

## Tratamentul a 5 pacienți bolnavi critici cu COVID-19 cu plasmă plasmă de la convalescenți (hiperimuna)

ChenguangShen, PhD; ZhaoqinWang, PhD; FangZhao, PhD; YangYang, MD; JinxiuLi, MD; JingYuan, MD; FuxiangWang, MD; DelinLi, PhD; MinghuiYang, PhD; LiXing, MM; JinliWei, MM; HaixiaXiao, PhD; YanYang, MM; JiuxinQu, MD; LingQing, MM; LiChen, MD; ZhixiangXu, MM; LingPeng, MM; YanjieLi, MM; HaixiaZheng, MM; FengChen, MM; KunHuang, MM; Yujing Jiang, MM; DongjingLiu, MD; ZhengZhang, MD; YingxiaLiu, MD; LeiLiu, MD

**IMPORTANTA:** Boala Coronavirus 2019 (COVID-19) reprezintă o pandemie fără agenți terapeutici specifici și cu o rata a mortalității substanțială. Identificarea de noi tratamente este esențială.

**OBIECTIV:** A determina dacă transfuzia de plasmă convalescentă poate fi benefică în tratamentul pacienților bolnavi critici cu sindrom respirator acut sever dat de infecția cu coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

**PROIECTARE, CONTEXT ȘI PARTICIPANȚI:** Serii de cazuri a câte 5 pacienți bolnavi critic cu COVID-19 confirmat de testele de laborator și sindrom de detresă respiratorie acută (ARDS), care au îndeplinit următoarele criterii: pneumonie severă cu progresie rapidă și cu încărcare virală sporită în ciuda tratamentului antiviral; PaO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> <300; și ventilație mecanică. Toate cele 5 au fost tratate cu transfuzie de plasmă convalescentă. Toți 5 au fost tratați cu transfuzie de plasmă convalescentă. Studiul a fost realizat la Departamentul de Boli Infecțioase, la Shenzhen Third People's Hospital din Shenzhen, China, în perioada 20 ianuarie 2020 - 25 martie 2020; data finală de urmărire a fost 25 martie 2020. Rezultatele clinice au fost comparate înainte și după transfuzia de plasma convalescentă.

**EXPUNERI:** Pacienții au primit transfuzie cu plasmă convalescentă cu o concentrație de anticorpi specifici SARS-CoV-2 (IgS) mai mare de 1:1000 (cu titru de diluare a punctului final, prin testul imunisorbant legat de enzimă [ELISA]) și un titru de neutralizare mai mare de 40 (titru de diluare a punctului final) care a fost obținut de la 5 pacienți care și-au revenit din COVID-19. Plasma convalescentă a fost administrată între 10 și 22 de zile de la internare.

**PRINCIPALELE REZULTATE ȘI MĂSURI:** Modificări ale temperaturii corporale, ale scorului de evaluare a eșecului organelor legate de sepsis (SOFA) (interval de la 0 la 24, valorile mai mari indică o boală mai severă), PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub>, încărcăturii virale, titrului seric, indicelui biochimic de sânge de rutină, ARDS și suportul de ventilație prin membrana extracorporală (ECMO) înainte și după transfuzia de plasma convalescentă.

**REZULTATE:** Toți cei 5 pacienți (vârsta cuprinsă între 36 și 65 ani; 2 femei) primeau ventilație mecanică la momentul tratamentului și toți primeau agenți antivirali și metilprednisolon. Ca urmare a transfuziei plasmatice, temperatura corpului s-a normalizat în 3 zile la 4 din 5 pacienți, scorul SOFA a scăzut, iar PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> a crescut în 12 zile (valori: 172-276 înainte și 284-366 după). Încărcările virale au scăzut și au devenit negative în 12 zile de la transfuzie și ELISA specific SARS-CoV-2 și titrurile de anticorpi de neutralizare au crescut după transfuzie (valori: 40-60 înainte și 80-320 în ziua 7). ARDS s-a rezolvat la 4 pacienți la 12 zile de la transfuzie și 3 pacienți au fost scoși de pe ventilația mecanică după 2 săptămâni de tratament. Dintre cei 5 pacienți, 3 au fost eliberați din spital (durata șederii: 53, 51 și 55 de zile), iar 2 sunt în stare stabilă la 37 de zile după transfuzie.

**CONCLUZII ȘI RELEVANȚĂ:** În această serie de cazuri preliminară necontrolată de 5 pacienți critici cu COVID-19 și ARDS, administrarea de plasmă convalescentă care conține anticorpi neutralizanți a fost urmată de îmbunătățirea stării lor clinice. Mărimea limitată a eșantionului și designul studiului împiedică o afirmație definitivă despre eficacitatea potențială a acest tratament și aceste observații necesită evaluare în studiile clinice.

JAMA.doi:10.1001/jama.2020.4783

Published online March 27, 2020.

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

Author Affiliations : Author affiliations are listed at the end of this article. Corresponding Authors: Yingxia Liu, MD ([yingxialiu@hotmail.com](mailto:yingxialiu@hotmail.com)), Zheng Zhang, MD ([zhangzheng1975@aliyun.com](mailto:zhangzheng1975@aliyun.com)), and Lei Liu, MD ([liulei3322@aliyun.com](mailto:liulei3322@aliyun.com)), Shenzhen Third People's Hospital, Second Hospital Affiliated to Southern University of Science and Technology, No. 29, Bulan Road, Longgang District, Shenzhen 518112, China.

Epidemia de sindrom respirator sever acut coronavirus 2 (SARS-CoV-2) originar din Wuhan, China, s-a răspândit rapid la nivel mondial.<sup>1</sup> În 24 martie 2020, China a raportat 81767 de cazuri cu 3281 de decese, iar Organizația Mondială a Sănătății a declarat boala coronavirus 2019 (COVID-19) o pandemie. La 18 martie 2020, au fost raportate cazuri în aproximativ 195 de țări.<sup>2</sup>

Nu sunt disponibili agenți terapeutici specifici sau vaccinuri pentru COVID-19. Mai multe terapii, cum ar fi remdesivir și favoripiravir, sunt cercetate<sup>3,4</sup> dar eficacitatea antivirală a acestor medicamente nu este încă cunoscută. Utilizarea plasmei convalescente a fost recomandată ca tratament empiric în timpul focarelor de virus Ebola în 2014 și un protocol pentru tratamentul sindromului respirator coronavirus din Orientul Mijlociu cu plasmă convalescentă a fost stabilit în 2015.<sup>5</sup> Această abordare cu alte infecții virale, cum ar fi SARS-CoV, gripa aviară H5N1 și gripa H1N1, de asemenea, a sugerat că transfuzia plasmei convalescente a fost eficientă.<sup>6,7,8</sup> În rapoarte anterioare, majoritatea pacienților au primit plasma convalescentă printr-o singură transfuzie.<sup>9,10</sup> Într-un studiu care a implicat pacienți cu infecție cu virus gripal pandemic A (H1N1) 2009, tratamentul infecției severe cu plasmă convalescentă (n = 20 pacienți) a fost asociat cu reducerea încărcării virale a tractului respirator, cu răspunsul seric al citokinelor și mortalitate.<sup>11</sup> Într-un alt studiu care a implicat 80 de pacienți cu SARS, administrarea de plasmă convalescentă a fost asociată cu o rata mai mare de externări din spital în ziua 22 de la apariția simptomelor, comparativ cu pacienții care nu au primit plasma convalescentă.<sup>12</sup> În consecință, aceste descoperiri ridică ipoteza conform căreia utilizarea transfuziei de plasma convalescente ar putea fi benefică la pacienții infectați cu SARS-CoV-2.

---

<sup>1</sup> Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223):497-506.

<sup>2</sup> WHO. Novel coronavirus (COVID-19) situation. Updated March 24, 2020.

<https://experience.arcgis.com/experience/685d0ace521648f8a5beee1b9125cd>

<sup>3</sup> Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020. Published online February 24, 2020. doi:[10.1001/jama.2020.2648](https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648)

<sup>4</sup> Lu H. Drug treatment options for the 2019 – new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci Trends*. 2020;[14\(1\):69-71](https://doi.org/10.1007/s12250-020-00000-0).

<sup>5</sup> Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;[S1473-3099\(20\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30141-9).

<sup>6</sup> Kraft CS, Hewlett AL, Koepsell S, et al; Nebraska Biocontainment Unit and the Emory Serious Communicable Diseases Unit. The use of TKM-100802 and convalescent plasma in 2 patients with Ebolavirus disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2015;[61\(4\):496-502](https://doi.org/10.1093/cid/civ002).

<sup>7</sup> Van Griensven J, Edwards T, de Lamballerie X, et al; Ebola-Tx Consortium. Evaluation of convalescent plasma for Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2016;[374\(1\):33-42](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512259)

<sup>8</sup> Florescu DF, Kalil AC, Hewlett AL, et al. Administration of brincidofovir and convalescent plasma in a patient with Ebola virus disease. *Clin Infect Dis*. 2015;[61\(6\):969-973](https://doi.org/10.1093/cid/civ002).

<sup>9</sup> Zhou B, Zhong N, Guan Y. Treatment with convalescent plasma for influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 2007;[357\(14\):1450-1451](https://doi.org/10.1056/NEJMoa062999)

<sup>10</sup> Hung IF, To KK, Lee CK, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis*. 2011;[52\(4\):447-456](https://doi.org/10.1093/cid/cir002).

<sup>11</sup> Burnouf T, Radosevich M. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*. 2003;[9\(4\):309](https://doi.org/10.1191/hkmed.2003.09040309)

<sup>12</sup> Cheng Y, Wong R, Soo YO, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;[24 \(1\):44-46](https://doi.org/10.1007/s00430-005-0044-6).

Scopul acestui studiu a fost să descrie experiența clinică inițială cu transfuzia de plasma convalescentă administrată pacienților bolnavi critic cu COVID-19.

---

## Metode

Acest studiu a fost realizat la Departamentul De Boli Infecțioase, Shenzhen Third People's Hospital, din Shenzhen, China, în perioada 20 ianuarie - 25 martie 2020, iar data finală de urmărire a fost 25 martie 2020. Studiul a fost aprobat de Comitetele de Etică de la Shenzhen Third People's Hospital și fiecare pacient și-a dat consimțământul informat în scris.

## Pacienți

Pacienții cu COVID-19 confirmat de analizele de laborator, diagnosticați utilizând qRT-PCR (GeneoDX Co, Ltd) 13 au fost eligibili să primească tratament plasmatic convalescent dacă îndeplinesc următoarele criterii: (1) au avut pneumonie severă cu progresie rapidă și încărcare virală continuă ridicată în ciuda tratamentului antiviral; (2) PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> de <300 (PAO<sub>2</sub> măsurând din mm Hg și FIO<sub>2</sub> măsurate ca fracție de oxigen inspirat) 14; și (3) sunt în prezent sau au fost susținuți cu ventilație mecanică.

S-a obținut serul fiecărui primitor și testul imunisorbant legat de enzimă (ELISA), iar titrurile de anticorpi neutralizanți au fost testate cu o zi înainte de transfuzia plasmatică convalescentă. Tipurile de sânge ABO ale pacienților au fost determinate pentru o compatibilitate potențială cu donatorul de plasmă convalescentă și fiecare a primit 2 transfuzii consecutive de 200 până la 250 mL de plasmă convalescentă compatibilă ABO (400 ml de plasmă convalescentă în total) în aceeași zi în care a fost obținută de la donator. Pacienții au primit agenți antivirali în mod continuu până când încărcările virale SARS-CoV-2 au devenit negative.

---

### PUNCTE CHEIE

**Întrebare** - Administrarea transfuziei plasmatice convalescente ar putea fi benefică în tratamentul pacienților bolnavi critici cu boala coronavirus 2019 (COVID-19)?

**Constatări** - În această serie de cazuri necontrolate de 5 pacienți critici cu COVID-19 și sindrom de detresă respiratorie acută (ARDS), administrarea de plasmă convalescentă care conține anticorpi neutralizanți a fost urmată de o îmbunătățire a stării clinice.

**Sens** - Aceste descoperiri preliminare ridică posibilitatea ca transfuzia de plasma convalescentă poate fi de ajutor în tratamentul pacienților bolnavi critic cu COVID-19 și ARDS, abordarea lui necesită evaluare în studiile clinice randomizate.

## Clasificarea gravității bolii

Pacienții cu infecție cu COVID-19 confirmată de laborator, care au avut oricare dintre următoarele, au fost considerați în stare critică: (1) insuficiență respiratorie care necesită ventilație mecanică, (2) șoc, identificat prin utilizarea de terapie vasopresoare și niveluri ridicate de acid lactic ( $> 2\text{mmol} / \text{L}$ ) în ciuda resuscitării adecvate a fluidelor sau (3) colapsul altor organe care necesită internarea în Unitatea de Terapie Intensivă (ATI).

## Donatori

Cei 5 donatori de plasmă convalescentă aveau vârste cuprinse între 18 și 60 de ani. Donatorii s-au recuperat din infecția cu SARSCoV-2 și au fost invitați să doneze plasma convalescentă după obținerea consimțământului informat în scris. Toți donatorii au fost diagnosticați anterior cu COVID-19 confirmat de analizele de laborator și, ulterior, au fost testați negativ pentru SARS-CoV-2 și alte virusuri respiratorii, precum și pentru virusul hepatitei B, virusului hepatitei C, HIV și sifilis la momentul donării de sânge. Donatorii au fost bine (asimptomatici) timp de cel puțin 10 zile, cu un serum SARS-CoV-2 – un titru de anticorpi specific ELISA - mai mare de 1:1000 și un titru de anticorpi neutralizanți mai mare de 40. În urma donării, au fost obținuți prin afereză 400 ml de plasmă convalescentă de la fiecare donator, iar plasma a fost imediat transfuzată la destinatari în aceeași zi în care a fost obținută.

## Informații clinice

Informațiile clinice pentru cei 5 pacienți înainte și după transfuzia de plasmă convalescentă au fost obținute dintr-o revizuire a sistemului medical al calculatorului spitalului și au inclus următoarele: date demografice, zile de internare de la debutul simptomelor și prezentarea simptomelor; date despre diverse tratamente, inclusiv ventilație mecanică, terapii antivirale și steroizi; date clinice, incluzând temperatura corporală, PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> și scorul de evaluare a eșecului organelor legate de sepsis (SOFA) (interval de la 0 la 24, valorile mai mari indică o boală mai severă); date de laborator, incluzând numărul de leucocite, numărul limfocitelor, panourile chimice care evaluează funcția renală, valoarea pragului de ciclu (Ct), factorii inflamatori proteina C-reactivă (CRP), procalcitonină și IL-6 și titrul de anticorpi serici (IgG, IgM și anticorpi de neutralizare); date din studii de imagistică toracică; și informații despre complicații, cum ar fi sindromul de detresă respiratorie acută (ARDS), pneumonie bacteriană și sindromul de disfuncție multiplă de organe (MODS).

## RT-PCR cantitativ

qRT-PCR pentru SARS-CoV-2 a fost evaluat așa cum s-a descris anterior. 13 specimene nazofaringiene colectate în timpul spitalizării au fost trimise la laborator într-un recipient de transport viral. Extracția totală a acidului nucleic din probe a fost efectuată folosind QIAamp RNA ViralKit (Qiagen), iar qRT-PCR a fost efectuată folosind un kit comercial specific pentru detectarea 2019-nCoV (GeneoDXCo) aprobat de Administrația Chineză a Alimentelor și Medicamentelor. Fiecare test RT-PCR a furnizat o valoare a Ct, care reprezintă numărul de cicluri necesare pentru ca semnalul fluorescent să treacă pragul pentru un test pozitiv: o valoare Ct mai mare este corelată cu o încărcare virală mai mică. Exemplarele au fost considerate pozitive dacă valoarea Ct a fost de 37.0 sau mai mică și negativă dacă rezultatele au fost nedeterminate. Eșantioanele cu o valoare Ct mai mare de 37 au fost repetate. Specimenul a fost considerat pozitiv dacă rezultatele repetate au fost aceleași cu rezultatul inițial și între 37 și 40. Dacă Ct-ul repetat a fost nedetectabil, eșantionul a fost considerat

negativ. Toate procedurile care implică probe clinice și SARS-CoV-2 au fost efectuate într-un laborator de nivel 3 de biosiguranță. Valorile Ct ale celor 5 destinatari au fost obținute în ziua 1, ziua 3, ziua 7 și ziua 12 după transfuzie.

## ELISA

Plăcile de microtitrare (Sangon Biotech) au fost acoperite peste noapte la 4 °C cu 4 μg/ml proteine SARS-CoV-2RBD recombinante (domeniu de legare la receptor) (50 μL) exprimate de laboratorul nostru prin 293 celule T. Plăcile au fost spălate 3 ori cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) care conține 0,1% vol/vol Tween-20 (PBST) și blocată cu soluție de blocare (PBS conținând 2% din greutate/volum lapte praf degresat) timp de 2 ore la 37 °C. Plăcile au fost apoi spălate cu PBST. Probele de ser au fost diluate până la 200 de ori în PBS ca concentrație inițială, s-au adăugat diluții serice de 3 ori și s-au incubat la 37 °C timp de 60 de minute. După 3 spălări, 100 μL of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (for IgG antibody titer detection) 100 μL de peroxidază de hrean conjugate cu anti-IgG capră anti-umană (pentru detectarea titrului de anticorpi IgG) și IgM (pentru detectarea titrului de anticorpi IgM) soluție de anticorpi (Sangon Biotech) au fost adăugate pe fiecare placă, respectiv, incubate la 37 °C timp de 60 de minute. După 5 spălări, s-au adăugat 100 μL de substrat de tetrametilbenzidină (Sangon Biotech) la temperatura camerei la întuneric. După 15 minute, reacția a fost stopată cu o soluție 2MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (acid sulfuric). Gradul de absorbție a fost măsurat la 450 nm. Toate probele au fost rulate în trei exemplare. Titrurile ELISA au fost determinate prin diluarea punctului final.

Tabelul 1. Caracteristicile clinice ale pacienților infectați cu SARS-CoV-2 care au primit plasma convalescentă

	Patient				
	1	2	3	4	5
Sex	Male	Male	Female	Female	Male
Age, y	70s	60s	50s	30s	60s
Weight, kg	55	85	60	41.5	87
Smoking	No	No	No	No	No
Blood type	B	B	B	A	B
Coexisting chronic diseases	None	Hypertension; mitral insufficiency	None	None	None
Disease presentation and course					
Estimated incubation period, d <sup>a</sup>	1	7	3	7	15
Interval between symptom onset and admission, d	2	4	2	2	3
Interval between admission and plasma transfusion, d	22	10	20	19	20
Complications prior to plasma transfusion	Bacterial pneumonia; severe ARDS; MODS	Bacterial pneumonia; fungal pneumonia; severe ARDS; myocardial damage	Severe ARDS	Severe ARDS	Severe ARDS
Most severe disease classification	Critical	Critical	Critical	Critical	Critical
Treatments					
Steroids	Methylprednisolone	Methylprednisolone	Methylprednisolone	Methylprednisolone	Methylprednisolone
Antivirals	Lopinavir/ritonavir; interferon alfa-1b; favipiravir	Lopinavir/ritonavir; arbidol; darunavir	Lopinavir/ritonavir; interferon alfa-1b;	Interferon alfa-1b; favipiravir	Lopinavir/ritonavir; interferon alfa-1b

Abrevieri: ARDS - sindrom de detresă respiratorie acută; MODS - sindromul de disfuncție multiplă de organe; SARS-CoV-2, sindrom respirator acut sever dat de coronavirus 2.

<sup>a</sup> Perioada estimată de incubație definită ca intervalul dintre expunerea estimată la SARS-CoV-2 și debutul simptomelor.

Tabelul 2. Comparația încărcăturii virale, a indexurilor clinice și a rezultatelor de laborator înainte și după transfuzia plasmatică convalescentă

	Patient				
	1	2	3	4	5
<b>Clinical characteristics</b>					
<b>Body temperature, °C</b>					
Just before transfusion	38.6	39.0	37.6	38.3	39.0
Day 1 posttransfusion	38.5	36.8	37.7	37.9	39.0
Day 3 posttransfusion	38.1	36.6	37.0	36.6	36.8
Day 7 posttransfusion	37.8	37.2	36.5	37.9	36.8
Day 12 posttransfusion	37.0	36.8	36.6	36.8	37.9
<b>SOFA score<sup>a</sup></b>					
Just before transfusion	5	10	3	3	2
Day 1 posttransfusion	4	12	4	3	2
Day 3 posttransfusion	6	10	3	2	2
Day 5 posttransfusion	5	11	2	2	2
Day 7 posttransfusion	3	7	2	2	1
Day 12 posttransfusion	2	4	2	1	1
<b>P<sub>AO<sub>2</sub></sub>/F<sub>iO<sub>2</sub></sub><sup>b</sup></b>					
Just before transfusion	276	209	172	188	205
Day 1 posttransfusion	300	134	184	242	292
Day 3 posttransfusion	220	230	164	233	304
Day 7 posttransfusion	245	206	220	290	230
Day 12 posttransfusion	284	316	342	322	366
<b>Ct value<sup>c</sup> (viral load proxy)</b>					
On admission to hospital	23.0	19.7	18.9	38.0	28.0
Lowest value during hospitalization <sup>d</sup> (highest viral load)	19.2	19.7	18.9	26.6	26.5
Just before plasma transfusion	28.5	22.0	33.0	26.6	35.9
Day 1 posttransfusion	30.0	23.7	38.5	28.0	Negative
Day 3 posttransfusion	34.4	25.0	Negative	Negative	Negative
Day 7 posttransfusion	38.0	32.0	Negative	Negative	Negative
Day 12 posttransfusion	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<b>Mechanical ventilation</b>					
Onset, days before transfusion	11	2	12	9	2
Extubated, days posttransfusion	Intubated	Intubated	2	9	9
<b>ECMO</b>					
Onset, days before transfusion	Not received	1	Not received	Not received	Not received
Removal, days posttransfusion	NA	5	NA	NA	NA
<b>Laboratory findings</b>					
<b>C-reactive protein, mg/L (normal range, &lt;8)</b>					
Before transfusion	163.4	242.8	65.	156.0	173.1
Day 1 posttransfusion	146.2	223.0	108.3	NT	186.8
Day 3 posttransfusion	115.1	75.2	78.7	160.8	233.7
Day 5 posttransfusion	31.3	10.4	74.7	NT	260.4
Day 7 posttransfusion	31.2	13.9	6.2	9.6	5.5
Day 12 posttransfusion	5.3	33.1	NT	5.8	3.2
<b>Procalcitonin, ng/mL (normal range, &lt;0.1)</b>					
Before transfusion	1.2	7.3	0.1	0.2	0.2
Day 1 posttransfusion	1.3	19.7	0.1	0.08	0.4
Day 3 posttransfusion	1.6	13.9	0.09	0.07	1.5
Day 5 posttransfusion	0.9	1.8	0.08	NT	0.9
Day 7 posttransfusion	1.1	0.1	0.04	0.04	0.09
Day 12 posttransfusion	0.4	0.2	NT	0.04	0.07



Tabelul 2. Comparația încărcăturii virale, a indexurilor clinice și a rezultatelor de laborator înainte și după transfuzia plasmatică convalescentă – Continuare

	Patient				
	1	2	3	4	5
IL-6, pg/mL (normal range, 0-7)					
Before transfusion	70.5	438.2	63.9	79.1	87.8
Day 1 posttransfusion	74.9	NT	118.5	39.3	NT
Day 3 posttransfusion	34.5	1045.0	67.0	25.8	797.9
Day 5 posttransfusion	24.1	334.1	590.5	NT	NT
Day 7 posttransfusion	30.8	29.8	174.3	34.0	69.9
Day 12 posttransfusion	6.1	31.8	NT	2.7	54.9
Length of hospital stay, d	Remains hospitalized	Remains hospitalized	53	51	55
Current status as of March 25, 2020	Stable, still receiving mechanical ventilation	Stable, still receiving mechanical ventilation	Discharged home	Discharged home	Discharged home

Abrevieri: Ct - pragul ciclului; ECMO - oxigenare cu membrană extracorporală; NT - nu a fost testat.

<sup>a</sup> Scorul SOFA este calculat folosind 6 sisteme: respirator, coagulare, hepatic, cardiovascular, sistemul nervos central și rinichi. Un scor de 0 este dat pentru funcția normală până la 4 – cel mai mare grad de anormalitate pentru fiecare sistem. Cele mai proaste valori din fiecare zi sunt înregistrate, iar scorul SOFA final este suma scorurilor fiecărui sistem.

<sup>b</sup> Raportul PAO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> a fost definit ca raportul dintre presiunea parțială a oxigenului arterial și procentul de oxigen inspirat.

<sup>c</sup> Pragul ciclului este numărul de cicluri de reacție în lanț a polimerazei necesare pentru amplificarea genelor. O valoare Ct mai mare este corelată cu o încărcare virală mai mică.

<sup>d</sup> Cea mai mică valoare (cea mai mare încărcare virală) între internarea în spital și transfuzia plasmatică.

## Test de neutralizare serică

Celulele Vero (104) au fost însămânțate cu 24 de ore înainte de infecție într-o placă cu 96 de godeuri (Costar). În ziua infecției, celulele au fost spălate de două ori. Probele serice de la pacienți au fost incubate la 56°C timp de 30 de minute și apoi diluate de 2 ori în mediu de cultură celulară (mediu eagle modificat). Au fost adăugate alicote (40 μL) de probe de ser diluate (de la 2 ori la 2056 de ori) la 50 μL mediu de cultură celulară care conține 50 de ori doza infecțioasă a culturii de țesuturi (TCID<sub>50</sub>) din tulpina BetaCoV/Shenzhen/SZTH-003/2020 a virusului (izolat din acest spital, număr de acces GISAID: EPI\_ISL\_406594) 15 pe o placă cu 96 de godeuri și incubat la 37 ° C timp de 2 ore în CO<sub>2</sub> 5% vol/vol. Amestecul de anticorpi antivirus a fost apoi adăugat la celule în plăci cu 96 de godeuri și plăci au fost incubate la 37 ° C cu examen microscopic pentru efect citopatic după o incubație de 5 zile. Cea mai mare diluție a serului care a arătat activitate de inhibare a SARS-CoV-2 a fost înregistrată ca titrul de anticorp neutralizant. Testele au fost efectuate în triplicat cu probe de control negativ de la voluntari sănătoși.

## Rezultate

Au fost tratați cinci pacienți (interval de vârstă, 36-73 ani; 2 femei) cu ser convalescent. Niciunul nu era fumător, iar 4 din 5 nu aveau afecțiuni medicale preexistente. Toți 5 primiseră

diversi agenți antivirali și steroizi (Tabelul 1). Plasma convalescentă a fost administrată între 10 și 22 de zile de la internare.

Valoarea Ct la momentul internării a variat de la 18,9 la 38,0, iar în ziua transfuziei plasmatică de la 22,0 la 35,9 (Tabelul 2 și Figura 1A). A crescut (s-a îmbunătățit) în decurs de 1 zi după transfuzie. Valoarea Ct a pacientului 5 a devenit negativă în ziua 1 post-transfuzie, a pacientului 3 și 4 a devenit negativă în ziua 3, iar a pacientului 1 și 2 a devenit negativă în ziua 12 după transfuzie (tabelul 2).

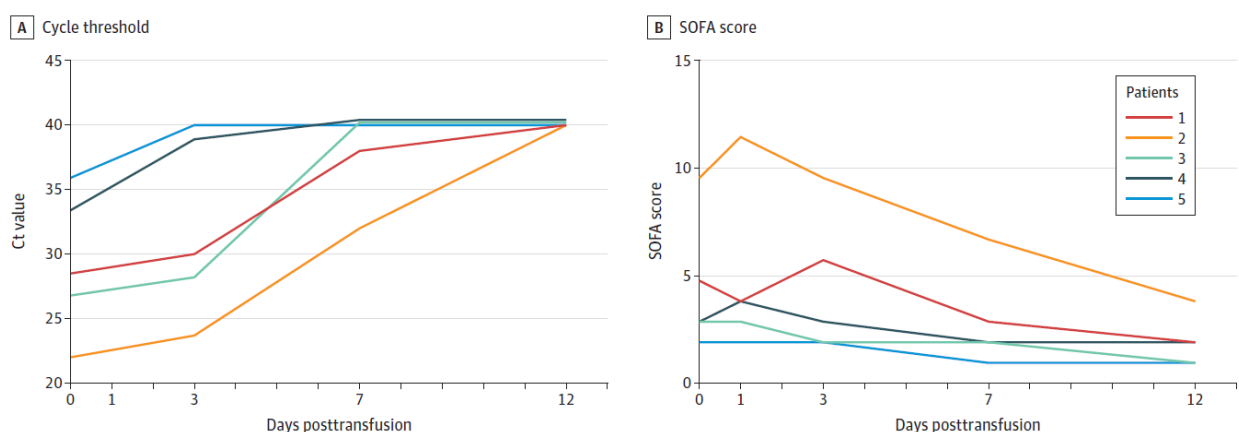
Scorul SOFA a variat de la 2 la 10 înainte de transfuzia plasmatică și a scăzut la un interval de 1 până la 4 la 12 zile după transfuzie (tabelul 2 și figura 1B). PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> a variat de la 172 la 276 înainte de transfuzie și a crescut (s-a îmbunătățit) la 4 din 5 pacienți în decurs de 7 zile după transfuzie (interval total, 206-290) și a crescut substanțial (interval, 284-366) în a 12 a zi după tratamentul cu plasmă (tabelul 2 și figura 1C). Temperatura corpului a variat între 37,6 și 39°C înainte de transfuzia plasmatică și a scăzut la intervalul normal în a treia zi după transfuzie (tabelul 2 și figura 1D).

După tratament, valorile biomarkerilor inflamatori CRP, procalcitonină și IL-6 ale pacienților 1, 2, 4 și 5 au scăzut; au scăzut valorile CRP și procalcitoninei pacientului 3 (tabelul 2).

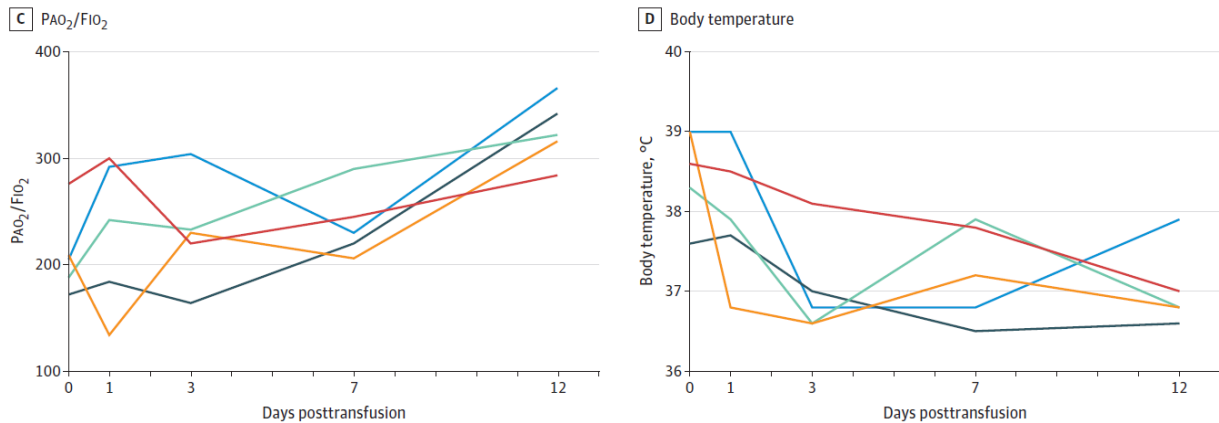
Scanările tomografiei computerizate ale plămânilor acestor pacienți au demonstrat toate pneumoniile severe înainte de transfuzia plasmatică și au arătat îmbunătățirea leziunii pulmonare a pacientului 1 în a treia zi de la transfuzia plasmatică (eFigura 1 în [Supliment](#)) și rezolvarea treptată a leziunilor pulmonare ale celorlalți pacienți la 3 zile după tratamentul cu plasmă (figurile 2, 3, 4 și 5 din [Supliment](#)).

Cu o zi înainte de administrare a plasmei convalescente, titrurile RBD specifice IgG și Ig MELISA ale donatorilor au fost cuprinse între 1800 și 16 200 (titruri de diluare a punctului final ELISA) (Tabelul 3). Titrurile de neutralizare împotriva SARS-CoV-2 variaua între 80 și 480 (neutralizarea titrurilor de diluare a punctelor finale). Titlurile RBD specifice IgG ELISA a 5 beneficiari au fost cuprinse între 1800 și 48 600, iar titrurile IgM între 5400 și 145 800 pe zi înainte de transfuzia convalescentă (etabelul din [Supliment](#)). După transfuzia plasmei convalescente, titrurile de IgG și IgM în serile acestor pacienți au crescut într-un mod dependent de timp.

Figura 1. Modificări temporale ale valorii pragului ciclului, PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub>, scor SOFA și temperatura corpului la pacienții care primesc transfuzie de plasmă convalescentă







A, Valoarea modificării pragului ciclului (Ct) în tamponarele nazofaringiene ale pacienților infectați în ziua 0, ziua 3, ziua 7 și ziua 12 după transfuzia plasmatică. O valoare Ct de 40 a fost definită drept nedetectabilă. B, modificarea scorului de evaluare a eșecului organelor legate de sepsis (SOFA) la pacienții cu tratament plasmatic convalescent (interval 0-24, scorurile mai mari indică o boală mai severă; vezi nota de subsol la tabelul 2 pentru o definiție mai completă). C, Modificarea raportului PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> al pacienților tratați în ziua 0 până în ziua 12 după tratament. D, modificarea temperaturii corporale a celor 5 pacienți în urma transfuziei plasmaticice.

Tabelul 3. Caracteristicile și tritrul anticorpilor al donatorilor de plasmă convalescentă

	Donors <sup>a</sup>				
	1	2	3	4	5
Blood type	B	B	B	A	B
Donated plasma volume, mL	400	400	400	400	400
Interval between symptom onset and discharge, d	11	11	13	13	11
Interval between discharge and plasma donation, d	11	11	13	11	12
RBD-specific IgG ELISA titer <sup>b</sup>	16 200	1800	1800	5400	16 200
RBD-specific IgM ELISA titer <sup>c</sup>	16 200	1800	5400	5400	5400
Neutralizing antibody titer <sup>d</sup>	240	80	120	240	480

Abreviere: RBD, domeniu de legare a receptorilor.

<sup>a</sup> Donatorii-pacienții au fost asociați pe baza numerelor (donatorul 1 a dat plasmă pacientului 1, etc).

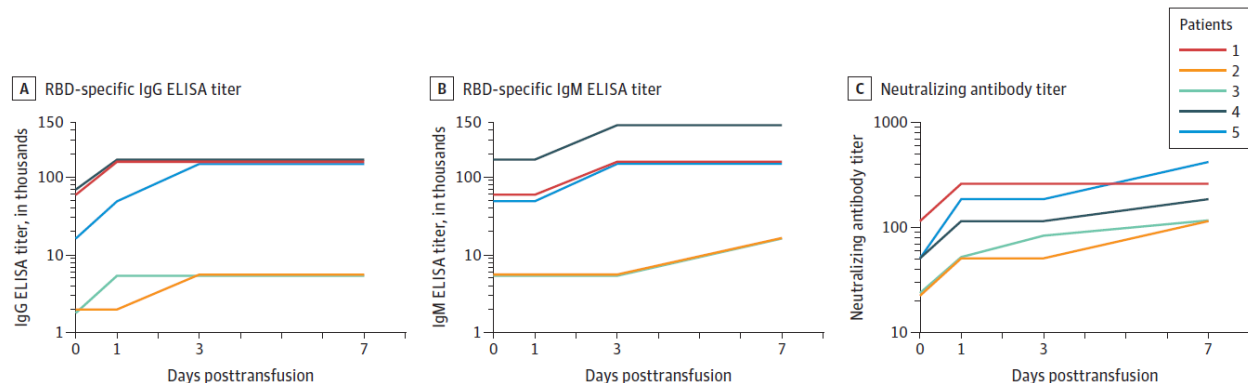
<sup>b</sup> Titrurile de diluare a punctului final ELISA (anticorp IgG). Titrul preconizat negativ de control de la o persoană sănătoasă este de  $\leq 200$ .

<sup>c</sup> Titrurile de diluare a punctului final ELISA (anticorp IgG). Titrul preconizat negativ de control de la o persoană sănătoasă este de  $\leq 200$ .

Titrurile de diluare a punctului final de neutralizare. Titrul preconizat negativ de control de la o persoană sănătoasă este de  $\leq 10$ .

Titlurile de IgG ale pacienților tratați au crescut la 145 800, 5400, 5400, 145 800 și 145 800, iar titrurile IgM au crescut la 145 800, 5400, 5400, 437 400 și, respectiv, 145 800, la 3 zile după transfuzie. Aceste titruri de IgG și IgM s-au menținut la un nivel ridicat la 7 zile de la transfuzie (fig. 2A și 2B; eTable în supliment). Titrurile de anticorpi de neutralizare ale celor 5 receptori au fost cuprinse între 40 și 160 înainte de transfuzie; la o zi după transfuzie, titrurile au crescut la 320, 80, 80, 160 și 240; în ziua a 7-a, au fost 320, 160, 160, 240 și, respectiv, 480 (figura 2C; eTable în [Supliment](#)).

Figura 2. Modificări ale domeniului de legare a receptorului - IgS și IgM specifice ELISA și titruri de anticorpi neutralizanți înainte și după transfuzia de plasmă convalescentă la pacienți



Valorile mai mari ale titrului indică o protecție mai mare. A, Variația titrului ELISA IgG specific RBD. B, Variația titrului Ig MELISA specific RBD. C, Variația titrului de anticorpi neutralizant față de SARS-CoV-2 la receptori în ziua 0, ziua 1, ziua 3 și ziua 7 după transfuzie. Segmentele de linie identice au fost ușor ajustate pentru a evita suprapunerea. RBD indică domeniul de legare a receptorilor.

Toți cei 5 pacienți au primit ventilație mecanică în momentul transfuziei și 3 pacienți (pacienți 3, 4 și 5) au fost scoși de pe ventilația mecanică (tabelul 2). Pacientul 2 a primit ECMO în momentul tratamentului cu plasmă, dar nu a necesitat ECMO în ziua 5 după transfuzie (tabelul 2). Pacienții 3, 4 și 5 au fost eliberați din spital (durata șederii: 53, 51 și, respectiv, 55 de zile). Începând cu 25 martie 2020, pacienții 1 și 2 au rămas spitalizați, cu durata de ședere de 37 de zile fiecare.

## Dezbatere

În acest caz, 5 pacienți bolnavi critic de COVID-19 au fost tratați cu plasma convalescentă. După cum a fost evaluat de Ct, încărcătura virală a scăzut la câteva zile de la tratamentul cu plasmă convalescentă, iar condițiile clinice ale acestor pacienți s-au îmbunătățit, așa cum este indicat prin reducerea temperaturii corporale, PAO<sub>2</sub> / FIO<sub>2</sub> îmbunătățită și imaginile toracice. Patru pacienții care au primit ventilație mecanică și ECMO nu au mai necesitat sprijin respirator la 9 zile de la transfuzia plasmatică.

Studii anterioare au raportat utilizarea transfuziei de plasma convalescente în tratamentul diferitelor infecții.<sup>6,10,16</sup> De exemplu, pacienții (n = 50) cu SARS au avut o rată de externare semnificativ mai mare până în ziua 22 după debutul bolii (73,4% față de 19,0%; P < 0,001) și o rată mai mică de mortalitate (0% față de 23,8%; P = 0,049) în grupul de tratament convalescent în plasmă (n = 19 pacienți) în comparație cu grupul de tratament cu steroizi (n = 21).<sup>17</sup> Într-un alt studiu efectuat pe 93 de pacienți cu gripă A (H1N1), pacienții care au primit tratament cu plasmă convalescentă (n = 20) comparativ cu cei din grupul de control (n = 73) au avut semnificativ mai puține decese (20% față de 54,8%; P = 0,01) și un număr mai mic de limfocite mediane la internarea în ATI<sup>10</sup>.

În acest studiu, colectarea și transfuzia plasmei s-au făcut așa cum s-a raportat anterior.<sup>10</sup> În plus, plasma a fost obținută de la donatori și transfuzată la destinatari în aceeași zi, ceea ce contribuie la păstrarea activității naturale a plasmei.

Studiile au arătat că încărcăturile virale sunt puternic corelate cu severitatea și progresia bolii.<sup>18</sup> Rezultatul fatal al infecției gripei A (H5N1) a fost asociat cu încărcarea virală ridicată and hypercytokinemia.<sup>19</sup> În afară de tratamentul antiviral, anticorpul neutralizant specific virusului, care ar putea accelera eliminarea virusului și împiedica intrarea în celulele țintă, servește ca principal mecanism pentru restricția și eliminarea virusurilor de către gazdă.<sup>20-22</sup> În studiul actual, SARS-CoV-2 era încă detectabil în toți cei 5 pacienți, chiar dacă tratamentul antiviral a fost administrat timp de cel puțin 10 zile, însă încărcătura virală a scăzut și a devenit nedetectabilă la scurt timp după tratamentul cu plasma convalescentă.

După cum a fost determinat prin intermediul ELISA, toată plasma de la donatori a avut titruri ridicate specifice virusului IgG și Ig MELISA. Mai mult, titrurile de anticorpi neutralizanți, vitale pentru restricționarea infecției virale a celor 5 receptori, au crescut semnificativ după transfuzia plasmatică. Rezultatele evidențiază posibilitatea ca anticorpii din plasma convalescentă să fi contribuit la eliminarea virusului și, de asemenea, la îmbunătățirea simptomelor. În plus față de anticorpii neutralizanți virali, accelerarea eliminării celulelor infectate de către anticorpi a fost găsită și într-un studiu in vivo al virusului HIV-1<sup>23</sup>. În studiul curent, toți pacienții au primit agenți antivirali, inclusiv interferon și lopinavir / ritonavir, în timpul și după tratament plasmatic convalescent, care, de asemenea, a contribuit la procesul de eliminare a virusului observat.

## Limitări

Acest studiu are mai multe limitări. În primul rând, aceasta a fost o serie de cazuri mici, care nu includea niciun control. În al doilea rând, nu este clar dacă starea acestor pacienți s-ar fi îmbunătățit fără transfuzia de plasmă convalescentă, deși modificarea Ct și PAO2 / FIO2 reprezintă rezultate încurajatoare. În al treilea rând, toți pacienții au fost tratați cu alți agenți multipli (inclusiv medicamente antivirale) și nu este posibil să se stabilească dacă îmbunătățirea observată ar fi putut fi legată de terapii, altele decât plasma convalescentă. În al patrulea rând, transfuzia plasmatică a fost administrată la 10 până la 22 de zile de la internare; nu poate fi determinat dacă un moment diferit de administrare ar fi fost asociat cu rezultate diferite. În al cincilea rând, nu se cunoaște dacă această abordare ar reduce rata de mortalitate.

## Concluzii

În această serie de cazuri preliminare necontrolate de 5 pacienți critici cu COVID-19 și ARDS, administrarea de plasmă convalescentă care conține anticorp neutralizant a fost urmată de îmbunătățirea stării clinice a pacienților. Dimensiunea limitată a eșantionului și designul studiului împiedică o afirmație definitivă despre eficacitatea potențială a acestui tratament, iar aceste observații necesită evaluare în studiile clinice.

---

## INFORMATII ARTICOL

**Accepted for Publication:** March 20, 2020.

**Published Online:** March 27, 2020.

doi:[10.1001/jama.2020.4783](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783)

Author Affiliations: Shenzhen Key Laboratory of Pathogen and Immunity, National Clinical Research Center for Infectious Disease, State Key Discipline of Infectious Disease, Shenzhen Third People's Hospital, Second Hospital Affiliated to Southern University of Science and Technology, Shenzhen, China (Shen, Z.Wang, Zhao, Y. Yang, J. Li, Yuan, F.Wang, D. Li, M. Yang, Xing, Wei, Xiao, Y. Yang, Qu, Qing, L. Chen, Xu, Peng, Y. Li, Zheng, F. Chen, Huang, Jiang, D. Liu, Zhang, Y. Liu, L. Liu); Laboratory of Protein Engineering and Vaccines, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Tianjin, China (D. Li, Xiao).

**Author Contributions:** Dr L. Liu had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Shen, Z.Wang, Zhao, and Y. Yang contributed equally.

**Concept and design:** Shen, Z.Wang, Yuan, F.Wang, D. Liu, Zhang, Y. Liu, L. Liu. **Acquisition, analysis, or interpretation of data:** Shen, Yang Yang, J. Li, Yuan, D. Li, M. Yang, Xing,Wei, Xiao, Yan Yang, Qu, Qing, L. Chen, Xu, Peng, Y. Li, Zheng, F. Chen, Huang, Jiang, Y. Liu, L. Liu.

**Drafting of the manuscript:** Shen, Zhao, Yang Yang, J. Li, Yuan, F.Wang,M. Yang, Xing,Wei, Xiao, Yan Yang, Qu, Qing, L. Chen, Xu, Zheng, Huang, Jiang, D. Liu, Y. Liu, L. Liu.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Shen, Z.Wang, Yang Yang, Yuan, D. Li, Peng, Y. Li, F. Chen, Zhang, Y. Liu, L. Liu.

**Statistical analysis:** Yuan.

**Obtained funding:** Yuan, Zhang, Y. Liu, L. Liu.

**Administrative, technical, or material support:** Shen, Zhao, J. Li, Yuan, F.Wang, D. Li, M. Yang, Yan Yang, Qu, Qing, L. Chen, Zhang.

**Supervision:** Z.Wang, Yuan, Zhang, Y. Liu, L. Liu.

**Conflict of Interest Disclosures:** None reported.

**Funding/Support:** This work was supported by the National Science and Technology Major Project (2018ZX10711001, 2017ZX10103011, 2017ZX10204401), Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZSM201412003, SZSM201512005), China Postdoctoral Science Foundation (2019T120147, 2018M641508), Shenzhen Science and Technology Research and Development Project (202002073000001), National Natural Science Foundation of China (81902058), Shenzhen Science and Technology Research and Development Project (202002073000002), and The Key Technology R&D Program of Tianjin (17YFZCSY01090).

**Role of the Funder/Sponsor:** The funding agencies had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

## REFERINTE

13. Yang Y, Yang M, Shen C, et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. Preprint. *medRxiv*. Preprint posted online February 17, 2020. doi:[10.1101/2020.02.11.20021493](https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493)
14. Villar J, Blanco J, del Campo R, et al; Spanish Initiative for Epidemiology, Stratification & Therapies for ARDS (SIESTA) Network. Assessment of PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> for stratification of patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome. *BMJ Open*. 2015;5(3):e006812. doi:[10.1136/bmjopen-2014-006812](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006812)
15. Liu C, Yang Y, Gao Y, et al. Viral architecture of SARS-CoV-2 with post-fusion spike revealed by Cryo-EM. *bioRxiv*. Preprint posted online March 5, 2020. doi:[10.1101/2020.03.02.972927](https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972927)
16. Yeh KM, Chiueh TS, Siu LK, et al. Experience of using convalescent plasma for severe acute respiratory syndrome among healthcare workers in a Taiwan hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(5):919-922.
17. Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, et al; Convalescent Plasma Study Group. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis*. 2015;211(1):80-90.
18. Ng KT, Oong XY, Lim SH, et al. Viral load and sequence analysis reveal the symptom severity, diversity, and transmission clusters of rhinovirus infections. *Clin Infect Dis*. 2018;67(2):261-268.
19. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. 2006;12(10):1203-1207.
20. Shen C, Chen J, Li R, et al. A multimechanistic antibody targeting the receptor binding site potently cross-protects against influenza B viruses. *Sci Transl Med*. 2017;9(412):eaam5752.
21. Shen C, Zhang M, Chen Y, et al. An IgM antibody targeting the receptor binding site of influenza B blocks viral infection with great breadth and potency. *Theranostics*. 2019;9(1):210-231.
22. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv*. Preprint posted online March 12, 2020. doi:[10.1101/2020.03.11.987958](https://doi.org/10.1101/2020.03.11.987958)
23. Lu CL, Murakowski DK, Bournazos S, et al. Enhanced clearance of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo. *Science*. 2016;352(6288):1001-1004.