa bolesnika, dinamičko praćenje toka oboljenja i u korelaciji sa celokupnom kliničkom slikom služile za procenu težine kliničke slike obolelih i eventualnog transporta pacijenata u jedinice intenzivne nege.

LITERATURA

- Bebvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., et al. (2020). The 2019-new coronavirus epidemic: evidence for virus evolution. *J Med Virol.*, 92: 455-9.
- Belouzard, S., Chu, V.C., & Whittaker, G.R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences Apr.*, 106 (14): 5871-5876.
- Henry, B.M. (2020). COVID-19, ECMO, and lymphopenia: a word of caution. *Lancet Respir Med.*, 8(4): e24. doi:10.1016/S2213-2600(20)30119-3.

- Henry, B.M., Santos de Oliveira, M.H., Benoit, S., Plebani, M., & Lippia, G. (2020). Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.*, doi.org/10.1515/cclm-2020-0369
- Information Guide on COVID-19 (2020, March 26). Retrieved from <https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/>
- Jiang, F., Yang, J., Zhang, Y. et al. (2014). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.*, 11: 413–426.
- Kavsak, P.A., de Wit, K., & Worster, A. (2020). Clinical chemistry tests for patients with COVID-19 - important caveats for interpretation. *Clin Chem Lab Med.*, doi.org/10.1515/cclm-2020-0436
- Kavsak, P.A., Mansour, M., Wang, L., Campeau, S., Clark, L., Brooks, D., et al. (2012). Assessing pneumatic tube systems with patient-specific populations and laboratory-derived criteria. *Clin Chem.*, 58: 792–5.
- Kuba, K., Imai, Y., Ohto-Nakanishi, T., & Penninger, J.M. (2010). Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther.*, 128 (1): 119-128.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., et al. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426 (6965): 450-454.
- Lippi, G., & Plebani, M. (2020). The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med.*, doi: 10.1515/cclm-2020-0240
- Lippi, G., & Plebani, M. (2020). Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med.*, Retrieved from <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0198>
- Mandelbaum, R.F. (n.d). "Scientists Create Atomic-Level Image of the New Coronavirus's Potential Achilles Heel". *Gizmodo*. Archived from the original on 8 March 2020.
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., et al. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B.*, doi:10.1016/j.apsb.2020.02.008
- Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579 (7798): 270-273.