

## RED CELL-BOUND ANTIBODIES AND TRANSFUSION REQUIREMENTS IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH COVID-19

### HASTANEDE YATAN COVID-19'LU HASTALARDA ERİTROSİTE BAĞLANAN ANTİKORLAR VE TRANSFÜZYON GEREKSİNİMLERİ

**ALINTI:** doi: 10.1182/blood.2020006695

**YAZARLAR:** Berzuini A, Bianco C, Paccapelo C, Bertolini F, Gregato G, Cattaneo A, Erba E, Bandera A, Gori A, Lamorte G, Manunta M, Porretti L, Revelli N, Truglio F, Grasselli G, Zanella A, Villa S, Valenti L, Prati D.

**ÖZETLEYEN:** Dr. Betül GÜNAYDIN

#### GİRİŞ

Direkt antiglobulin testi (DAT) in-vivo olarak eritrositlere bağlanan immünoglobulin veya komplemanı tespit eder ve immün aracılı hemolitik anemilerin tanısında kullanılır. Bazı viral enfeksiyonlarda klinik olarak belirgin aneminin eşlik etmediği pozitif DAT sonuçları bildirilmiştir. Çok yakın zamanda, eş zamanlı SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve otoimmün hemolitik anemi (OİHA) başlangıcı olan birkaç vaka tanımlanmıştır. 2019 koronavirüs hastalığı (COVID-19) salgınının ilk haftalarında, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Kan Merkezi'nde (Milan, İtalya) DAT pozitifliğinin arttığının fark edilmesi üzerine, bir haftalık süre içinde (6-13 Nisan 2020) transfüzyon öncesi test ve/veya ABO ve Rh tiplemesi için laboratuvarımıza gönderilen, COVID-19'lu 113 ardışık hastanın örnekleri incelenmiştir.

#### GEREÇ-YÖNTEM

Tüm hastalar hastaneye yatırılıp birden fazla ilaçla (hidroksiklorokin, heparin, kortikosteroidler, anti-interlökin-1 biyolojik ajanları, antiviraller, antibiyotikler, vazopresörler ve invaziv veya noninvaziv ventilasyon dahil) tedavi görmüşlerdir. Hiçbiri COVID-19 konvelesan plazma tedavisi almamıştır. Hastaların eritrosit incelemeleri Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Transfüzyon Tıbbi ve Hematoloji Anabilim Dalı İmmünohematoloji Referans Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Eritrosit antikorları, kolon aglütinasyon teknolojisi (ORTHO BioVue sistemi; Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ), polispesifik antiserum (immünoglobulin G [IgG] ve C3d) ve spesifik antiserum (IgG) kullanılarak direkt antiglobulin testi ve indirekt antiglobulin testi (İAT) ile belirlenmiştir. DAT pozitif örnekler, başka bir mikro sütun yöntemi ve akım sitometrisi ile doğrulanmış ve böylece teknik bir artefakt ihtimali dışlanmıştır. Ayrıca antikor özgüllüğü mikrokolon yöntemi ile belirlenmiştir (IgG, IgA, IgM, C3c, C3d; DC-Screening I; Bio-Rad, Cressier, Switzerland). Hastaların ve sağlıklı donörlerin EDTA'lı örnekleri, üç kez salin ile yıkanarak yıkanmış eritrosit süspansiyonu elde edilmiştir. Sonrasında biri COVID-19'lu DAT negatif beş hastadan, diğeri beş kan bağışçısından oluşan iki farklı eritrosit paneli hazırlanmıştır. Ticari bir eritrosit paneli (SURGISCREEN; Ortho Clinical Diagnostics) de kullanılmıştır. Eritrositlere bağlı antikorların serbestleştirilmesi için hızlı asit

elüsyonu (Gamma ELU-KIT II; Immucor Inc., Norcross, GA) kullanılmış ve elüatlar (DAT-pozitif hastaların RBC yüzeyinden elde edilen antikorların solüsyonu) İAT ile test edilmiştir. SARS-CoV-2 RNA Damlacık Dijital PCR Sistemi (QX200; Bio-Rad) ile test edilmiştir. PCR'da Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri primer ve problrarı (2019-nCoV Kit; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) kullanılmıştır. Alt limit olarak mikrolitre başına 0.109 kopya kabul edilmiştir. Tüm bu testler, hastalara kan transfüzyonu yapılmadan önce tamamlanmıştır.

## SONUÇ-TARTIŞMA

Mikrokolon tarama testi kullanılarak 113 COVID-19 hastasının 52'sinde (%46) DAT testi pozitif bulunmuştur. Bu oran, COVID-19 olmayan transfüzyon adayları arasında Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Kan Merkezinde gözlemlenenden (<%10) ve akut hastalıkla hastanede yatanlardaki diğer inceleme raporlarından (%1-15) önemli ölçüde daha yüksektir. 52 hastanın 46'sının (%88) yalnızca IgG'si, 4'ünün (%8) IgG ve C3d'si, 2'sinin (%4) ise yalnızca C3d'si pozitifdir. OİHA vakalarında yaygın olarak gözlemlenenin aksine, hiçbir hasta serumu veya elüatında, İAT testinde ticari eritrosit paneline veya sağlıklı donörlerin eritrositine karşı reaksiyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte, IgG içeren tüm elüatlar, DAT negatif COVID-19 hastalarından hazırlanan eritrosit paneli ile pozitif olarak test edilmiştir. Bu veriler, DAT reaktivitesinin altında yatan mekanizmanın, hastalığın seyri sırasında eritrosit yüzeyinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığını göstermektedir. Muhtemel bir yorum, COVID-19'daki hiperinflamasyonun, kompleman C3 birikimini ve IgG otoantikorlarının eritrosit membranlarına bağlanmasını arttırdığı ve bu da hasarlı eritrositlerin makrofajlar tarafından temizlenmesini teşvik ettiği'dir. 78 hastada, DAT reaktivitesi ile hastanede yatış sırasında uygulanan ilaçlar arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir. Bununla birlikte, ilaçlarla ilgili verilerin eksik olması ve ileriye dönük bilgi toplanamaması nedeniyle ilaca bağlı mekanizmaların olası katkısı göz ardı edilemez. Ayrıca, eritrosit membranına bağlı viral proteinlere yönelik antikorların bir sonucu olarak DAT reaktivitesinin meydana gelme olasılığı da düşünülmüştür. Ancak, damlacık dijital PCR protokolünün yüksek derecede hassas olmasına rağmen test edilen plazma veya eritrositlerde SARS-CoV-2 RNA saptanamaması bu ihtimali ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmamızda, ayrıca pozitif DAT sonuçları ile hastaların elektronik kayıtlarından alınan klinik ve laboratuvar özellikleri arasındaki olası ilişki analiz edilmiştir (Tablo 1). DAT-pozitif hastalarda hemoglobin konsantrasyonlarının daha düşük, anizositoz oranlarının ise daha yüksek olduğu saptanmış ve DAT-negatif hastalara göre daha fazla transfüzyona ihtiyaç duyulduğu görülmüştür (p <0.01). Bu durum, membrana bağlı immünoglobulin varlığının aneminin ciddiyeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, total bilirubin ve laktat dehidrojenaz (LDH) konsantrasyonlarında DAT pozitif ve DAT negatif vakalar arasında fark saptanmamıştır. COVID-19 hastalarında retikülosit sayısı ve haptoglobin rutin olarak izlenmediğinden diğer hemoliz göstergeleri ile ilişki değerlendirilememiştir. Bu sonuçlardan hareketle aneminin ekstravasküler hemolizden kaynaklanmaması mümkündür ve daha ziyade ilerlemiş hastalığın bir belirteci olarak yorumlanabilir. İki grup arasında, endotrakeal entübasyon

ihtiyacı ve 30 günlük mortalite açısından fark saptanmazken hastalık sonucuna ilişkin kesin sonuçlar ileriye dönük bir çalışma ve belki de daha fazla sayıda gözlem gerektirmektedir. Eritrosit membran hasarının COVID-19 hastalarında sıklıkla gözlenen trombotik komplikasyonları destekleyip desteklemediği araştırılmaya devam etmektedir. Son olarak, yüksek oranda DAT reaktivitesi, transfüzyon öncesi test üzerinde bir etkiye sahip olabilir, çünkü membrana bağlı otoantikolar, yakın zamanda transfüze edilmiş hastalarda eşzamanlı RBC alloantikolarının varlığını maskeleyebilir ve fenotipik olarak eşleşen kan ünitelerinin seçimini karmaşıktırabilir veya geciktirebilir.

Sonuç olarak, kan merkezimize numuneleri gönderilen COVID-19 hastalarının yaklaşık yarısında eritrosit antikoları saptanmıştır. COVID-19 hastalarında DAT reaktivitesinin serolojik özellikleri, OİHA'da genel olarak gözlenenden farklı bulunmuştur. Bununla birlikte, bu durum artan anemi sıklığı ve daha fazla transfüzyon gereksinimi ile ilişkili saptanmıştır. Bu açıdan saptadığımız bulgular, COVID-19 patogeneğinde immün aracılı mekanizmaların önemine daha fazla kanıt eklemektedir.

Tablo 1: COVID-19 Hastalarının Klinik ve Laboratuvar Verileri

	All patients (N = 113)	DAT-positive patients (n = 52)	DAT-negative patients (n = 61)	P*
Age, mean $\pm$ SD, y	63.5 $\pm$ 17.1	65.2 $\pm$ 16.2	62.1 $\pm$ 17.9	.17
Males, n (%)	60 (53.1)	29 (55.8)	31 (50.8)	.60
Length of hospital stay, d	15.5 (10-26)	19 (10.2-30)	14 (9-22.2)	.06
Hemoglobin, g/L	11.2 (8.6-12.7)	9.8 (7.9-11.7)	12.2 (9.4-13.1)	.001
Red cell distribution width, %	14 (13.2-15.2)	14.5 (13.5-15.9)	13.6 (12.7-14.4)	.001
Platelet count, $\times 10^9/L$	260 (183-335)	308 (207-395)	237 (162-303)	.06
Mean platelet volume, fL	10.7 (10.1-11.5)	10.6 (9.9-11.5)	10.9 (10.1-11.5)	.82
LDH, U/L	229 (199.5-343.5)	247 (203.5-351)	227.5 (184.5-316)	.39
Total bilirubin, mg/dL	0.51 (0.32-0.71)	0.52 (0.36-0.80)	0.48 (0.33-0.66)	.63
Serum ferritin, $\mu g/L$	782 (452-1227)	922 (526-1320.5)	702 (359.5-1142.7)	.24
D-dimer, $\mu g/L$	1269 (711-2427)	1578 (803.5-3338.5)	1109 (635-2074.5)	.11
C-reactive protein, mg/dL	4.13 (1.42-10.32)	6.27 (1.81-10.79)	2.83 (1.12-9.11)	.12
Patients receiving $\geq 1$ transfusion, n (%)	44 (39)	27 (51.9)	17 (27.9)	.009
Units of RBCs transfused per patient, n	0 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)	.005
Patients on endotracheal intubation, n (%)	18 (16)	11 (22)	7 (11.5)	.13
Mortality at 30 d, n (%)†	14 (12.4)	8 (15.4)	6 (9.8)	.37