

## 6. MARCADORS HEMATOLÒGICS

Ana Sancho Cerro

*Especialista en Anàlisis Clíniques, Facultatiu del Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, l'Hospitalet de Llobregat.*

*Amb el suport de la Secció d'Hematologia de l'ACCLC.*

### 1. Introducció:

La infecció sistèmica per SARS-CoV-2, que causa la malaltia de COVID-19, altera de manera significativa el sistema hematopoètic i hemostàtic. Tant és així que, de les alteracions analítiques que poden objectivar-se en els pacients de COVID-19, algunes de les vinculades al mesurament de l'hemograma, com són la concentració de nombre de limfòcits i de plaquetes, permeten discriminar els pacients amb pitjor evolució de la malaltia. Estudis recents evidencien que l'avaluació de la concentració de limfòcits juntament amb les magnituds relacionades amb l'estat inflamatori (LDH, CRP, PCT, IL-6 i ferritina) permeten estimar la prognosi i eficàcia dels tractaments en els pacients de COVID-19 (1,2).

### 2. Alteracions de les magnituds hematològiques en els pacient amb COVID-19

#### 2.1. Limfopènia:

En el decurs de la COVID-19, a mesura que progressa la virèmia, el SARS-CoV-2 afecta principalment els teixits amb major expressió de receptors ACE2 (pulmons, cor i tracte gastrointestinal). Aproximadament entre el dia 7 i el 14 des de l'inici dels símptomes, s'exacerben les manifestacions clíniques de la malaltia com a conseqüència de l'increment de mediadors inflamatoris i citocines circulants (3). És a partir d'aquest moment quan pot evidenciar-se un descens en la concentració de nombre dels limfòcits. La majoria d'estudis publicats defineixen limfopènia com la concentració de limfòcits inferior a  $1 \times 10^9/L$ .

Tot i que són necessaris més estudis per acabar de filiar l'etiologia d'aquesta limfopènia, algunes de les causes probables que es proposen a la bibliografia són les següents:

- S'ha vist que els limfòcits expressen a la seva superfície receptors ACE2 de manera que el SARS-CoV-2 infecta directament aquestes cèl·lules induint-ne la seva lisi (4).
- La tempesta de citocines es caracteritza principalment per l'increment de la concentració de les interleucines 6, 2 i 7, del factor estimulador de colònies granulocítiques, de l'interferó gamma, la proteïna quimiotàctica de monòcits 1, proteïna inflamatòria macrofàgica 1-a i del factor de necrosi tumoral alfa, que indueixen a l'apoptosi limfocitària (5-7).

- L'activació de les citocines podria anar associada a la disfunció dels òrgans limfoides, com ara la melsa, impeding la recuperació de la concentració limfocitària (8).
- La coexistència d'acidosis làctica, una de les possibles complicacions de COVID-19, pot suposar la inhibició de la proliferació limfocitària (9).

Nombrosos estudis han relacionat el grau de limfopènia observada a l'inici de la malaltia amb un pitjor pronòstic de la mateixa. En una de les primeres sèries publicada als inicis de la pandèmia amb 138 pacients, Wang *et al* descriuen una major limfopènia en els pacients hospitalitzats de major gravetat i una limfopènia sostinguda en aquells pacients amb desenllaç fatal (10). En l'estudi de Zhou F *et al* (11) l'objectivació de limfopènia es relaciona amb un desenllaç fatal de la malaltia, conjuntament amb altres factors de risc com l'edat del pacient o concentracions elevades d'alanina aminotransferasa (ALT), lactat deshidrogenasa (LDH), troponina T d'alta sensibilitat (TNT-hs), creatinina quinasa (CK), Dimer D de la fibrina (DD), ferritina, interleucina 6 (IL-6), temps de protrombina (TP), procalcitonina (PCT).

A la taula 1 es recullen un resum de les publicacions relacionades amb les alteracions quantitatives dels limfòcits descrites en els pacients COVID-19.

## **2.2 Alteracions en les subpoblacions limfocitàries:**

Els limfòcits i les seves subpoblacions tenen un paper rellevant en el manteniment de les funcions del sistema immunitari ja que intervenen en la resposta humoral i citotòxica davant les malalties infeccioses. Com passa en les malalties autoimmunes, una infecció vírica pot causar una alteració en les concentracions de les diferents poblacions limfocitàries (12).

Les molècules de superfície CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 i CD56 identifiquen els limfòcits T-helper (CD3+ CD4+), els T-citotòxics (CD3+ CD8+), els limfòcits B (CD19+) i les cèl·lules NK (CD16+ CD56+).

Si bé com ja s'ha comentat la limfopènia és un tret característic dels pacients amb COVID-19, alguns autors recomanen la monitorització de les subpoblacions limfocitàries per fer el seguiment del tractament i preveure'n la resposta. En l'estudi de Wang *et al* (10) un decrement dels limfòcits CD8+ suposa una pitjor eficàcia terapèutica del tractament antiinflamatori amb corticoides dels pacients amb pneumònia i COVID-19.

## **2.3 Increment de la raó Neutròfils / Limfòcits (NLR)**

Aquest índex, emprat com a marcador d'inflamació sistèmica i infecció, sembla estar incrementat en els pacients amb pneumònia per COVID-19 amb una presentació clínica més severa i desenllaç fatal, en relació als pacients que presenten manifestacions clíniques moderades (NLR 5.5 vs 3.2;  $P < 0.001$ ) (13).

## **2.4 Trombocitopènia**

Una recent metanàlisi de 9 estudis conclou que la trombocitopènia està significativament relacionada amb la severitat de la malaltia COVID-19, i tot i que

entre els diferents estudis analitzats existeix una àmplia forquilla entre les concentracions de plaquetes, en tots ells s'evidencia, però, trombopènies severes en els pacients que no sobreviuen a la malaltia- (14). Altres autors com Qu *et al*/proposen que la identificació d'una elevació de la raó plaquetes/limfòcits pot ser conseqüència d'una major tempesta de citocines per increment de l'activació plaquetària (15).

A la taula 2 es recullen alguns estudis i les principals troballes sobre la concentració de plaquetes i COVID-19.

### **3. Alteracions morfològiques del frotis de sang perifèrica**

#### **3.1 Alteracions morfològiques dels limfòcits**

L'observació de limfòcits d'aspecte reactiu és comú en els frotis de pacients amb infeccions víriques. Tot i que sovint els limfòcits reactius són força pleomorfs, en els frotis de pacients amb COVID-19, poden objectivar-se principalment els següents subtipus (16):

- Limfòcits d'aspecte activat, característicament amb un ampli citoplasma de color blau que s'adhereix a les membranes dels eritròcits adjacents (Imatge 1).
- Limfòcits limfoplasmocitaris, de mida petita, amb un nucli excèntric de cromatina madura i condensada (Imatge 2).

#### **3.2 Alteracions morfològiques dels neutròfils**

S'observen algunes alteracions morfològiques en la granulació citoplasmàtica així com en els nuclis dels neutròfils dels pacients amb COVID. En concret, a la bibliografia revisada s'emfatitza l'observació del reforç de la granulació citoplasmàtica, similar a la de la granulació tòxica (abundant i més intensament tenyida) en coexistència amb zones de citoplasma més opalescent i sense granulació. En una minoria del casos, s'ha pogut observar neutròfils hipogranulats (17).

De les alteracions relacionades amb la segmentació nuclear dels neutròfils, s'observa una major freqüència de bandes i neutròfils hiposegmentats donant lloc a formes pseudo-Pelger (17). Finalment, també es destaca la troballa de cèl·lules immadures com metamielòcits i mielòcits característicament amb granulació atzuròfila (17) (Imatge 3).

#### **3.3 Alteracions morfològiques de les plaquetes**

Les alteracions morfològiques de les plaquetes observades en els frotis de pacients amb COVID-19 fan referència a la seva mida més gran, a la intensitat de la seva granulació així com a la formació de pseudòpodes, independentment del nombre de plaquetes de l'hemograma (17) (Imatge 4).

**Taula 1: Estudis i principals troballes relacionades amb el recompte de limfòcits i COVID-19 (1)**

First author (year)	Region	Study period	Sample size	Categorisation of haematological factors	Main findings
Guan (2020) <sup>16</sup>	552 hospitals in 30 provinces, autonomous regions, and municipalities in mainland China	December 11, 2019 - January 31, 2020	1099	Lymphocytopenia: lymphocyte count of less than 1500 cells/mm <sup>3</sup>	Lymphocytopenia was present in 83.2% of patients on admission. 92.6% (50/54) of patients with the composite primary endpoint (admission to an intensive care unit, use of mechanical ventilation, or death) presented with lymphocytopenia vs. 82.5% (681/825) of patients without the primary endpoint (p=0.056 <sup>a</sup> ). Severe cases presented lymphocytopenia more frequently (96.1%, 147/153) vs. non-severe cases (80.4%, 584/726); p<0.001 <sup>a</sup>
Huang (2020) <sup>17</sup>	Jinyintan Hospital, Wuhan, China	December 16, 2019, to January 2, 2020	41	Low lymphocyte count of <1.0 x10 <sup>9</sup> lymphocytes per litre	85% (11/13) of patients needing ICU care presented low lymphocyte count vs. 54% (15/28) of patients that did not need ICU care (p=0.045).
Wang (2020) <sup>19</sup>	Zhongnan Hospital, Wuhan, China	January 1 to February 3, 2020	138	Lymphocytes treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> per L	ICU cases presented with lower lymphocyte count (median:0.8, IQR: 0.5-0.9) vs. non-ICU cases (median: 0.9, IQR: 0.6-1.2); p=0.03. Longitudinal decrease was noted in non-survivors.
Wu (2020) <sup>20</sup>	Jinyintan Hospital, Wuhan, China	December 25, 2019, to February 13, 2020	201	Lymphocytes treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> /mL in a bivariate Cox regression model	Lower lymphocyte count was associated with ARDS development (HR=0.37, 95%CI: 0.21-0.63, p<0.001 in the incremental model); the association with survival did not reach significance (HR=0.51, 95%CI: 0.22-1.17, p=0.11)
Young (2020) <sup>21</sup>	4 hospitals in Singapore	January 23 to February 3, 2020	18	Lymphocytes treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> per L; lymphopenia was defined as <1.1 x10 <sup>9</sup> /L.	Lymphopenia was present in 7 of 16 patients (39%). Median lymphocyte count was 1.1 (IQR: 0.8-1.7) in patients that required supplemental O <sub>2</sub> and 1.2 (IQR:0.8-1.6) in those that did not; no statistical comparison was undertaken.
Fan (2020) <sup>22</sup>	National Centre for Infectious Diseases, Singapore	January 23 to February 28, 2020	69	Lymphopenia: lymphocyte count of <0.5 x10 <sup>9</sup> /L.	Lymphopenia at admission (4/9 of ICU patients vs. 1/58 non-ICU patients, p<0.001) and nadir lymphopenia during hospital stay (7/9 of ICU patients vs. 1/58 non-ICU patients, p<0.001) were associated with need for ICU.
Yang (2020) <sup>27</sup>	Jinyintan Hospital, Wuhan, China	December 24, 2019, to February 9, 2020	52 critically ill patients	Lymphocytes treated as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L); lymphocytopenia presented but not defined	Lymphocytopenia occurred in 44 (85%) of critically ill patients, with no significant difference between survivors and non-survivors. A numeric difference in lymphocyte count was noted in non-survivors vs. survivors (0.62 vs.0.74).
Zhou (2020) <sup>31</sup>	Jinyintan Hospital and Wuhan Pulmonary Hospital, Wuhan, China	December 25, 2019, to January 31, 2020	191	Lymphocyte counts treated as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L) in a multivariate logistic regression model	Lower lymphocyte count was associated with higher odds of death at the univariate analysis (OR=0.02, 95%CI: 0.01-0.08; p<0.0001); at the multivariate analysis, the finding lost significance (OR=0.19, 95%CI: 0.02-1.62; p=0.13)
Arentz (2020) <sup>28</sup>	Evergreen Hospital, Washington State, USA	February 20, 2020, to March 5, 2020	21 ICU patients	Low lymphocyte count (less than 1000 cells/μL)	Low lymphocyte count was noted in 14/21 (67%) of critically ill patients.
Bhatraju (2020) <sup>29</sup>	Seattle region, Washington State, USA	February 24, 2020, to March 9, 2020	24 ICU patients	Lymphocyte counts presented as a continuous variable; definition of lymphocytopenia was not provided	Lymphocytopenia was common (75% of patients), with a median lymphocyte count of 720 per mm <sup>3</sup> (IQR: 520 to 1375).
Deng (2020) <sup>30</sup>	Wuhan, China	Tongji Hospital and Hankou branch of Central Hospital of Wuhan, China	January 1, 2020 to February 21, 2020	Lymphocyte counts treated as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L)	On admission, patients in the death group exhibited significantly lower lymphocyte count (median: 0.63, IQR: 0.40-0.79) x10 <sup>9</sup> /L vs. 1.00, IQR: 0.72- 1.27 x10 <sup>9</sup> /L, p < 0.001). Patients in the death group also exhibited lower lymphocyte/WBC ratio (median: 7.10, IQR: 4.45, 12.73% vs. 23.5, IQR: 15.27-31.25%, p<0.001). The lymphocyte/WBC ratio continued to decrease during hospitalization.
Tan (2020) <sup>32</sup>	General Hospital of Central Theater Command, Wuhan, China	Not reported	90 patients at the validation cohort	Lymphocytes at two time points: day 10-12 from symptom onset (>20% or <20%) and day 17-19 (>20%, 5-20% and <5%).	Lymphocytes <20% on day 10-12 signal a pre-severe disease and lymphocytes <5% on day 17-19 denote a critical illness.

**Table 1. Studies and main findings for lymphocyte count in Covid-19 patients.**

<sup>a</sup> p-values calculated by Terpos et al., on the basis of contingency tables (Pearson's chi-squared test) in articles that did not present formal statistical comparisons; ARDS: acute respiratory distress syndrome; IQR: interquartile range.

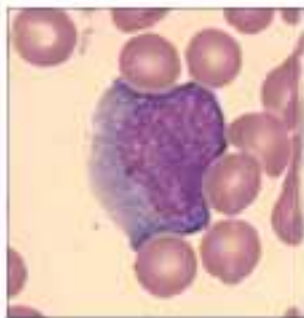
**Taula 2: Estudis i principals troballes relacionades amb el recompte de plaquetes i COVID-19 (1)**

First author (year)	Region	Study period	Sample size	Categorisation of haematological factors	Main findings
Guan (2020) <sup>16</sup>	552 hospitals in 30 provinces, autonomous regions, and municipalities in mainland China	December 11, 2019 - January 31, 2020	1099	Thrombocytopenia was defined as a platelet count of less than 150,000/mm <sup>3</sup>	Thrombocytopenia was present in 36.2% of patients on admission. 46.6% (27/58) of patients with the composite primary endpoint (admission to an intensive care unit, use of mechanical ventilation, or death) presented with thrombocytopenia vs. 35.5% (288/811) of patients without the primary endpoint (p=0.091 <sup>a</sup> ). Severe cases presented thrombocytopenia more frequently (57.7%, 90/156) vs. non-severe cases (31.6%, 225/713); p<0.001 <sup>a</sup>
Huang (2020) <sup>17</sup>	Jinyintan Hospital (Wuhan, China)	Dec 16, 2019, to Jan 2, 2020	41	Low platelet count of <100 x10 <sup>9</sup> platelets per litre	8% (1/13) of patients needing ICU care presented low platelet count vs. 4% (1/27) of patients that did not need ICU care (p=0.45).
Wang (2020) <sup>19</sup>	Zhongnan Hospital, Wuhan, China	January 1 to February 3, 2020	138	Platelets treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> per L	No significant difference (p=0.78) was noted in platelet count between ICU cases (median:142, IQR: 119-202) vs. non-ICU cases (median: 165, IQR: 125-188); p=0.78.
Wu (2020) <sup>20</sup>	Jinyintan Hospital, Wuhan, China	December 25, 2019, to February 13, 2020	201	Platelets treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> /mL	Platelet counts did not differ between patients with ARDS vs. those without ARDS (difference: -4.00, 95%CI: -27.00 to +20.00, p=0.73). Accordingly, no significant difference was noted in dead vs. alive ARDS patients (p=0.10).
Young (2020) <sup>21</sup>	4 hospitals in Singapore	January 23 to February 3, 2020	18	Platelets treated as a continuous variable, x10 <sup>9</sup> per L	Median platelet count was 156 (IQR: 116-217) in patients that required supplemental O <sub>2</sub> and 159 (IQR: 128-213) in those that did not; no statistical comparison was undertaken.
Fan (2020) <sup>22</sup>	National Centre for Infectious Diseases, Singapore	January 23 to February 28, 2020	69	Low platelet count: platelet of <100 x10 <sup>9</sup> /L.	Low platelets were not associated with ICU care either at admission (p=0.67) or as a nadir during hospital stay (p=0.69)
Yang (2020) <sup>27</sup>	Jinyintan Hospital, Wuhan, China	December 24, 2019, to February 9, 2020	52 critically ill patients	Platelets treated as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L)	Platelet count noted in non-survivors was 191 (63) and 164 (74) in survivors; no statistical tests were presented.
Arentz (2020) <sup>28</sup>	Evergreen Hospital, Washington State, USA	February 20, 2020, to March 5, 2020	21 ICU patients	Platelets presented as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L)	Mean baseline platelet count was 235 (ranging between 52 and 395), whereas the reference range was 182-369 x 10 <sup>9</sup> /L
Bhatraju (2020) <sup>29</sup>	Seattle region, Washington State, USA	February 24, 2020, to March 9, 2020	24 ICU patients	Platelet counts presented as a continuous variable (cells per mm <sup>3</sup> )	Median of lowest platelet count was 180,000 (IQR: 109,000–257,000)
Zhou (2020) <sup>31</sup>	Jinyintan Hospital and Wuhan Pulmonary Hospital, Wuhan, China	December 25, 2019, to January 31, 2020	191	Platelets treated as a continuous variable (x10 <sup>9</sup> /L)	Median platelet count was lower in non-survivors (165.5, IQR: 107.0–229.0) vs. survivors (220.0, IQR: 168.0–271.0), p<0.0001
Lippi (2020) <sup>35</sup>	Meta-analysis of published studies	Studies published up to March 06, 2020	9 published studies	Platelets treated as a continuous variable	Platelet count was significantly lower in patients with more severe COVID-19 (WMD -31x10 <sup>9</sup> /L, 95% CI, -35 to -29x10 <sup>9</sup> /L), with very high heterogeneity (I <sup>2</sup> =92%). A more substantial drop in platelets was observed in non-survivors

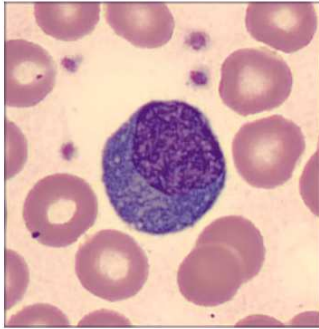
**Table 2. Studies and main findings for platelet count (and platelet to lymphocyte ratio) in Covid-19 patients.**

<sup>a</sup>p-values calculated by Terpos et al., on the basis of contingency tables (Pearson's chi-squared test) in articles that did not present formal statistical comparisons; ARDS: acute respiratory distress syndrome; IQR: interquartile range.

**Imatge 1: Limfòcit d'aspecte activat**

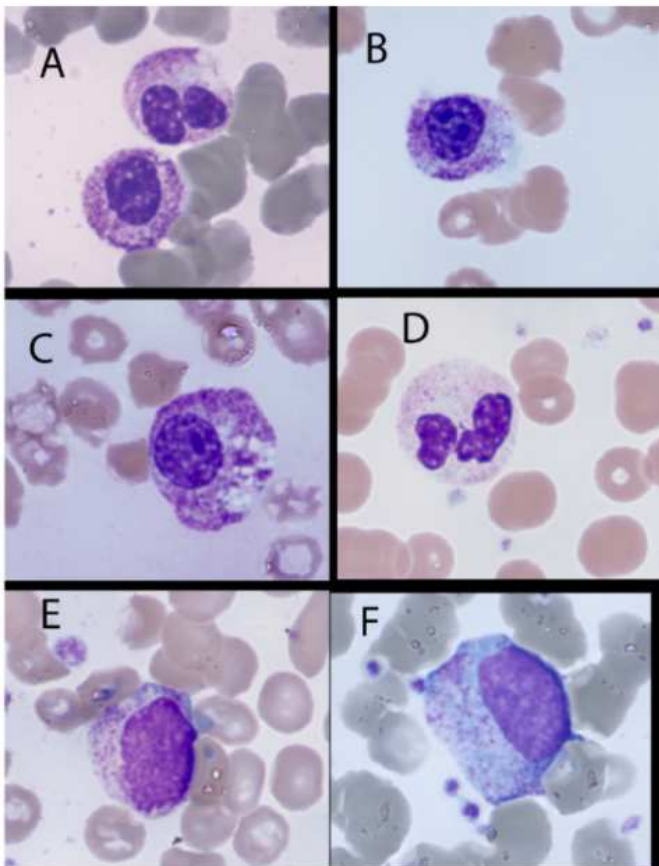


**Imatge 2: Limfòcit limfoplasmacitoide**

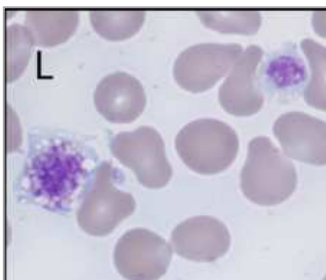


**Imatge 3: Alteracions observades en la granulació citoplasmàtica i en la segmentació nuclear dels neutròfils**

- A i B: hiposegmentació nuclear i reforç de la granulació
- C: zones opalescents del citoplasma sense granulació
- D: hipogranulació citoplasmàtica
- E i F: granulòcits immadurs



**Imatge 4: Alteracions morfològiques observades en les plaquetes**



**Bibliografia:**

1. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, Psaltopoulou T, Gerotziakas G, Dimopoulos MA. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol*. 2020 Apr 13. doi:10.1002/ajh.25829
2. Michael HB, Santos de Oliveira MH, Benoit S, Plebani M, Lippi G. 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*. 2020 Apr 10. doi: 10.1515/cclm-2020-0369,
3. Li T, Lu H, Zhang W. Clinical observation and management of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*, 2020 Dec; 9(1): 687-690.
4. Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*, 2020 Feb 24; 12(1): 8.
5. Singh S, Sharma A, Arora SK. High producer haplotype (CAG) of -863C/A, -308G/A and -238G/A polymorphisms in the promoter region of TNF-alpha gene associate with enhanced apoptosis of lymphocytes in HIV-1 subtype C infected individuals from North India. *PLoS One* 2014; 9(5): e98020.
6. Liao YC, Liang WG, Chen FW, Hsu JH, Yang JJ, Chang MS. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol*. 2002 Oct 15; 169(8): 4288-4297.
7. Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol*. 1999 Feb 15; 162(4): 2154-2161.
8. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis*, 2020 Mar 26. doi: 10.1093/cid/ciaa325.
9. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007 May 1; 109(9): 3812-3819.
10. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; 323(11):1061-1069
11. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020 Mar 28; 395(10229): 1054-1062.
12. Fan W, Jiayan N, Haizhou W, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases* 2020, March 30, 2020; XX:1-8
13. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa248.
14. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020 Mar 13; **506**: 145-148.
15. Qu R, Ling Y, Zhang YH, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol* 2020 Mar 17. doi: 10.1002/jmv.25767
16. Chong VCL, Lim EKG, Fan EB et al. Reactive lymphocytes in patients with Covid-19. *Br J Haematol*. 2020 Apr 16. doi:10.1111/bjh.16690



17. Zini G, Bellesi S, Ramundo F, d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am J Hematol.* 2020; 1-3. doi 10.1002/ajh.25824