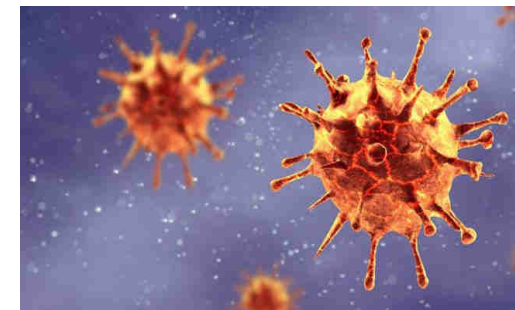


# LINFOPENIA EN COVID-19.

## Aplicación clínica de la citometría de flujo y su papel predictor de gravedad

M Garcia Gasalla  
Joana M Ferrer Balaguer .  
S de Medicina Interna e Inmunología.  
HUSE  
11/03/2021



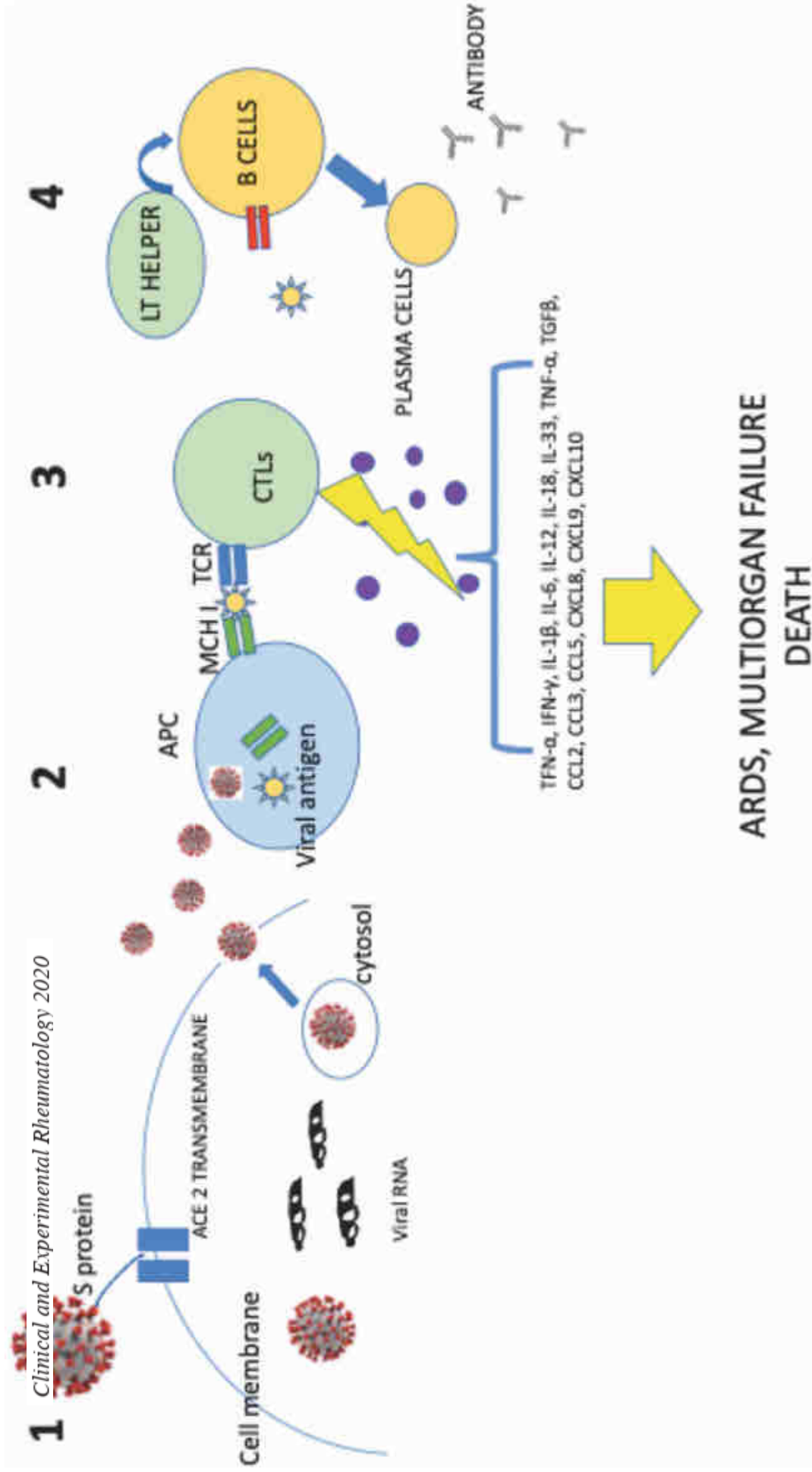
## ¿Cómo identificar a los pacientes de mayor riesgo de desarrollo de COVID-19 crítico?

➤ COVID-19 produce síntomas

LEVES/MODERADOS	81% ,
GRAVES	14%
CRITICOS	5% .

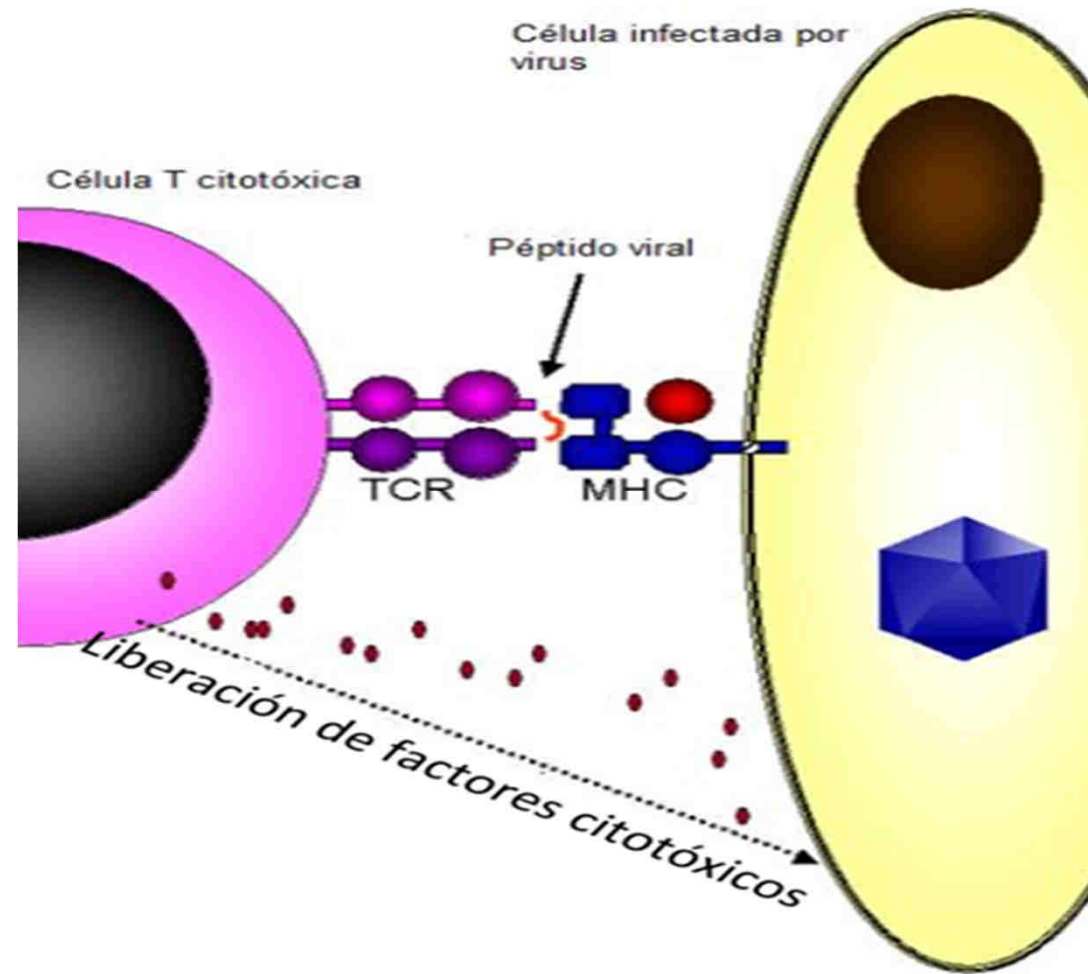
➤ Las formas más graves se han relacionado con factores clínicos , analíticos y alteraciones inmunológicas.

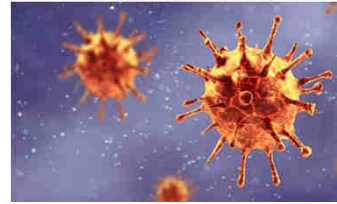
➤ Se han intentado definir marcadores pronósticos relacionados con la respuesta inmune del huésped que permitan identificar a los pacientes de mayor riesgo.



# Infecciones virales: papel de LT citotóxicos y células NK

- Célula infectada migra al ganglio.  
Fragmentos de péptidos virales unidos a MHC I son reconocidos por las células T CD8 a través del R TCR , desencadenándose la diferenciación a **LT CD8 citotóxicos**, con la colaboración de los LT CD4 .  
Las células activadas migran al lugar de la infección y allí liberan los factores citotóxicos (IL6, IL1 $\beta$ , IL18, IFN  $\gamma$ , perforinas, granzimas..).
- Algunos virus pueden bloquear la salida a la superficie del MHC y dificultar el reconocimiento de los LT CD8 de la célula infectada. **Las células NK** reconocen estas células con expresión disminuida de MHC y liberan también factores citotóxicos.





## Linfopenia y COVID-19

- **En SARS grave , en COVID-19 y en menor medida en MERS se ha observado en sangre periférica linfopenia, con disminución de las células T CD4 y CD8, B (CD19) , y también de las células NK .**
- Causa todavía no aclarada: migración de LT hacia el pulmón, respuesta exuberante de IFN tipo I que induce apoptosis del LT, disminución de la activación normal de LT provocada por la IL6, agotamiento de células T, viraje hacia un patrón Th2..

# Papel de la citometría de flujo en el COVID-19



- **Inmunofenotipado linfocitario** con Ac monoclonals marcados con un fluorescente frente a Ag linfocitarios y medición por citometria de flujo es una práctica clínica habitual en el diagnóstico de enfermedades hematológicas, inmunodeficiencias , seguimiento de la infección por el VIH.....
- También se ha mostrado herramienta útil para la **estratificación pronóstica** de los pacientes con COVID-19

# Pros and cons of MFC approaches to COVID-19

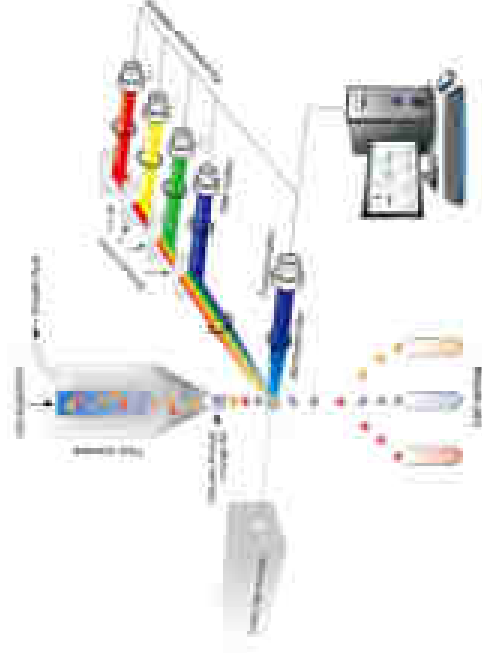
## TB NK determination

- Rapid turnaround time
- Highly standardized/automated
- Absolute count
- Biosafety
- Worldwide available

- *Limited picture of the immune system*

## Advanced Flow

- Highly descriptive/informative
- Long turnaround time
- *Complex and time consuming*
- *Limited to reference centers*





## “Lymphocyte subsets and COVID-19 “

- Linfopenia CD4, CD8 , CD19, NK, marcadores de desarrollo de enfermedad crítica.
- Búsqueda Pubmed 1 de marzo 2021: 300 artículos.
- La mayoría referentes a poblaciones en China.
- Dos trabajos en poblaciones europeas (HUGMarañón, Tor Vergata Univ Roma ).
- Varios meta análisis:

### Meta-analyses

- ✓ Huang W, Cytometry A, 97A: 772-776 (2020)
- ✓ Akbari H, Life Sciences, 258: 118167 (2020)
- ✓ Lu Q, Frontiers in Medicine, 7: 558545 (2020)

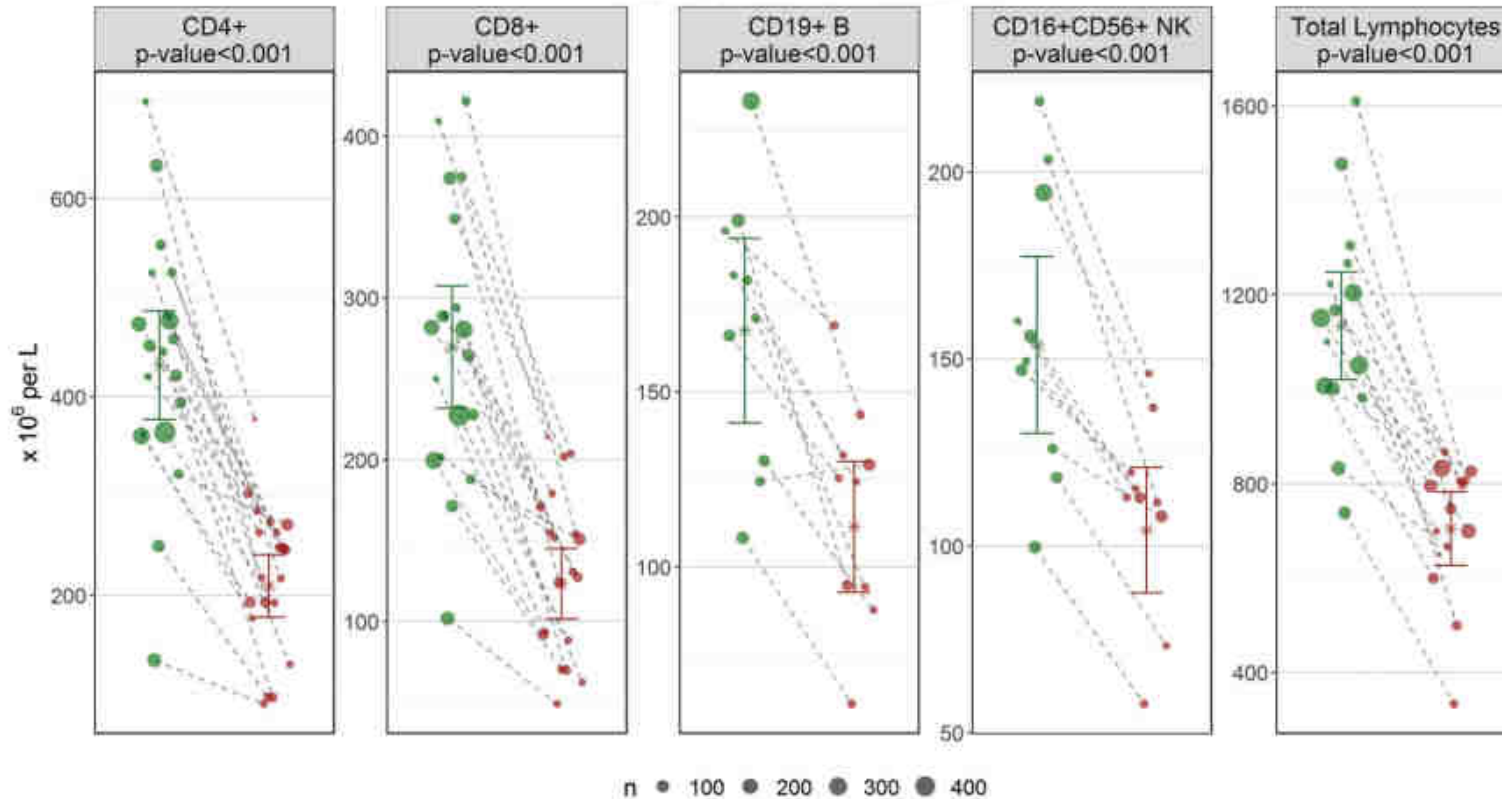


# Lymphocyte Subset Counts in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis

Wei Huang,<sup>1\*</sup> Julie Berube,<sup>2</sup> Michelle McNamara,<sup>1</sup> Suraj Saksena,<sup>1</sup> Marsha Hartman,<sup>1</sup> Tariq Arshad,<sup>1</sup> Scott J. Bornheimer,<sup>1</sup> Maurice O’Gorman<sup>3,4</sup>

Mayo 2020 . Revisión de los primeros 20 publicaciones realizadas todas en China .  
30107 sujetos, **76.6% COVID-19 leve-moderado**, **24,4% COVID grave-crítico**

Mean Count across Articles



El estudio de subpoblaciones linfocitarias podría tener utilidad pronóstica

The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis

H. Akbari, et al.

Life Sciences 258 (2020) 118167

50 estudios (49 en China) , 7865 pacientes.

Se catalogan a los pacientes en dos grupos: leve/moderado y grave /crítico ( CDC China )



Se observan diferencias significativas en el grupo de mayor gravedad en cuanto a :

- **linfopenia , neutrofilia**
- **elevación del ratio neutrófilo/linfocito , del amiloide sérico A, PCReactiva y ferritina**
- **Elevación de IL2, IL4, RsIL2, IL6,IL8, TNF  $\alpha$ , IFN, pero no IL7 o IL1 $\beta$**
- **Disminución de células CD4, CD8, CD19 y NK**

## Association of Peripheral Lymphocyte and the Subset Levels With the Progression and Mortality of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis

Qun Lu<sup>1</sup>, Zhengyin Wang<sup>1</sup>, Yuan Yin<sup>1</sup>, Yanrong Zhao<sup>1</sup>, Ping Tao<sup>1</sup> and Ping Zhong<sup>2\*</sup>

¿Existe una correlación entre los niveles de las subpoblaciones linfocitarias basales y la **PROGRESIÓN** a formas críticas o muerte a pesar de tratamiento?

Revisión sistemática de publicaciones .

Analizan 16 estudios, 13 de China, resto de España e, EEUU e India.

Progresión en 1873 casos, estabilidad en 5177

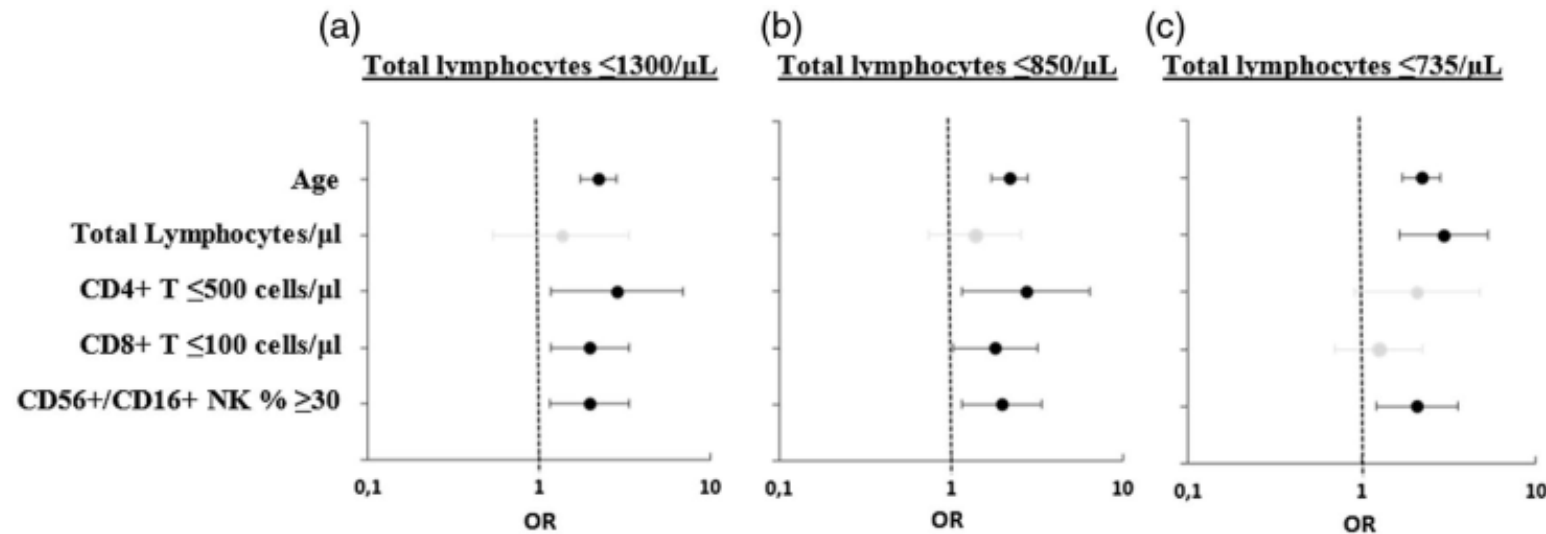


- Mayor linfopenia CD4, CD8, de células B y NK en las formas más graves .
- **LA LINFOPENIA GLOBAL SE CORRELACIONA CON LA PROGRESION A ENFERMEDAD CRÍTICA Y MUERTE**
- Esta asociación no se observa con las subpoblaciones linfocitarias CD3, CD8, NK, CD19 .

## Lymphocyte subsets early predict mortality in a large series of hospitalized COVID-19 patients in Spain

S. Cantenys-Molina <sup>IP,\*</sup>  
E. Fernández-Cruz, <sup>\*†</sup> P. Francos, <sup>\*</sup>  
J. C. Lopez Bernaldo de Quirós, <sup>†‡</sup>  
P. Muñoz <sup>†‡§</sup> and J. Gil-Herrera <sup>IP</sup>

701 pacientes ingresados por COVID-19, 112 (15.9%) fallecen durante la hospitalización



- Edad avanzada , linfopenia y NK>30% fueron predictores de mortalidad en todos los casos.
- **LT4 <500 y LT8 <100** predictores de mortalidad en linfopenia moderada (1300-850 /μL) , pero NO en linfopenias más graves (<735 cel/μL)

# ESTUDIO INMUNOCOVID HUSE



- Hipótesis:

La evolución del cuadro clínico de COVID-19 hacia las formas más graves de la enfermedad – Síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA) que precisa ingreso en UCI, ventilación mecánica y uso de fármacos inmunomoduladores - puede predecirse mediante marcadores analíticos, virológicos e inmunológicos.

Objetivos:

1. Conocer los niveles de IL6, IL10, IL2R, IL1, IL8, TNF, IL17, IL18, IL 22 , **las subpoblaciones linfocitarias** y los valores de complemento en sangre periférica y su correlación con la gravedad clínica de COVID-19.
2. Determinar mediante RT-PCR semicuantitativa la viremia en orofaringe y sangre periférica y su correlación con la gravedad clínica de COVID-19.
3. Estudiar el valor pronóstico de otros parámetros clínicos y analíticos.



## **ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LA ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA de pacientes diagnosticados de COVID-19. Inmunocovid .HUSE**

- subpoblaciones linfocitarias T CD4 y CD8, B, y NK primeras 24h de ingreso.
- 3 grupos leve/moderado , grave y crítico.

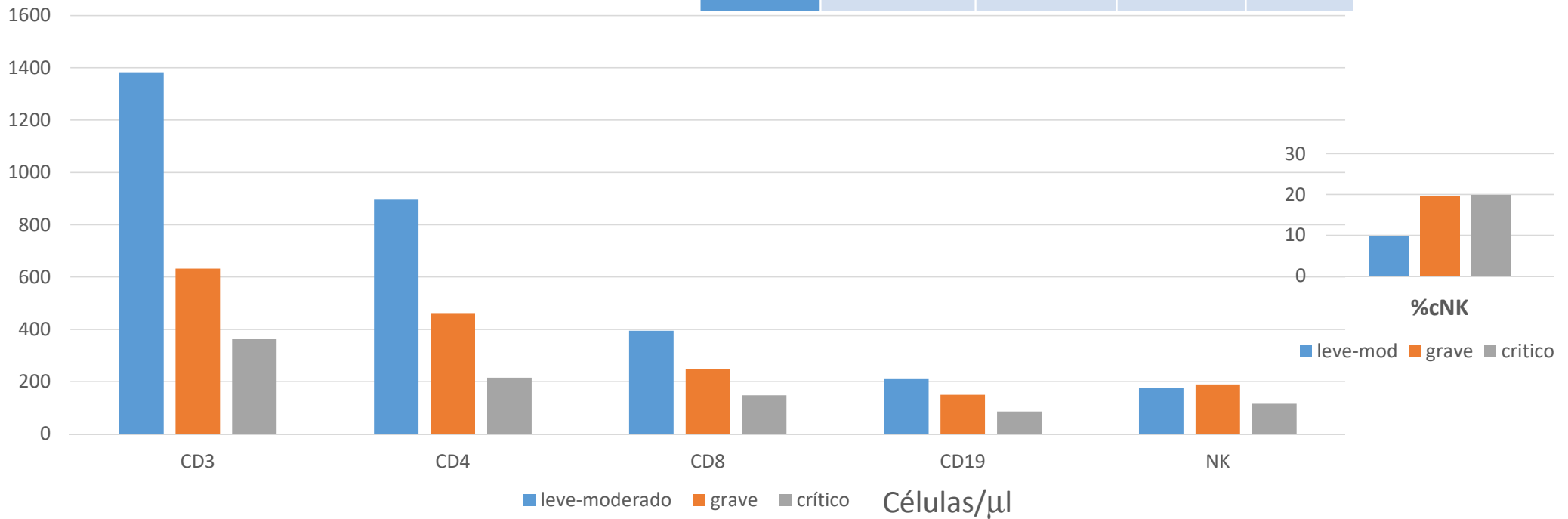
## Estudio Inmunocovid .HUSE:

**Resultados:  
134 pacientes**

61(45,5%) mujeres. La mediana de edad fue de 56,0 años [p25-75; 47-66,5].

**Enfermedad leve/moderada 53 (39,5%),  
grave 60 (44,8%)  
crítica 21 (15.7%)**

	Leve-moderado	Grave	Crítico	p
CD3	1383[68-3265]	633[171-3177]	363 [113-1074]	<b>0,04</b>
CD4	896 [64-2459]	463[122-2383]	216[30-685]	<b>0.01</b>
CD8	395 [119-1811]	250[66-1113]	148 [31-571]	<b>0.01</b>
CD19	210 [9-721]	150 [7-1043]	86 [29-301]	<b>0,01</b>
NK	176 [37-603]	190 [5-752]	116 [10-322]	<b>ns</b>



## Estudio Inmunocovid (HUSE).

### Poblaciones linfocitarias T, B, NK en la estratificación de riesgo de desarrollo de enfermedad crítica.



- **CD3 < 530 cel/μl** (OR: 12,3 95% IC 4,2-35,9)
- **CD4<357 cel/μl** (OR: 16,6 95% IC 5.1-54,2)
- **CD8<248 cel/μl** (OR: 8,7 95% IC: 2,7-27,7)
- **CD19 <145 cel/μl** (OR: 10,9 95% IC: 3,0-39,40)

➡ herramienta útil para la estratificación pronóstica al ingreso de los pacientes COVID-19.  
Pero 4/21 pacientes presentaban valores superiores a los cut-off referidos y desarrollaron enfermedad crítica

➡ debe combinarse con otras determinaciones (IL6, CD25s, IL1RA, IL1, IL18, ferritina, Índice neutrófilo/linfocito, Proteína C reactiva...



## Estudio Inmunocovid (HUSE).

Otras poblaciones linfocitarias en la estratificación de riesgo de desarrollo de enfermedad crítica

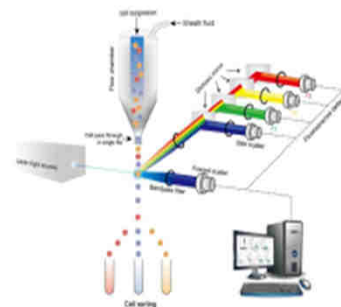
### Pros and cons of MFC approaches to COVID-19

#### TBNK determination

- Rapid turnaround time
- Highly standardized/automated
- Absolute count
- Biosafety
- Worldwide available
- *Limited picture of the immune system*

#### Advanced Flow

- Highly descriptive/informative
- Long turnaround time
  - *Complex and time consuming*
  - *Limited to reference centers*



Diferentes poblaciones de LT Th1, Th2, Th17, Th17.1 , LT reguladores, foliculares, marcadores de activación ...

## PROJECT

COVID PRECISE is a large international consortium of experts performing research on COVID-19 related prediction models



OPEN ACCESS



# Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and critical appraisal

Laure Wynants,<sup>1,2</sup> Ben Van Calster,<sup>2,3</sup> Gary S Collins,<sup>4,5</sup> Richard D Riley,<sup>6</sup> Georg Heinze,<sup>7</sup> Ewoud Schuit,<sup>8,9</sup> Marc M J Bonten,<sup>8,10</sup> Darren L Dahly,<sup>11,12</sup> Johanna A A Damen,<sup>8,9</sup>

Proposed models are poorly reported and at high risk of bias, raising concern that their predictions could be unreliable when applied in daily practice

PROJECT

COVID PRECISE is a large international consortium of experts performing research on COVID-19 related prediction models

