
BC

biochimica clinica

**In questo numero:
PANDEMIA DA SARS-COV-2 (COVID-19)**



SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di
International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)



sommario

SS3

- S5** Presentazione
MS. Graziani
- S8** Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2
M. Plebani
- S13** Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19)
G. Lippi, GL. Salvagno, C. Mattiuzzi
- S19** Mortalità da COVID-19: una epidemia senza denominatore. Ma conosciamo il numeratore?
L. Zanolla
- S26** Alla scoperta della patogenesi del COVID-19
M. Franchini
- S28** Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare.
BM. Henry, J. Vikse, S. Benoit, EJ. Favaloro, G. Lippi
- S39** Diagnosi del diabete gestazionale durante l'emergenza COVID-19: semplificazione del protocollo
A. Mosca, M. Montagnana
- S47** Importanza dello screening per il deficit di G6PD durante l'emergenza Covid-19
A. Mosca, E. Capoluongo
- S49** COVID-19 e coagulazione: un legame indissolubile
M. Franchini
- S50** Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19)
B. Morelli, B. Montaruli, M. Bazzan, P. Calzoni, P. Fassina, P. Pradella, per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi
- S61** Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19
B. Montaruli, B. Morelli, M. Marchetti, M. Bazzan per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi
- S73** Al "cuore" del quadro clinico di COVID-19
L. Zanolla, MS. Graziani
- S94** Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists
M. Ammirabile, A. Aita, A. Bartolini, F. Spolaore, M. Scapatucci, C. Pellegrini, M. Perrone, G. Sancesario

sommario

- S104** SARS-CoV-2: nuove prospettive della diagnostica di laboratorio
B. Lo Sasso, RV. Giglio, CM. Gambino, G. Bivona, M. Ciaccio
- S114** Valutazione di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 su Maglumi 800 (Snibe)
F. Ceriotti, A. Maregnani, M. Stollo, M. Locatelli
- S119** Prevalenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 in una popolazione di operatori sanitari e amministrativi di un ospedale toscano
F. Balboni, A. Baldini, G. Forgeschi, F. Sequi, S. Burbui, G. Lippi
- S123** Determinazione degli anticorpi IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 mediante piattaforma iFlash1800 CLIA in una casistica italiana
I. Bottari, M. Resta, P. Gatti, D. Potenza, B. Andriulo, V. Cornacchiulo
- S129** The role of acute phase proteins for predicting SARS-CoV-2 positivity upon emergency department admission
GL. Salvagno, F. Sanchis-Gomar, G. Lo Cascio, S. Denitto, BM. Henry, G. Lippi
- S134** Kinetics of SARS-CoV-2 IgG response: a model from a case report
E. Rocchi, S. Peluso, D. Sisti
- S137** Sindrome simil-Kawasaki in una bambina positiva al SARS-CoV-2: l'approccio di laboratorio
E. Palella, F. Spolaore, M. Corbo, S. Fasanella, P. Caciagli

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

*Biochimica Clinica è indicizzata in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) e ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*
*Biochimica Clinica is indexed in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) and ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

Ferruccio Ceriotti
Davide Giavarina
Bruna Lo Sasso
Giampaolo Merlini
Martina Montagnana
Andrea Mosca
Paola Pezzati
Rossella Tomaiuolo
Matteo Vidali

International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*
Sergio Bernardini *Italy*
Marcello Ciaccio *Italy*
Eleftherios Diamandis *Canada*
Philippe Gillery *France*
Kjell Grankvist *Sweden*
Hans Jacobs *The Netherlands*
Eric Kilpatrick *UK*
Magdalena Krintus *Poland*
Giuseppe Lippi *Italy*
Mario Plebani *Italy*
Sverre Sandberg *Norway*
Ana-Maria Simundic *Croatia*
Tommaso Trenti *Italy*
Cas Weykamp *The Netherlands*
Maria Willrich *USA*
Paul Yip *Canada*

Editorial Secretary

Arianna Lucini Paioni
biochimica.clinica@sibioc.it
Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
Tel. 0245498282
Fax 0245498199
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
www.biomedica.net

SIBioC Executive Board 2020-2021

Fiamma Balboni
Umberto Basile
Sergio Bernardini *Past President*
Ciriaco Carru
Giorgio Da Rin
Giuseppe Lippi
Martina Montagnana
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Laura Sciacovelli *Presidente*
Tommaso Trenti

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282



utilizza un Sistema di
Gestione Qualità Certificato
per l'attività di

Fornitura di
servizi per la progettazione,
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo
Euro 50 per Italia/Privati
Euro 75 per Italia/Enti
Euro 75 per Estero/Privati
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 2000 copie
2000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è
consentito esclusivamente per uso personale
e non può essere in alcun modo esteso ad
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

Volume 44
Special Supplement 3

Presentazione del Supplemento

Cari Lettori,

come forse ricorderete nella scorsa primavera, quando l'Italia è stata investita dalla "prima ondata" della pandemia da Coronavirus, è stata lanciata da Biochimica Clinica una "call for papers" per la preparazione di un fascicolo dedicato al tema, allo scopo di mettere a disposizione della nostra comunità scientifica le conoscenze e le esperienze maturate nel nostro Paese.

Molti di voi hanno risposto con entusiasmo e molti contributi sono stati ricevuti, revisionati e pubblicati on line in tempi rapidi. Ora che possiamo considerare conclusa questa prima fase (anche se l'infezione continua ad essere seriamente presente), ho ritenuto di chiudere il fascicolo e di procedere alla sua pubblicazione on line.

Altri contributi su questo specifico argomento che dovessero giungere in redazione successivamente, verranno inseriti nei fascicoli regolari della Rivista.

È possibile che il contenuto di alcuni contributi risulti per qualche aspetto attualmente superato in ragione delle nuove conoscenze ed esperienze che si sono accumulate nei mesi successivi all'iniziativa di Biochimica Clinica (Aprile 2020), tuttavia tutti gli articoli restano una valida testimonianza di quanto il divenire della scienza e la maturazione delle competenze conduca ad una migliore comprensione del reale.

Il fascicolo conta 18 contributi: gli Editori Associati, la redazione di BC ed io personalmente siamo estremamente grati agli Autori che hanno voluto dedicare tempo ed impegno a preparare ed inviare i loro contributi al nostro giornale, nonostante la pressione cui sono stati (e sono ancora) sottoposti gli Ospedali e i Laboratori Clinici per far fronte alle aumentate richieste di assistenza.

Troverete che in questo fascicolo, le diverse tipologie di articoli non seguono il consueto ordine (Editoriali, Rassegne, Contributi Originali, Opinioni, Documenti, Lettere e Casi Clinici); è stato infatti scelto di accorpare i contributi per argomenti trattati piuttosto che per tipologia di articolo.

Il fascicolo si apre con il contributo di M Plebani sul ruolo essenziale della Medicina di Laboratorio sia per la gestione del singolo paziente che della popolazione nel corso della pandemia (1); questo drammatico evento infatti ha portato in piena luce il valore della Medicina di Laboratorio, come forse mai era accaduto in passato e questo contributo lo illustra mirabilmente con esempi concreti.

G Lippi, che ricordiamo è stato nominato Coordinatore della "Task Force on COVID-19" di IFCC, firma il secondo articolo che costituisce una vera e propria Guida alla diagnostica di Laboratorio della malattia (2), molto utile anche da un punto di vista pratico per orientare correttamente il professionista.

Successivamente, una Opinione a cura di L Zanolla (3), induce a riflettere, grazie ad una solida base di dati disponibili, sulla notevole difficoltà, nei mesi trascorsi, di conoscere con sufficiente accuratezza il tasso di mortalità (ma anche quello di ospedalizzazione). Probabilmente, a causa delle strategie diagnostiche adottate nella prima fase, questi numeri non saranno mai conosciuti nella loro completezza, e non solo in Italia.

Il quarto contributo è la traduzione, che ho curato personalmente, di una mirabile rassegna pubblicata su Chimica Clinica Acta di BM Henry et al. (4) che esplora i meccanismi patogenetici che causano una disregolazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone durante l'infezione da COVID-19; questa alterazione, accompagnata da iper-infiammazione porta ai fenomeni di immuno-trombosi microvascolare dimostratisi molto spesso fatali, specialmente nei primi mesi della epidemia. La traduzione è preceduta da una Introduzione di M Franchini (4) che sottolinea come la comprensione di tali meccanismi patogenetici possa portare (come poi è effettivamente avvenuto) all'adozione di protocolli terapeutici molto efficaci.

Di seguito è pubblicato un documento congiunto tra la Società Italiana di Diabetologia (SID) e l'Associazione Medici Diabetologi (AMD) che fornisce alcune raccomandazioni per una semplificazione del protocollo per la diagnosi di diabete in gravidanza durante questa emergenza (5), al fine di accelerare il percorso diagnostico. Il documento è preceduto dalla Introduzione di A Mosca et al. (5) che riassume i contenuti del documento stesso e ne esplicita il razionale che lo sottende.

Segue una Opinione di A Mosca et al. (6) nella quale si sottolinea come sia raccomandabile eseguire lo screening

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona. E-mail mariastella@graziani.eu

Ricevuto: 17.11.2020

Accettato: 18.11.2020

Pubblicato on-line: 20.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.102

per il deficit di G6PD nei pazienti candidati alla terapia con idrossiclorochina, farmaco in grado di scatenare importanti crisi emolitiche e che era sembrato molto promettente nelle prime fasi della pandemia.

Troviamo poi un gruppo di tre contributi che affrontano il tema delle alterazioni dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2. L'Editoriale di M Franchini sottolinea la rilevanza clinica delle alterazioni del sistema della coagulazione indotte dall'infezione (7). L'Autore, uno dei massimi esperti nazionali sul tema, richiama l'attenzione sui due successivi articoli a cura del GdS Societario "Emostasi" (8,9). Il primo è una accurata rassegna a cura di B Morelli et al. (8) che presenta e discute i dati presenti in letteratura relativi ai meccanismi che inducono i gravi sbilanciamenti dell'emostasi nel corso dell' infezione da SARS-CoV-2. Il secondo è un Documento del Gruppo di Studio SIBioC "Emostasi" a cura di B Montaruli et al. (9) che illustra egregiamente quale debba essere il contributo del Laboratorio Clinico al monitoraggio di questa grave e potenzialmente fatale complicanza dell'infezione.

Una rassegna a cura di L Zanolla et al. pone poi l'attenzione sul coinvolgimento cardiaco nei pazienti con COVID-19 (10). È noto che i pazienti con malattie cardiache (come evidenziato dall'aumento delle concentrazioni circolanti dei biomarcatori di danno cardiaco e di ridotta funzionalità) hanno una prognosi peggiore e la rassegna esamina in dettaglio la letteratura a disposizione sottolineando i diversi meccanismi che possono causare il danno cardiaco. È importante sottolineare come in questa rassegna (10) venga ripreso un tema evidenziato nel contributo di apertura di M Plebani (1) e ripreso anche da B Morelli (8) e precisamente quello della scarsa attenzione ai dati di laboratorio riportati nella letteratura clinica relativa. Esiste una preoccupante confusione sulla nomenclatura, sulle unità di misura, sui valori di riferimento che accompagnano le concentrazioni dei biomarcatori, variabili che rendono difficile la corretta interpretazione dei dati presentati e inibiscono probabilmente una adeguata formulazione delle meta-analisi. È sperabile che queste rilevanti incongruenze siano state causate dall' urgenza di comunicare e di condividere le esperienze originatesi nelle prime fasi di questa nuova infezione e che nel futuro queste criticità vengano superate, come richiamato da molti professionisti della Medicina di Laboratorio.

I due articoli successivi descrivono invece le esperienze maturate da un gruppo di giovani professionisti (appartenenti al GdS Young Scientists di SIBioC) grazie al loro coinvolgimento nella operatività dei Laboratori Clinici durante la pandemia (M Ammirabile et al.) (11) e l'Opinione di B Lo Sasso et al. sui promettenti nuovi biomarcatori per la diagnosi, la prognosi e il monitoraggio dell'infezione (12). Questi biomarcatori, sul cui utilizzo non sono ancora disponibili evidenze sufficientemente robuste, debbono tuttavia essere tenuti in considerazione per le loro indiscusse potenzialità.

Il gruppo successivo è costituito da tre studi originali sulla misurazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 sia nei pazienti che negli operatori sanitari (13-15). Questi lavori forniscono un importante contributo alla comprensione sia dell' epidemiologia dell' infezione negli operatori sanitari (F Balboni et al.) (14), che sulla risposta immune in gruppi di pazienti appartenenti a Regioni Italiane con diversa prevalenza della infezione (F Ceriotti et al. e I Bottari et al.) (13,15).

Un ulteriore studio originale, a cura di GL Salvagno et al, affronta il tema della aumentata concentrazione dei parametri di flogosi nei pazienti infetti (16) e, confrontando i valori di questi biomarcatori con quelli misurati in pazienti non-infetti ma con sintomi simili, ne raccomanda l'utilizzo per monitoraggio e prognosi piuttosto che per un indirizzo diagnostico, come è stato invece suggerito in alcuni studi. Questo contributo, che è stato l'ultimo in ordine di tempo ad essere inserito nel fascicolo, è particolarmente interessante perché espone una esperienza maturata nel periodo più recente della epidemia.

Chiudono il fascicolo una Lettera all'Editore di E Rocchi et al. che propone una ipotesi di cinetica della risposta anticorpale che sebbene necessiti di ulteriori conferme, rappresenta un interessante approccio di studio (17) e un Caso Clinico, a cura di E Palella et al. che illustra la presentazione di una sindrome simil-Kawasaki in una bambina di 3 anni (18). Questo caso è interessante perché attira l'attenzione su questa rara sindrome, apparsa numericamente maggiore nel corso della pandemia e sottolinea l'apporto del laboratorio clinico per la sua diagnosi e il monitoraggio.

Come i Lettori avranno modo di apprezzare, i contenuti del fascicolo affrontano molteplici aspetti della epidemia in corso; mi auguro che la lettura di questi contributi possa aiutare sia nella comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia, come pure servire da indirizzo per i percorsi intra-laboratorio da adottare per una corretta gestione dei pazienti e per assicurare loro il migliore esito possibile. Non va mai dimenticato infatti che questo è il fine ultimo della nostra professione.

Augurandovi buona lettura e auspicando di ricevere ulteriori contributi su questo tema, vi invio i miei più cordiali saluti, unitamente ai migliori auguri per le festività ormai prossime che saranno purtroppo e molto probabilmente, alquanto diverse da come le abbiamo vissute nel corso delle nostre vite.

Maria Stella Graziani

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S8-S12.
2. Lippi G, GL Salvagno, C Mattiuzzi. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020; Suppl3:S13-S18.
3. Zanolli L. Mortalità da COVID-19: una epidemia senza denominatore. Ma conosciamo il numeratore? *Biochim Clin* 2020; Suppl3:S19-S25.
4. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Chim Clin Acta* 2020 doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.027. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. Traduzione Italiana a cura di Graziani MS. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S28-S38.
5. Mosca A, Montagnana M. Diagnosi del diabete gestazionale durante l'emergenza COVID-19: semplificazione del protocollo. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S39-S46.
6. Mosca A, Capoluongo E. Importanza dello screening per il deficit di G6PD durante l'emergenza COVID-19. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S47-S48.
7. Franchini M. COVID-19 e coagulazione: un legame indissolubile. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S49.
8. Morelli B, Montaruli B, Bazzan E, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S50-S60.
9. Montaruli B, Morelli B, Marchetti M, et al. Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S61-S72.
10. Zanolli L, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico di COVID-19. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S73-S93.
11. Ammirabile M, Aita A, Bartolini A, et al. Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S94-S103.
12. Lo Sasso B, Lo Giglio RV, Gambino CM et al. SARS-CoV-2: nuove prospettive della diagnostica di laboratorio. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S104-S113.
13. Ceriotti F, Maregnani A, Stollo M, et al. Valutazione di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 su Maglumi 800 (Snibe). *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S114-S118.
14. Balboni F, Baldini A, G. Forgeschi G, et al. Prevalenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 in una popolazione di operatori sanitari e amministrativi di un ospedale toscano. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S119-S122.
15. Bottari I, Resta M, Gatti P, et al. Determinazione degli anticorpi IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 mediante piattaforma iFlash1800 CLIA in una casistica italiana. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S123-S128.
16. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Lo Cascio G, et al. The role of acute phase proteins for predicting SARS-CoV-2 positivity upon emergency department admission. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S129-S133.
17. Rocchi E, Peluso S, Sisti D. Kinetics of SARS-CoV-2 IgG response: a model from a case report. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S134-S136.
18. Palella E, Spolaore F, Corbo M, et al. Sindrome simil-Kawasaki in una bambina positiva al SARS-CoV-2: l'approccio di laboratorio. *Biochim Clin* 2020;Suppl3:S137-S140.

Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2

Mario Plebani

Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

The value of laboratory medicine in SARS-CoV-2 outbreak.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) represents a challenge to all healthcare systems. It represents, however, a formidable opportunity to highlight the value of laboratory medicine. Laboratory tests, in fact, play a key role in allowing the etiological diagnosis thanks to the reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) to detect the virus in nasopharyngeal specimens as well as in other samples collected by using a flocked swab. The second essential contribution that laboratory tests are providing encompasses staging, prognostication and therapeutic monitoring of COVID-19. Finally, serological tests play a central role for surveillance purposes, for using plasma containing antibodies from recovered patients as experimental treatment and for better understanding the immune response to SARS-CoV-2 to eventually address vaccine developments.

INTRODUZIONE

La pandemia da SARS-CoV-2, nella sua drammatica manifestazione, oltre alle migliaia di decessi, pazienti con malattia severa e lunghe degenze in reparti ospedalieri e in isolamento domiciliare, ha portato finalmente alla luce il valore e la centralità della medicina di laboratorio. Più che decine di pubblicazioni scientifiche, relazioni a congressi e documenti di Società Scientifiche e Organismi professionali, il "COVID" ha illustrato a tutti i cittadini e pazienti quale sia il valore dell'analisi di laboratorio.

All'inizio era il virus, un virus "cinese" che a Wuhan e nella provincia dell'Hubei aveva portato a quello che oggi abbiamo ben conosciuto con il termine "lockdown"; ma dalla Cina non era arrivato chiaro e forte il messaggio dell'importanza della medicina di laboratorio. Poi, alcuni lavori scientifici hanno dimostrato che anche gli asintomatici possono essere contagiosi e la certezza si è andata concretizzando esaminando il caso della nave da crociera Diamond Princess, magnifico modello di studio che si è avvalso della diagnostica molecolare per scovare i positivi (1).

LA DIAGNOSI

Se la diagnosi non può essere clinica, dato che anche gli asintomatici sono "infetti e contagiosi", l'unica modalità per ridurre l'incertezza diagnostica e clinica è l'analisi di laboratorio. La sequenza del genoma virale è stata resa pubblica per l'immediato utilizzo per la salute pubblica, il 10 gennaio 2020 attraverso il canale online "virological.org" (2) e successivamente sono state depositate nel database curato dalla Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) altre quattro sequenze del genoma. La conoscenza del genoma virale ha così permesso lo sviluppo di metodi per la ricerca del virus nelle secrezioni respiratorie, così come era avvenuto nel caso degli altri coronavirus SARS-CoV e Mers-CoV, ma questa volta lo strumento ha declinato tutta la sua potenza nella pratica clinica. Lo studio del genoma ed in particolare del riscontro dei target genetici quali "envelope protein gene" (E), "nucleo capsid protein gene" (N), "RNA-dependent RNA polymerase gene" (RdRp) e "open reading frame" (orf 1^o/orf 1b) ha portato vari gruppi a definire i primer e le sonde appropriate per la reazione di real-time (RT-PCR) (3). Più recentemente, il gruppo di Christian Drosten ha descritto lo sviluppo di reverse transcriptase

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Università di Padova
Via Giustiniani,2 - 35128 Padova, Tel 0498212792, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 09.05.2020

Revisionato: 11.05.2020

Accettato: 11.05.2020

Pubblicato on-line: 18.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.053

polymerase chain reaction (rRT-PCR) con l'utilizzo di costrutti sintetici ed il virus SARS per rilevare l'infezione da SARS-CoV-2 (4). Nella linea-guida per la diagnosi del COVID-19 in Korea, vengono riportati i protocolli di rRT-PCR più utilizzati al momento (Tabella 1), che si differenziano sostanzialmente nei bersagli genetici, e quindi nelle sonde e procedure operative correlate (5). Ad oggi, non è disponibile una reale analisi dell'accuratezza diagnostica dei vari metodi commerciali e di quelli "home-brew", ossia sviluppati dai laboratori clinici, ma certamente tutta l'opinione pubblica ha compreso l'importanza dei "tamponi". Mai come in questo caso, quindi saranno necessari l'introduzione di programmi di VEQ, di adozione di protocolli operativi di controllo interno e lo scambio di conoscenze fra gruppi di lavoro e laboratori.

L'analisi molecolare è divenuta il gold standard per la diagnostica dell'infezione, tanto che si definisce "caso confermato" un caso con positività dell'analisi rRT-PCR, a prescindere dalle manifestazioni cliniche. Tuttavia, benchè sia il "gold standard" diagnostico, il test molecolare (l'ormai mitico "tampone") non è esente da errori e la sua accuratezza diagnostica non può essere ritenuta del 100%. Come per tutte le analisi di laboratorio, il rischio di errore si annida in tutte le fasi dell'esame, ma principalmente nella fase pre-analitica e analitica (6). In particolare, si è osservato che il tampone più comunemente utilizzato, quello rino-faringeo, può essere causa di falsi negativi in pazienti che all'esame dell'aspirato bronchiale risultano positivi. Ed ancora, il tempo e le modalità di conservazione del tampone, come pure la manualità in alcune fasi dell'esame possono determinare, soprattutto nei casi di

modesta carica virale, un viraggio nel risultato da positivo a negativo o viceversa. Mentre i laboratori clinici del mondo intero si impegnavano ad aumentare la produttività e la rapidità di risposta del test molecolare, cercando di automatizzare le varie fasi dell'esame e trovare rimedio alla carenza di reagenti, due lavori scientifici pubblicati come Point/Counterpoint mettevano in evidenza il contrasto fra i fautori del consolidamento della diagnostica molecolare e i sostenitori del modello "distribuito" (7, 8), ossia di quello che io definisco "Laboratorio a kilometro zero" (9). Se la lezione principale che ci viene dalla pandemia da SARS-CoV-2 è la centralità della medicina di laboratorio, la seconda lezione è l'importanza del settore pubblico e la necessità di mantenere l'organizzazione a rete fra le strutture di medicina di laboratorio degli Ospedali, evitando i mostri degli esamifici e dei consolidamenti estremi che come un virus si sono propagati in vari Paesi senza alcuna prova di efficienza/efficacia (10). La pandemia ha rimesso in luce che la diagnostica di laboratorio deve essere mantenuta e valorizzata a livello di sanità pubblica, all'interno degli Ospedali e degli ambiti dove si declinano i percorsi diagnostico-terapeutici perché è il cuore della qualità e della sicurezza nella diagnosi e cura dei pazienti e dell'intera comunità. Inutile commentare ulteriormente come si siano potute apprezzare le differenze fra modelli di medicina di laboratorio nei vari sistemi sanitari regionali e come alcune Regioni, fra le quali il Veneto, abbiano espresso il meglio della professionalità ed organizzazione nel gestire l'incredibile aumento della richiesta di esami molecolari e, in genere, di esami di laboratorio.

Tabella 1

Varie tipologie di RT-PCR utilizzati in Corea (da ref 5 modificato e aggiornato a Marzo, 2020).

Autori, Produttori	Gene target	Riferimento*
Corman, et al.	<i>E, RdRp</i>	4
Chu, et al.	<i>orf1b, N</i>	5
Ministry of Public Health, Thailand	<i>N</i>	5
Institut Pasteur	<i>E, RdRp</i>	5
Centers for Disease Control and Prevention (USA)	<i>N</i>	5
PowerCheck 2019-nCoV* (Kogene biotech, Suel, Korea)	<i>E, RdRp</i>	http://www.kogene.co.kr/
Allplex 2019-nCoV* (Seegene, Seul, Korea)	<i>E, RdRp, N</i>	http://www.seegene.com/
nCoV Real-Time Detection* (SD biosensors, Suwon, Korea)	<i>E, RdRp</i>	http://sdbiosensor.com/
DiaPlexQ 2019-nCoV* (Solgent, Daejeon, Korea)	<i>orf1a, N</i>	http://www.solgent.com/
Real-Q 2019-nCoV* (BioSewoom, Seoul, Korea)	<i>E, RdRp</i>	http://biosewoom.com/

RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

IL MONITORAGGIO E LA PROGNOSI

Già nei primi lavori provenienti dalla Cina è risultato chiaro il valore di alcuni parametri di laboratorio, comunemente richiesti ed eseguiti e troppo frettolosamente definiti "banali". In realtà, alcuni parametri ematologici, fattori della coagulazione e marcatori di infiammazione dimostrano di essere strumenti importanti per la diagnostica differenziale, in particolare per distinguere la gravità della malattia, e per il loro valore prognostico (10-12). Una disamina del valore di questi esami sarà oggetto di altri contributi in questo numero speciale della rivista. In questa sede, mi è doveroso riconoscere i contributi originali di vari gruppi italiani che hanno dimostrato per primi il valore prognostico della presepsina (13), di un nuovo parametro ematologico di distribuzione dei monociti (MDW) (14) e dell'importanza del polimorfismo del gene *G6PD* nell'utilizzo di alcuni farmaci per la cura del COVID-19 (15).

Tuttavia, alcune considerazioni meritano di essere fatte. La prima riguarda l'importanza delle meta-analisi che sono state prodotte sulla base della vasta produzione scientifica e che offrono un'importante ed immediata comprensione del valore diagnostico/prognostico dell'esame, ma vanno lette con attenzione perché si rischia di mettere assieme dati prodotti con metodi o caratteristiche di prestazione troppo diversi. La seconda, strettamente correlata alla prima, è che, purtroppo, si è evidenziata ancora una volta la scarsa attenzione che riviste scientifiche accreditate e di notevole impatto (come ad esempio *JAMA*, *New Engl J Med*) dedicano alla descrizione dei metodi e delle caratteristiche di prestazione degli esami di laboratorio utilizzati per la diagnostica o per la valutazione prognostica del COVID-19. Questa carenza determina la difficoltà di assemblare i dati di studi diversi nelle meta-analisi per l'eterogeneità dei metodi utilizzati. Un esempio per tutti: nella determinazione della lattato deidrogenasi (LDH) è ben noto ai laboratoristi la differenza fra metodi che utilizzano come substrato il lattato (detto "forward" o reazione diretta), metodo raccomandato dall'IFCC (16), piuttosto che il piruvato (reazione inversa). Definire l'aumento della LDH senza precisare il metodo specifico (reazione "diretta" o "inversa") significa negare l'evidenza che le differenze dei risultati ottenuti con i due metodi sono dell'ordine del 50% (limite superiore dell'intervallo di riferimento 378 U/L per il metodo con reazione diretta; 210 U/L per quello con reazione inversa). La terza considerazione è che lo sforzo per armonizzare l'informazione di laboratorio (non solo risultati analitici, anche intervalli di riferimento, limiti decisionali, unità di misura) deve procedere con maggior velocità e senza alibi. Se esistono metodi standardizzati, vanno adottati; ma se non esistono, il processo di armonizzazione deve essere ben compreso ed attuato da subito. La quarta considerazione è che bisogna evitare che si facciano risuscitare esami obsoleti e del tutto inutili, come nel

caso di CK-MB per la diagnostica del danno cardiaco o gli ormoni tiroidei totali (TT4, TT3) che nel nostro Paese sono stati abbandonati da un decennio.

LA SIEROLOGIA

La sierologia rappresenta l'elemento maggiormente dibattuto e controverso fra gli esami della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. La prima cosa da demistificare è che la sierologia sia un ambito della "microbiologia-virologia clinica": se così fosse, dovremmo negare l'evidenza che la medicina di laboratorio e l'organizzazione dipartimentale dei laboratori clinici sono il modello teorico ed organizzativo di riferimento. E dovremmo riscrivere le pagine dedicate a rafforzare la visione del PALM (Pathology and Laboratory Medicine) come elemento fondante la riproposizione del valore della disciplina, della formazione dei professionisti e del ruolo che essi devono svolgere ora ed in futuro (17, 18). La sierologia è chiaramente un ambito di confronto fra specialisti dell'immunometria e della biochimica clinica ed i colleghi microbiologi; solamente nella collaborazione e nel confronto potremo dare un reale ruolo alla ricerca degli anticorpi specifici per SARS-CoV-2 nella pratica clinica.

Il secondo problema è il metodo di studio e valutazione della sierologia che, come per tutti gli esami di laboratorio deve iniziare dal comprendere e chiarire il bisogno clinico e lo scopo o gli scopi dell'analisi stessa. Vi è poi una valutazione e validazione della qualità analitica che deve seguire i criteri e le linee-guida consolidate e adottate per tutti gli altri esami (specialmente immunometrici). In terzo luogo, si passa alla valutazione della specificità e sensibilità clinica per poi comprendere i valori predittivi (positivo e negativo), se si conosce la prevalenza della malattia, elemento senza il quale i dati di specificità e sensibilità appaiono un esercizio utile per la pubblicazione scientifica, ma inadatto ad utilizzare l'analisi nella realtà clinica.

Infine, il dibattito fra metodi definiti "rapidi" e metodi eseguibili in laboratorio, va focalizzato sulle caratteristiche prettamente tecnico-analitiche e sul possibile utilizzo clinico.

I metodi rapidi definiti spesso come metodi di Point of Care Testing (POCT), che si basano prevalentemente su tecniche di immunocromatografia a flusso laterale (LFA), sono test qualitativi, caratterizzati dalla soggettività nella lettura e con valore soglia prefissato dal produttore (19). Possono utilizzare varie matrici ed in particolare sangue intero, plasma e siero. Uno dei problemi che mi preme sottolineare è che, malgrado sia evidente che il campione di elezione per questa tipologia di test sia il sangue intero da prelievo capillare (campione immediatamente utilizzabile senza necessità di centrifugazione o altra preparazione pre-analitica), molti lavori hanno utilizzato siero/plasma o sangue intero da campioni raccolti con K2-EDTA. A mio avviso, l'utilizzo di campioni diversi dal sangue capillare

determina la perdita di uno dei maggiori vantaggi del test rapido.

I metodi eseguibili in laboratorio sono tradizionali metodi immunometrici, prevalentemente nelle varianti ELISA e chemiluminescenza (CLIA) e come tali permettono di ottenere risultati quantitativi, di stabilire il valore soglia sulla base dei risultati ottenuti nella popolazione di soggetti di riferimento e pazienti, utilizzando le curve ROC, ed inoltre sono soggetti ai tradizionali sistemi per il controllo interno (CQI) e valutazione esterna (VEQ) della qualità. Poiché i primi casi di SARS-CoV-2 sono stati descritti in dicembre dello scorso anno e quindi i metodi per la ricerca degli anticorpi specifici sono stati sviluppati solo in mesi recenti, non è da stupirsi che la letteratura sia carente di lavori che abbiano valutato la qualità analitica e diagnostica di questi metodi. Però, anche in questo caso la lezione che la pandemia ha insegnato in modo definitivo e crudele è l'assoluta irrilevanza del cosiddetto marchio CE che non è, in modo assoluto, un elemento di qualità e di tutela dei pazienti.

L'utilizzo diagnostico della sierologia è molteplice, ed in particolare è stato proposto per:

- migliorare ed integrare l'accuratezza diagnostica del test molecolare, specialmente in pazienti che si presentano all'osservazione dopo un periodo di 7-10 giorni dall'esordio dei sintomi;
- tracciare possibili contatti "contagiosi" e ridurre così la diffusione della malattia;
- determinare la possibile immunizzazione o il rischio di contrarre l'infezione;
- valutare l'estensione della diffusione (prevalenza in una determinata area geografica/popolazione);
- costituire uno strumento per studi epidemiologici;
- utilizzare il plasma di pazienti "convalescenti" con anticorpi "neutralizzanti" a scopo terapeutico (20).

Un pre-requisito fondamentale per lo studio sierologico, qualsiasi sia l'applicazione clinica, ma apparentemente sottovalutato nella letteratura, è la conoscenza della cinetica di comparsa e comportamento nel tempo degli anticorpi anti-SARS-CoV-2. Infatti, i dati di comparsa degli anticorpi, e specificamente delle diverse classi di IgA, IgM ed IgG variano notevolmente nei lavori pubblicati (21, 22).

Per questo motivo, parallelamente alla valutazione delle prestazioni analitiche di alcuni metodi, il nostro gruppo ha avviato lo studio delle cinetiche di comparsa nel siero degli anticorpi e del monitoraggio delle variazioni nel tempo, che hanno permesso di stabilire la fascia temporale (giorni) di riferimento per valutare la concordanza fra sierologia e test molecolare (23, 24).

Su questa base, sono in corso programmi anche a livello regionale per stabilire la prevalenza della malattia, la reale sensibilità e specificità del test, e infine i valori predittivi e negativi, ossia l'informazione che è utile al clinico per la diagnosi e la gestione del paziente. Se è vero, come appare dai primi dati prodotti in Italia, che la prevalenza dell'infezione è intorno al 3-4%, tranne in alcune zone particolarmente critiche, qualsiasi

test sierologico che presenta sensibilità e specificità elevate (fino al 99%) ha una modesta utilità clinica. Per migliorare il valore predittivo esiste però una ricetta magica e semplice: richiedere l'esame alla luce dei dati clinici, della conoscenza eventuale del risultato dell'analisi molecolare ed interpretare il risultato in modo appropriato.

L'esortazione dell'OMS "*test, test, test*" va rivista dunque in "*il test giusto, per il paziente giusto, al tempo giusto, con il metodo giusto e la giusta interpretazione*".

Pertanto, non vi è alcuna evidenza scientifica a supporto di una politica di screening sierologico; la sierologia ha sicuramente significato nell'integrare, in casi specifici ed alla luce del contesto clinico, risultati "dubbi" dell'analisi molecolare. Ed ancora, è importante per comprendere la prevalenza dell'infezione in zone specifiche e tracciare i contatti, per l'utilizzo terapeutico del plasma di pazienti convalescenti, anche perché vi è dimostrazione che gli anticorpi di classe IgG identificati dai test immunometrici (CLIA, ELISA) correlano significativamente con gli anticorpi neutralizzanti (21). Sono, infine, indispensabili per la sorveglianza epidemiologica. A questo punto scatta la domanda retorica che molti fanno "*ma quanto a lungo rimarranno questi anticorpi?*" La risposta è che devono lasciarsi studiare perché la malattia è ancora giovane ed il tempo di monitoraggio degli anticorpi non supera qualche mese. Nel caso degli altri coronavirus (SARS e MERS) gli anticorpi di classe IgG sono risultati persistere sino a 24-36 mesi (25-27), ma SARS-CoV-2 è un coronavirus del tutto particolare e "alternativo" rispetto agli altri componenti della famiglia.

CONCLUSIONI

La pandemia da SARS-CoV-2 rappresenta un evento epocale che ha cambiato, anche se non sappiamo per quanto tempo, il nostro modo di vivere, convivere e socializzare. Dal punto di vista della medicina, la pandemia ha dato uno scossone salutare all'incapacità del mondo della professione di difendere il Sistema Sanitario ed impedire che il protrarsi delle aggressioni e dei continui tentativi di smantellarlo attraverso il sottofinanziamento, la penalizzazione dell'eccellenza e demotivazione del personale, determinino una fine irreversibile per il sistema di assistenza universale ed universalistico. Per la medicina di laboratorio, non possiamo perdere l'occasione di dare piena visibilità presso tutta la comunità, non solo scientifica e professionale, della centralità e del valore dell'esame di laboratorio per la diagnosi, per la prognosi, per il monitoraggio e la sorveglianza epidemiologica.

Ma un'altra lezione che mi permetto di lasciare alla Vostra intelligente lettura è che dobbiamo comprendere quanto sia importante riconoscere che la medicina (ed anche la medicina di laboratorio) non è una scienza compiuta, che le nostre conoscenze sono parziali e che solo l'umiltà della ricerca critica e basata sul metodo

sperimentale può permettere di comprendere meglio i meccanismi fisiopatologici, e gli aspetti oscuri della risposta immunitaria. E' una grande opportunità per rivalutare l'importanza della competenza, migliorare la qualità e il valore del lavoro che viene svolto, ogni giorno, senza le luci della ribalta ma con grande professionalità, nei laboratori clinici. Anni addietro la più bella pubblicità dell'Università di Padova, nella quale opero con l'orgoglio di vivere in un'Istituzione che celebra 800 anni di storia, era affidata ad un ricordo di Mario Rigoni Stern che recita: da piccolo, ad Asiago i "veci" (leggisi "vecchi") dicevano "putei stè sitti" (bambini state buoni) *che a Padova i ghà (devono) da studiare*". Speriamo che adesso ci lascino studiare e lavorare e rispettinno maggiormente il nostro lavoro.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Mizumoto K, Kagaya K, Zarebsky A, et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill* 2020 doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
- Zhang Y-Z. Novel 2019 coronavirus genome. <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>. (ultimo accesso: maggio 2020)
- Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem* 2020;66:549-55.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020 doi: 10.2807/1560-7917.
- Hong KH, Lee SW, Kim TS, et al. Guidelines for laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Ann Lab Med* 2020;40:351-60.
- Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0285.
- Longshore IJ. Comprehensive molecular testing functions best in a consolidated model. *Clin Chem* 2020;66:138-9.
- Nolte FS. Distributed model for molecular diagnostics. *Clin Chem* 2020;66:140-2.
- Plebani M, Lippi G. Molecular diagnostics at the times of SARS-CoV-2 outbreak. *Diagnosis* 2020 doi: 10.1515/dx-2020-0050.
- Plebani M. Clinical laboratory: Factory or zero kilometer service? *Clin Chim Acta* 2020;503:228-30.
- Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020. doi: 10.1515/cclm-2020-0240.
- Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, et al. 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. doi: 10.1515/cclm-2020-0369.
- Zaninotto M, Mion MM, Cosma C, et al. Presepsin in risk stratification of SARS-CoV-2 patients. *Clin Chim Acta* 2020 doi: 10.1016/j.cca.2020.04.020.
- Tosato F, Girardo C, Pelloso M, et al. One disease, different features: COVID-19 laboratory and radiological findings in three Italian patients. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0319.
- Capoluongo ED, Amato F, Castaldo G. The friendly use of chloroquine in the COVID-19 disease: a warning for the G6PD-deficient males and for unaware carriers of pathogenic alterations of G6PD-gene. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0442.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees . Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactatede hydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:643-8.
- Wilson ML, Fleming KA, Kuti MA, et al. Access to pathology and laboratory medicine services: a crucial gap. *Lancet* 2018;391(10133):1927-38.
- Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
- Abbasi J. The promise and peril of antibody testing for COVID-19. *JAMA* 2020 doi: 10.1001/jama.2020.6170.
- Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020 doi:10.1038/s41591-020-0897-1.
- To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational color study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:565-74.
- Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 2020. doi: 10.1001/jama.2020.8259.
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0443.
- Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta* 2020 doi: 10.1016/j.cca.2020.04.026.
- Cao Z, Liu L, Du L, et al. Potent and persistent antibody responses against the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in recovered patients. *Virology* 2020;7:299-301.
- Wu L-P, Wang N-C, Chang Y-H, et al. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1562-4.
- Alshukairi AN, Khalid I, Ahmed WA, et al. Antibody response and disease severity in healthcare worker MERS survivors. *Emerg Infect Dis* 2016;22:113-5.

Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19)

Giuseppe Lippi¹, Gian Luca Salvagno¹, Camilla Mattiuzzi²

¹Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

²Servizio di Governance Clinica, Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Trento, Italia

ABSTRACT

Concise guide to coronavirus disease 2019 (COVID-19) diagnostics.

Several months after its emergence, the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is still prepotently disrupting health, societies and economies worldwide. The current approach for diagnosing SARS-CoV-2 remains based on identification of viral RNA by means of molecular biology techniques in upper or lower respiratory tracts specimens. Nevertheless, the development of immune response against the virus may also provide valuable diagnostic information. The paradigmatic kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibodies in patients with COVID-19 would allow to conclude that serological testing shall not replace viral RNA detection in diagnosing acute SARS-CoV-2 infection, but may instead remain an essential tool for identifying patients who have been infected and have developed an immune response, as well as for monitoring the progress of herd immunity. For this purpose, the choice of the antigens used for constructing the immunoassays appears critical, as these shall use epitopes towards which neutralizing antibodies could be generated. Other important aspects in serological testing encompass the absence of cross-reactivity with other coronaviruses, the ability to distinguish the antibody class (i.e. IgG, IgA and/or IgM), quantitative assessment, wide range of linearity and low imprecision at diagnostic thresholds. A final aspect, almost essential for both clinical and public health purposes, is the evidence of analytical and clinical validation before each method enters clinical practice.

INTRODUZIONE

Alla fine del 2019, nella città cinese di Wuhan, sono stati diagnosticati i primi casi di polmonite interstiziale atipica, la cui origine è rimasta per un certo tempo oggetto d'indagine (1). All'inizio di Gennaio dell'anno seguente, è stato identificato l'agente responsabile di queste patologie in un beta-coronavirus, molto simile a quello che causò la SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) circa 20 anni prima, e che è stato per l'appunto denominato SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). L'iniziale sottostima, e forse anche sottovalutazione, dell'epidemia locale ha favorito la rapida diffusione del virus, dapprima in Cina, e successivamente in tutto il resto del mondo, al punto di esortare l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a dichiarare la natura pandemica di questa malattia infettiva, nota oggi con il termine di COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) (2).

SARS-CoV-2 appartiene alla famiglia dei

coronavirus, ed è pertanto costituito da una singola elica di RNA con circa 30 000 paia di basi, che contiene una serie di geni che codificano per proteine strutturali e accessorie, le più importanti delle quali sono la proteina spike (S), la proteina del nucleo capsidico (N) e dell'involucro (E, dall'inglese *envelope*), e la RNA-polimerasi RNA dipendente (RdRp) (3). Il meccanismo principale alla base della virulenza di SARS-CoV-2 è stato oggi identificato nel legame della proteina S all'enzima ACE2 (angiotensin converting enzyme 2), tramite il suo recettore fisiologicamente presente alla superficie delle cellule umane, soprattutto delle vie respiratorie (alte e basse), dell'apparato gastrointestinale, del cuore, dei reni e dei testicoli (4). La successiva replicazione virale intracellulare, soprattutto negli pneumociti di tipo II, giustifica lo sviluppo della grave patologia polmonare e la possibile evoluzione della malattia in sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), mentre l'aberrante

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona, Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 08.05.2020

Revisionato: 08.05.2020

Accettato: 11.05.2020

Pubblicato on-line: 18.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.052

(esagerata) risposta immunitaria, caratterizzata nei casi più gravi dalla comparsa della famigerata “tempesta citochinica”, si riflette nell’insorgenza di forme ancora più gravi e/o critiche, che possono progredire con comparsa di disfunzione multi-organo, coagulopatia di natura trombotica localizzata (trombosi polmonare) o disseminata (coagulazione intravascolare disseminata), fino a provocare il decesso del paziente (l’attuale mortalità nel mondo è del 6,9%, mentre in Italia ha ormai superato il 13,7%) (5).

Un aspetto essenziale nella gestione della patologia, ormai universalmente riconosciuto, è rappresentato dalla necessità di formulare una diagnosi quanto più precoce possibile. Le motivazioni sono molteplici, e comprendono per lo più la necessità di instaurare una terapia tempestiva (quanto più precoce è il trattamento, tanto minore è il rischio di evoluzione prognostica sfavorevole), di isolare subito i soggetti infetti, onde prevenire altri contagi per prossimità, di identificare i soggetti che possono aver sviluppato un’immunità contro il virus e, aspetto in parte legato al precedente, di definire un preciso quadro di sorveglianza epidemiologica, che consenta di stabilire con buona approssimazione l’estensione locale dell’epidemia e la progressione della ben nota “immunità di gregge” (6). Il conseguimento di questi obiettivi presuppone la disponibilità di una serie di strumenti non solo rivolti alla diagnosi eziologica di infezione da SARS-CoV-2, ma anche alla stratificazione del rischio, alla valutazione prognostica, al monitoraggio terapeutico ed all’identificazione dell’eventuale immunizzazione, così come verrà sinteticamente descritto nelle parti seguenti di questo articolo

DIAGNOSI EZIOLOGICA

Per quanto concerne la diagnosi eziologica di COVID-19, essa presuppone inevitabilmente l’isolamento di materiale genetico del virus (RNA) in campioni biologici del paziente. Secondo le indicazioni dell’OMS, del Centers for Disease Control and Prevention di Atlanta (CDC) e dell’Istituto Superiore di Sanità (ISS), il gold standard diagnostico è tuttora rappresentato dal rilevamento di RNA virale mediante tecnica di RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) su materiale prelevato dalle alte vie respiratorie, nella fattispecie, su tamponi oro-faringei e naso-faringei, (eseguiti entrambi sequenzialmente), o – quando possibile e fattibile – dalle basse vie respiratorie (espettorato o lavaggio bronco-alveolare). E’ importante evidenziare come la densità recettoriale di ACE2 sia tendenzialmente maggiore nei polmoni rispetto a naso e oro-faringe. Ciò spiega almeno in parte perché un certo numero di soggetti (circa il 20-30%) con diagnosi certa di COVID-19 basata su stringenti evidenze clinico-radiologiche o positività virale di campioni delle basse vie respiratorie, possano presentare negatività dei tamponi naso- e oro-faringei, pur essendo contestualmente infetti. Così come evidenziato in

Tabella 1, i potenziali aspetti che limitano l’efficienza diagnostica dei tamponi naso- e oro-faringei sono molteplici, ma devono essere ben riconosciuti al fine di aumentarne la sensibilità diagnostica e evitare di generare falsi negativi al test (7).

Tabella 1

Principali cause di insufficiente sensibilità diagnostica nell’identificazione dell’infezione da severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mediante RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) su materiale prelevato dalle alte vie respiratorie.

- Procedure inadeguate per il prelievo del materiale biologico
- Condizioni inappropriate per trasporto e/o conservazione
- Prelievo durante la fase asintomatica (5-7 giorni prima della comparsa dei sintomi)
- Sensibilità diagnostica insufficiente del metodo
- Inadeguata definizione del cut-off diagnostico
- Persistenza del virus in altri distretti organici
- Errori di interpretazione/refertazione dei risultati

Giova citare in questo contesto, che la sensibilità diagnostica nell’identificazione dell’infezione da SARS-CoV-2 mediante RT-PCR su materiale prelevato dalle alte vie respiratorie aumenta in parallelo al numero di tamponi eseguiti in giorni successivi. E’ stato, infatti, recentemente dimostrato come la sensibilità dei tamponi aumenti dal 51%, quando eseguiti una volta sola, all’83% se ripetuti due volte, per poi divenire 93%, 98% fino a pressoché il 100% quando ripetuti per tre, quattro e cinque giorni consecutivi (8). Ciò rappresenta una forte evidenza che a fronte di un forte sospetto clinico e/o radiologico ed esito negativo del tampone, il campionamento andrebbe sicuramente ripetuto nel tempo. Un ultimo aspetto degno di nota riguarda le implicazioni cliniche della carica virale. Se è pur vero che nei soggetti asintomatici (che possono rappresentare fino al 75% del totale degli infetti) è comunque presente una carica virale in naso- e oro-faringe che li rende potenzialmente contagiosi (9), alcuni dati recenti sembrano dimostrare l’esistenza di una correlazione tra gravità clinica della patologia e carica virale in naso- e oro-faringe (10).

Discorso a parte merita poi l’identificazione degli antigeni virali, soprattutto mediante metodi rapidi immunocromatografici. Malgrado questa possa rappresentare un’alternativa potenzialmente valida alla biologia molecolare, la sensibilità e specificità diagnostica di questi metodi commerciali presuppone una validazione analitica e clinica prima del loro utilizzo. Questo concetto è supportato da quanto accaduto in Spagna, ove le autorità nazionali hanno ritirato dal mercato un kit rapido poiché la sensibilità diagnostica era pari al 30%, ben lontana dall’80% dichiarata dal produttore (11). Come in tutti gli ambiti della diagnostica

in vitro, andrebbe pertanto fermamente scoraggiato l'utilizzo di dispositivi diagnostici per i quali non esistano solide evidenze di qualità analitica. La validazione commisurata alle ragioni che ne giustificano l'impiego clinico (diagnosi, monitoraggio, analisi epidemiologica) è requisito necessario per salvaguardare la salute del paziente, assicurando contestualmente l'accuratezza diagnostica basata sull'evidenza di chiare e documentabili specifiche di qualità.

LA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

A prescindere dalle indicazioni prodotte delle organizzazioni scientifiche nazionali e internazionali in tema di COVID-19, i limiti legati all'utilizzo della sierologia nella diagnostica virologica sono ben noti da tempo. L'esame sierologico ha come prima finalità l'identificazione e/o quantificazione delle immunoglobuline prodotte dall'organismo contro un certo microorganismo. Essa consente pertanto di identificare (analisi qualitativa), e/o tipizzare (identificazione del tipo di immunoglobuline) e/o quantificare (analisi quantitativa) la presenza di una eventuale risposta immunitaria contro un agente infettivo (12). Nulla a che vedere, pertanto, con la diagnosi di infezione in atto, poiché la presenza di una risposta immunitaria non riflette la contestuale presenza del virus (rischio di generare falsi positivi), così come l'assenza di una risposta immunitaria non consente di escludere che vi sia una infezione in atto (rischio di generare falsi negativi). Malgrado la tipizzazione della risposta anticorpale, e la sua caratterizzazione mediante identificazione di immunoglobine a struttura e significato biologico differente, possa consentire con una certa approssimazione di classificare un'infezione come "recente" o "pregressa", la sierologia nella diagnostica di COVID-19 appare eccezionalmente problematica. Ciò è in parte dovuto alla recente insorgenza della patologia, che non consente di trarre

conclusioni risolutive, ma anche al bizzarro comportamento del virus, sia per quanto concerne la sua interazione con il sistema immunitario in generale, ma anche per quanto riguarda il comportamento specifico nel singolo paziente. Nel primo caso, è stato ormai ampiamente dimostrato come la risposta immunitaria al virus si avvalga della costante generazione di immunoglobuline di tipo IgG (insorgono generalmente dal 10° al 18° giorno dalla comparsa dei sintomi e sono quindi presenti nella pressoché totalità dei pazienti dopo 3-4 settimane dall'infezione), della comparsa di immunoglobuline di tipo IgA in un sostanziale numero di pazienti (insorgono in genere dal 7° al 15° giorno dalla comparsa dei sintomi e sono presenti in oltre il 90-95% dei pazienti dopo 3-4 settimane dall'infezione), mentre la comparsa delle immunoglobuline di tipo IgM appare più incostante (insorgono in genere dal 5° al 12° giorno dalla comparsa dei sintomi, in una percentuale molto variabile, dal 50% al 90%, dei pazienti) e sono meno stabili nel tempo, tendendo a scomparire dopo 4-6 settimane (Figura 1) (13-16). Di particolare rilievo è lo studio della positivizzazione e della cinetica delle immunoglobuline IgA, come illustrato recentemente da Padoan et al. (17). In questo studio, non solo il titolo delle IgA sieriche è apparso costantemente superiore a quello delle IgM, ma anche la percentuale di pazienti che hanno sviluppato IgA neutralizzanti (dirette contro la proteina virale S), è stato del 100% dopo 2 settimane, a conferma che questa risposta anticorpale potrebbe rappresentare una valida barriera per prevenire l'infezione, considerando che le IgA sono immunoglobuline secretorie, presenti alla superficie delle mucose. E' interessante notare come in alcuni studi, come quello pubblicato da Long et al (18), le IgG contro SARS-CoV-2 siano state identificate nella totalità dei pazienti infettati dal virus dopo 19 giorni dalla comparsa dei sintomi, mentre le IgM sono comparse in meno del 95% dei pazienti entro 22 giorni dalla comparsa dei sintomi, per poi progressivamente

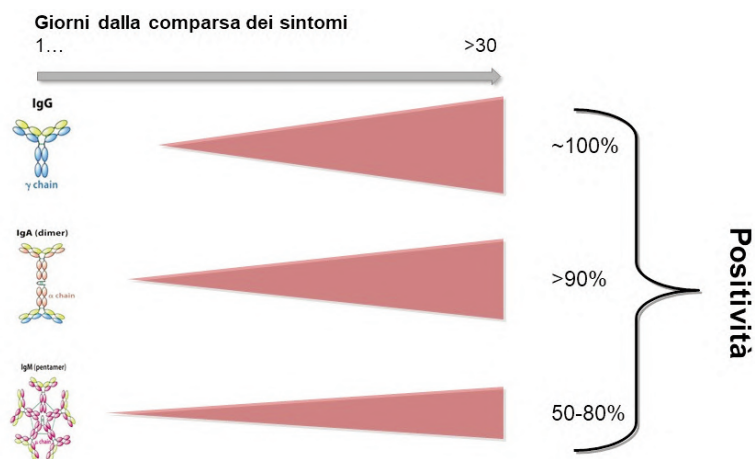


Figura 1
Sviluppo della risposta immunitaria in pazienti con infezione da severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

diminuire nel periodo successivo. Sorprendentemente, e a conferma di quanto affermato in precedenza, la percentuale di pazienti con positività alle IgG contro SARS-CoV-2 è sempre superiore a quella per IgM, sia nella fase precoce e sia nella fase tardiva della malattia. Cumulativamente, la somma della positività per IgG ed IgM appare solo marginalmente, ma non significativamente, superiore alla positività per le sole IgG durante la fase precoce di malattia (5-15 giorni). La differenza si annulla poi completamente dopo 2 settimane dalla comparsa dei sintomi, il che lascia presupporre che la determinazione combinata delle due immunoglobuline aggiunga probabilmente poco in termini di sorveglianza epidemiologica a quella delle sole IgG. Queste considerazioni trovano valido supporto nei risultati di altri studi recentemente pubblicati (19-20). La peculiare cinetica anticorpale in corso di COVID-19 (Figura 2) consentirebbe pertanto di concludere che la diagnostica sierologica, almeno alla luce delle attuali conoscenze, non può né deve sostituire il processo di identificazione dell'RNA mediante tecniche di biologia molecolare per diagnosticare una infezione in atto da SARS-CoV-2, ma rimane invece presupposto imprescindibile nell'identificare i pazienti che siano entrati in contatto con il virus ed abbiano pertanto sviluppato una risposta immunitaria.

Indipendentemente dalla validità dei concetti in precedenza espressi, l'insufficiente accuratezza diagnostica della biologia molecolare su materiali delle alte vie respiratorie apre alcune prospettive alla sierologia, ma solo come strumento ausiliario nella diagnosi dell'infezione acuta da SARS-CoV-2. Zhao et al hanno dimostrato infatti che l'affiancamento della sierologia alla biologia molecolare potrebbe consentire di aumentare la sensibilità diagnostica complessiva dal 70% ad oltre 90%, anche se il miglioramento durante la fase precoce dell'infezione (<7 giorni dalla comparsa dei sintomi) appare sostanzialmente modesto (da 67% a 79%) (21). Studi futuri saranno necessari per stabilire

il possibile significato clinico dell'inclusione della sierologia negli attuali algoritmi diagnostici, che sono basati essenzialmente sulle tecniche di biologia molecolare.

Per quanto concerne poi la scelta tra saggi quantitativi o qualitativi, indipendentemente dal fatto che essi siano "rapidi" (che consentono quindi una rilevazione qualitativa in 10-20 minuti circa) o mediante metodi di laboratorio (in chemiluminescenza o ELISA), essa dipende ovviamente dalle motivazioni cliniche sottostanti. Per uno studio di sorveglianza epidemiologica, volto all'identificazione del numero di persone che abbiano sviluppato una risposta immunologica (e siano quindi verosimilmente entrate in contatto con il virus), un test qualitativo "rapido" (usando ad esempio dispositivi monouso) potrebbe essere idoneo, poiché consentirebbe di analizzare un ampio numero di campioni, con basso costo, rapidamente, non dovendo utilizzare personale specificatamente qualificato e senza ricorrere a prelievo di sangue. D'altronde, questa strategia sembra meno indicata per scopi più prettamente clinici, visto che l'identificazione specifica della classe di immunoglobuline e del titolo anticorpale appaiono aspetti essenziali per la stratificazione del rischio di prognosi infausta (il titolo anticorpale correla direttamente con la gravità della patologia) e per il monitoraggio longitudinale (il titolo anticorpale varia in funzione della risposta al trattamento) (21), ma anche per valutare l'efficacia della terapia con plasma iperimmune (altresi noto come "plasma convalescente") (22) e della strategia vaccinale a medio e lungo termine (23).

Malgrado non sia possibile sciogliere completamente i dubbi sollevati a più riprese in merito all'efficacia neutralizzante degli anticorpi prodotti in corso di COVID-19, esistono alcune prove concrete, che paiono rassicurarci. Un'evidenza parzialmente confortante scaturisce dalla precedente epidemia di SARS, originata a cavallo degli anni 2002 e 2003, in cui

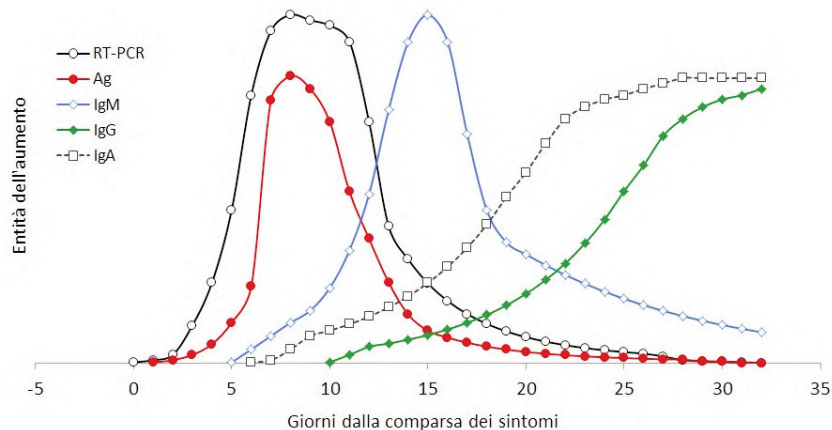


Figura 2

Cinetica del virus e della risposta anticorpale in pazienti con infezione da severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

fu possibile dimostrare che gli anticorpi prodotti contro quell'omologo virus (oggi denominato SARS-CoV-1, e avente circa l'85% di identità genetica con SARS-CoV-2), produsse un'immunità relativamente durevole (da 2 a 6 anni), ma soprattutto caratterizzata dalla comparsa di anticorpi neutralizzanti (24). Per quanto concerne più specificatamente l'infezione da SARS-CoV-2, To et al. hanno recentemente dimostrato come il 94% e 100% dei pazienti in cui compaia una risposta immunologica quantificabile possiedono anticorpi neutralizzanti di classe IgM o IgG, rispettivamente (25). Indiretta conferma della capacità neutralizzante degli anticorpi viene poi dagli studi che hanno a più riprese dimostrato l'efficacia del cosiddetto plasma iperimmune nei pazienti con COVID-19 (22,26).

CONCLUSIONI

Nonostante il volume di evidenze scientifiche prodotte dall'esordio di COVID-19 a oggi sia imponente (oltre 10000 documenti in PubMed all'inizio di Maggio 2020), la sensazione è che vi siano ancora ampie aree di incertezza, che necessitano di ulteriore approfondimento prima di poter definire un protocollo diagnostico definitivo. Nondimeno, alcune valutazioni di ordine generale possono essere fatte. Come già più volte ribadito, non sembra ad oggi poter esser messo in discussione il concetto che la diagnosi di infezione acuta da SARS-CoV-2 debba necessariamente avvalersi della dimostrazione della presenza del virus nei campioni biologici del paziente. E' importante però ribadire il concetto che l'identificazione del solo materiale genetico (RNA) in alcuni materiali biologici, come ad esempio le feci, attesta un'avvenuta infezione virale (la RT-PCR amplifica anche l'RNA extra-virale), ma non consente di porre diagnosi di infezione ancora in atto, perché essa deve accompagnarsi alla dimostrazione che il materiale genetico derivi da un virus vitale (27). A questo proposito, sembra difficile ipotizzare di poter utilizzare oggi matrici biologiche alternative ai campioni delle alte (o basse, quando possibile) vie respiratorie. Nondimeno, la saliva potrebbe rappresentare una possibile alternativa al tampone oro- e naso-faringeo, come dimostrato da alcuni studi recenti, che hanno riportato una sensibilità diagnostica quasi confrontabile a quella del materiale delle basse vie respiratorie (85-90%) (28,29).

Per quanto concerne la diagnostica sierologica, appare oggi fuori discussione che il suo ruolo nella diagnostica dell'infezione acuta da SARS-CoV-2 non può che essere marginale, tutt'al più a supporto delle tecniche di biologia molecolare, soprattutto nei casi che permangono a lungo dubbi, visto che la sensibilità e specificità delle IgG, ad esempio, sembrano essere superiori al 99% a due settimane dalla comparsa dei sintomi (30). Essa riveste invece un ruolo importante per la sorveglianza epidemiologica, ambito in cui la diagnostica molecolare perde quasi completamente significato, in quanto consentirebbe di diagnosticare

solamente i pazienti con infezione in atto ma non fornirebbe alcuna informazione utile in merito ad una infezione pregressa, allo sviluppo di una risposta immunitaria e tantomeno alla eventuale presenza di anticorpi neutralizzanti che possano proteggere da infezioni successive e contribuiscano a generare l'immunità di gregge. Per queste motivazioni, la scelta degli antigeni con cui costruire l'immunosaggio appare critica, perché sarebbe opportuno prediligere quelli verso cui eventuali anticorpi neutralizzanti vengono prodotti (quindi, soprattutto, contro la parte della proteina spike che si lega ad ACE2, nota come receptor binding domain, o RBD). Altre caratteristiche che sembrerebbero auspicabili per un metodo sierologico volto a identificare la presenza di anticorpi contro SARS-CoV-2 sono l'assenza di cross-reattività con SARS-CoV-1 ed altri coronavirus, la capacità di distinguere separatamente la classe di anticorpi (le immunoglobuline più utili clinicamente sembrerebbero ad oggi essere IgG ed IgA, che riflettono immunità a lungo termine e protezione delle mucose, rispettivamente), determinazione quantitativa e non qualitativa onde consentire il monitoraggio longitudinale della risposta anticorpale, ampio intervallo di linearità (il titolo può essere talora molto elevato), e bassa imprecisione al valore soglia (onde evitare di generare falsi positivi o falsi negativi) (Tabella 2). Un ultimo aspetto, determinante a fini clinici e di sanità pubblica, è che per ogni metodo introdotto nella pratica clinica esista una evidenza di solida validazione analitica e clinica indipendente, seguendo ad esempio le indicazioni prodotte recentemente dalla Food and Drug Administration (31). E' altresì evidente che in caso di riscontrata positività anticorpale, sarà sempre necessario prevedere l'esecuzione di un tampone per verificare la condizione di possibile infettività del paziente.

Tabella 2

Caratteristiche auspicabili per un metodo sierologico per identificare la presenza di anticorpi contro severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

- Mirato all'identificazione di anticorpi neutralizzanti
- Privo di cross-reattività con SARS-CoV-1 ed altri coronavirus
- Capacità di distinguere separatamente la classe di anticorpi (IgG ed IgA, soprattutto)
- Determinazione quantitativa
- Ampio range di linearità
- Bassa imprecisione al valore soglia (es. <10%)
- Evidenza di validazione analitica e clinica indipendente

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Plebani M. The novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: think the unthinkable and be prepared to face the challenge. *Diagnosis (Berl)* 2020;7:79-81.
2. Mattiuzzi C, Lippi G. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? *Ann Transl Med* 2020;8:48.
3. Wang H, Li X, Li T, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020 doi: 10.1007/s10096-020-03899-4.
4. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 2020 doi: 10.1038/s41591-020-0868-6.
5. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020;507:167-73.
6. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed* 2020 doi: 10.23750/abm.v91i2.9548.
7. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0285.
8. Zhang JJ, Cao YY, Dong X, et al. Distinct characteristics of COVID-19 patients with initial rRT-PCR-positive and rRT-PCR-negative results for SARS-CoV-2. *Allergy* 2020 doi: 10.1111/all.14316.
9. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 Viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 2020;382:1177-9.
10. Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020doi: 10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
11. El Pais. Unreliability of new tests delays effort to slow coronavirus spread in Spain. Available at: <https://english.elpais.com/society/2020-03-27/unreliability-of-new-tests-delays-effort-to-slow-coronavirus-spread-in-spain.html>. (ultimo accesso: maggio 2020)
12. Fierz W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. *Methods Mol Med* 2004;94:393-427.
13. Zhang G, Nie S, Zhang Z. Longitudinal change of SARS-Cov2 antibodies in patients with COVID-19. *J Infect Dis* 2020 doi: 10.1093/infdis/jjaa229.
14. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0240.
15. Hoffman T, Nissen K, Krambrich J, et al. Evaluation of a COVID-19 IgM and IgG rapid test; an efficient tool for assessment of past exposure to SARS-CoV-2. *Infect Ecol Epidemiol* 2020;10:1754538.
16. Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. *Clin Chem Lab Med.* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0473.
17. Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta* 2020;507:164-6.
18. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020 doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
19. Infantino M, Grossi V, Lari B, et al. Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an Italian experience. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.25932.
20. Sun B, Feng Y, Mo X, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020doi: 10.1080/22221751.2020.1762515.
21. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020 doi: 10.1093/cid/ciaa344.
22. Rajendran K, Narayanasamy K, Rangarajan J, et al. Convalescent plasma transfusion for the treatment of COVID-19: Systematic review. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.25961.
23. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity* 2020;52:583-9.
24. Lin Q, Zhu L, Ni Z, et al. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2020 doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.015.
25. To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:565-74.
26. Franchini M, Marano G, Velati C, et al. Operational protocol for donation of anti-COVID-19 convalescent plasma in Italy. *Vox Sang* 2020 doi: 10.1111/vox.12940.
27. Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.25825.
28. To KK, Tsang OT, Chik-Yan Yip C, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis* 2020 doi: 10.1093/cid/ciaa149.
29. Williams E, Bond K, Zhang B, et al. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2020 doi: 10.1128/JCM.00776-20.
30. Bryan A, Pepper G, Wener MH, et al. Performance Characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG Assay and Seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol.* 2020 doi: 10.1128/JCM.00941-20.
31. Food and Drug Administration. Policy for diagnostic tests for coronavirus disease-2019 during the public health emergency: immediately in effect guidance for clinical laboratories, commercial manufacturers, and food and drug administration staff. <https://www.fda.gov/media/135659/download> (ultimo accesso: maggio 2020)

Mortalità da COVID-19: una epidemia senza denominatore. Ma conosciamo il numeratore?

Luisa Zanolla

Università di Verona

ABSTRACT

COVID-19 death rate: an epidemic without a denominator. But what do we know about the numerator?

Since many COVID-19 patients display few, if any, symptoms, assessing infection rate, hospitalization rate, and mortality rate is very challenging. Not only we do not know the denominator of these ratios, but in assessing the mortality rate, we also have problems to estimate the numerator. Between March and April 2020, Italy recorded 42 633 excess deaths compared to the average of the five previous years. In the same period, 27 846 deaths were classified as due to COVID-19. Since the international definition of a COVID-19 case requires a microbiological confirmation of the presence of the virus, 34.7% of the excess deaths remain unexplained. Part of these may be COVID-19 deaths, left unconfirmed for the lack of a microbiological swab; but further deaths may be caused by delayed care of other diseases, due to the reluctance of many patients to visit the hospitals during the pandemic. The same apparent underestimation of COVID-19 deaths emerges for other European countries, with more evident differences in the United Kingdom and in the Netherlands. In other countries, the number of excess deaths is lower than the average of the previous years, probably due to a delay in recording deaths. In conclusion, we have uncertainty about the real number of victims of this pandemic; we will improve our knowledge when numbers will be no longer provisional, but there are areas where it is impossible to get the perfect assessment; however these figures are rather important to better face a possible further epidemic wave.

La pandemia COVID-19 ha creato seri problemi a chi cerca di quantificare le percentuali di diffusione dell'infezione, di ospedalizzazione o di mortalità: infatti, la presenza di un numero elevato di soggetti infettati dal virus che non presentano alcun sintomo, o presentano una sintomatologia modesta o atipica, non consente una stima, anche grossolana, del denominatore delle incidenze citate.

Ma quando parliamo di mortalità anche il numeratore del rapporto presenta non pochi problemi.

I DUBBI SUI NUMERI

Il 28 aprile 2020 l'Istituto per gli Studi di Politica Internazionale (ISPI) pubblicava una relazione (1) che analizzava la discrepanza tra l'eccesso di mortalità nel 2020 rispetto al periodo 2015-2019 in sette paesi europei (Francia, Italia, Paesi Bassi, Regno Unito, Spagna, Svezia, Svizzera), riscontrando nella maggior parte di questi una importante sottostima dei morti dichiarati da fonti ufficiali per COVID-19. Facevano eccezione Svezia e Svizzera. Gli intervalli temporali

considerati erano disomogenei per data di partenza (dal 1 al 22 marzo) e durata dell'osservazione (da 21 a 35 giorni). Nei sette Paesi considerati, che includevano l'Italia, era presente un eccesso di mortalità di 86 510 persone, rispetto al quinquennio precedente. Dato che la stima ufficiale dei morti per COVID-19 era di 58 314 persone, risultava una differenza di 28 196 persone decedute in corso di epidemia, in eccesso rispetto alla mortalità media del periodo.

La stampa divulgativa, nel commentare la relazione, si domandava se fosse interessante sapere "quali sono i paesi che hanno barato nella comunicazione": ma è veramente una questione di barare sui numeri?

I dati italiani

Per quanto riguarda i dati epidemiologici legati alla pandemia, in Italia l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha il compito di coordinare la Sorveglianza Nazionale integrata COVID-19: quotidianamente raccoglie da Regioni e Province Autonome a livello individuale i dati microbiologici ed epidemiologici relativi ai casi di

Corrispondenza a: Luisa Zanolla, Via Albere 73, 37138 Verona, E-mail luisa.zanolla@univr.it

Ricevuto: 16.06.2020

Revisionato: 09.07.2020

Accettato: 11.07.2020

Pubblicato on-line: 15.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.077

infezione da SARS-CoV-2. La definizione internazionale di “caso” prevede che venga considerato come “caso confermato” una persona con verifica microbiologica della presenza del virus, a prescindere da sintomi e segni. L’ISS raccoglie anche dati demografici, informazioni sullo stato clinico e le comorbidità.

Il Dipartimento della Protezione Civile raccoglie quotidianamente (2) il numero totale di test positivi, decessi, ricoveri in ospedale e ricoveri in terapia intensiva in ogni Provincia d’Italia. La discrepanza temporale tra i dati delle due fonti è legata alla diversità di tempo necessaria a raccogliere e verificare dati individuali, rispetto alla raccolta di dati aggregati.

Per quanto riguarda i dati di mortalità, il primo livello di informazione per ottenere una stima dell’impatto della pandemia da COVID-19 sulla mortalità, è valutare se nel periodo più intenso della pandemia, da fine febbraio a fine aprile, il numero di morti per tutte le cause sia aumentato.

L’ISTAT pubblica i dati di mortalità sul portale I.Stat (3) dopo validazione; gli ultimi attualmente disponibili risalgono al 2018. Tuttavia, il 4 maggio ha pubblicato (4) i dati analitici di mortalità dal 1 gennaio al 15 aprile 2020 per 4433 comuni, su 7904 comuni italiani, verificati nella Anagrafe Nazionale della Popolazione Residente. Nel periodo dal 20 febbraio al 31 marzo si è avuto un numero di decessi di 90946, che rispetto ai 65592 che rappresentano la media degli anni 2015-2019, configura un aumento del 38,7%.

Elaborando su base quotidiana i dati per Comuni pubblicati dall’ISTAT, che forniscono informazioni fino al 15 aprile, si evidenzia la differenza dell’anno corrente (Figura 1) e come la mortalità totale definisca un picco nella seconda metà del mese di marzo, per poi decrescere.

La rappresentazione grafica consente anche di confermare la sostanziale stabilità dei dati nel periodo precedente, con un rialzo nei primi mesi del 2017, legato al picco più precoce della stagione influenzale 2016-2017 (5), nella quale prevaleva il virus A/H3N2, che si associa a forme più severe negli anziani e nei pazienti a rischio.

Dal 20 febbraio al 31 marzo 2020 la differenza nel numero di decessi è di 25354 unità; nello stesso periodo i decessi attribuiti alla COVID-19 sono stati 13710, che rappresentano il 54% dell’eccesso di mortalità.

Cosa sappiamo direttamente sui morti attribuiti alla COVID-19? Il Dipartimento della Protezione Civile presenta quotidianamente un bollettino (6) sull’andamento della pandemia, con possibilità di scaricare gli stessi dati, a partire dal 24 febbraio. I dati di mortalità fino al 15 maggio, elaborati dalle informazioni della Protezione Civile, sono rappresentati nella Figura 2. Come nei dati ISTAT di mortalità totale, il picco giornaliero di decessi si realizza negli ultimi giorni di marzo, per poi decrescere lentamente. Tuttavia, non è possibile rapportare questi dati di mortalità da COVID-19 con i dati sull’eccesso di mortalità del periodo, in

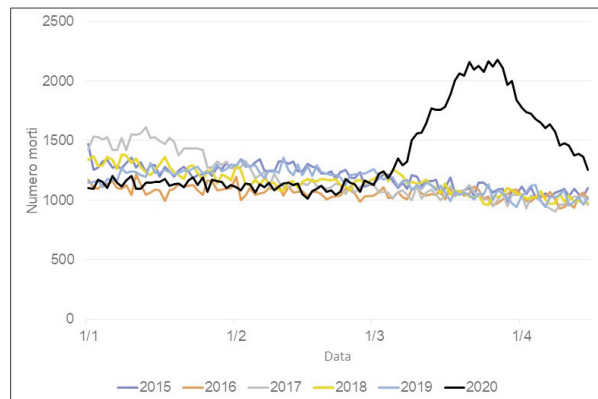


Figura 1
Mortalità per tutte le cause nei primi quattro mesi dell’anno, nel periodo dal 2015 al 2020. Dati ISTAT (4) sul 56% dei Comuni italiani.

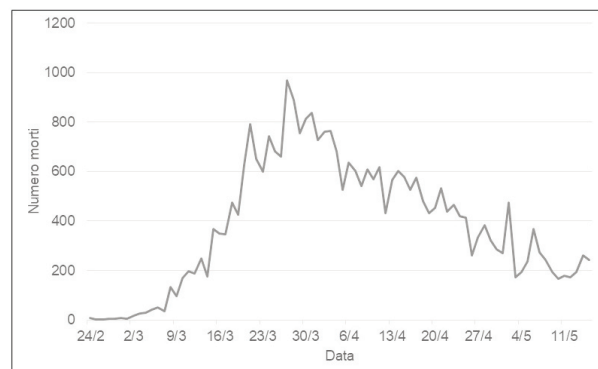


Figura 2
Numero di morti attribuiti a COVID-19 (con conferma microbiologica) nei dati della Sorveglianza Nazionale italiana.

quanto questi ultimi non sono riferiti all’intero territorio nazionale, e non sarebbe corretto ad essa estrapolarli.

Il 20 maggio l’Istituto Nazionale per la Previdenza Sociale (7) ha pubblicato un documento nel quale mette in discussione le stime presentate dalle fonti ufficiali. Basandosi sui propri archivi amministrativi, ha utilizzato come riferimento basale la media dei decessi giornalieri nel periodo 2015-2019, ponderata per la popolazione residente; questo dato riduce i dati spuri e tiene conto della variabilità tra i periodi dell’anno, considerando ad esempio l’aumento invernale della mortalità. Rispetto a questo dato basale, i primi due mesi del 2020 rientravano completamente in una situazione di normalità, anche in considerazione di un intensificarsi dell’epidemia influenzale all’inizio del nuovo anno, con picco di contagi alla quinta settimana (8).

Il 21 febbraio 2020 nel Lodigiano vengono dichiarati diversi casi di contagio da COVID 19, ed i primi decessi dovuti al virus. L’epidemia comincia a diffondersi rapidamente. Nel periodo dal 1 marzo al 30 aprile, il

documento INPS segnala un netto aumento dei decessi, rispetto a quelli attesi secondo i dati storici basali del periodo 2015-2019 (Figura 3). Nel periodo considerato i dati INPS evidenziano infatti un aumento di 46 909 decessi rispetto ai 109 520 attesi. Nello stesso periodo il numero di morti dichiarate come COVID-19, riportate nel documento dalla fonte ufficiale del Dipartimento della Protezione Civile, sono state 27 938 (9). La differenza è pari a 18 971 morti. La notizia è stata recepita con interesse e sorpresa dalla stampa: *“Inps shock: i morti COVID-19 sono 20 000 in più di quelli ufficiali”*.

Va sottolineato che i dati non sono confrontabili con quelli precedentemente pubblicati dall'ISTAT, che si riferiscono ad un diverso intervallo temporale, ma non sembrano contraddire la logica del confronto.

Ma dobbiamo ritenere, sulla base di queste stime, che se attribuiamo tutti i decessi in eccesso alla COVID-19, il numero di morti attribuito alla pandemia aumenterebbe del 67,9%?

Un aiuto all'interpretazione di questi dati ci viene dalla nuova relazione che l'ISTAT, unitamente all'ISS, ha pubblicato il 4 giugno (10), estesa a 7 270 Comuni, corrispondenti al 92% dei 7 904 comuni italiani, con una copertura pari al 93,5% della popolazione italiana. La copertura del territorio, rispetto al rapporto precedente, era meno sbilanciata verso le aree più interessate dalla COVID-19, coprendo il 94,3% dei comuni del nord, l'87,2% dei comuni del centro e l'89,8% dei comuni del mezzogiorno; si tratta quindi di dati che meglio rappresentano la realtà nazionale.

A livello nazionale, il numero di morti risulta di 80 623 nel mese di marzo, e di 64 693 nel mese di aprile; l'eccesso di mortalità rispetto alla media degli anni 2015-2019 è rispettivamente di 26 350 e 16 283 unità (48,6% e 33,6%). Considerando quindi globalmente i due mesi della parte più grave dell'epidemia, ci si ritrova con un eccesso di morti del 41,5%. La rappresentazione grafica dell'andamento dei decessi nel periodo della pandemia (Figura 4) è più rappresentativa della versione precedente, data la migliore copertura del territorio nazionale. Si evidenzia anche come il calo dei valori quotidiani di mortalità verso i valori di riferimento si realizzi con tendenziale maggior lentezza rispetto all'ascesa.

Ovviamente non tutto l'eccesso di mortalità è direttamente attribuibile alla COVID-19.

Nello stesso periodo, la Sorveglianza Nazionale ha segnalato 14 420 morti in pazienti con COVID-19 confermata nel mese di marzo e 13 426 nel mese di aprile; questi numeri spiegano rispettivamente il 54,7% e l'82,5% dell'eccesso di mortalità di questi due mesi; insieme la percentuale è del 65,3%. Restano quindi non spiegate il 34,7% delle morti in eccesso nei due mesi considerati.

Cosa potrebbe spiegare i numeri di questa discrepanza? Innanzitutto, esiste un certo numero di pazienti che muoiono senza che sia stato effettuato un tampone, per cui il decesso non viene ufficialmente

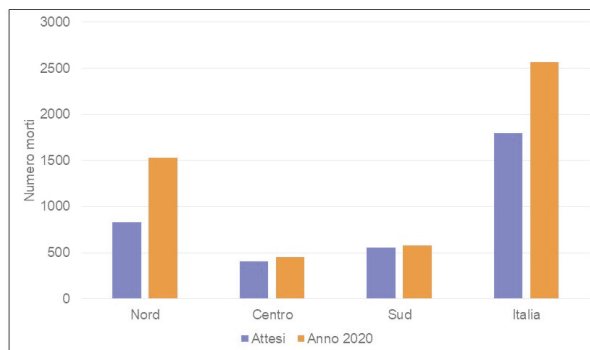


Figura 3
Discrepanza tra il numero di decessi per tutte le cause nel 2020 rispetto al periodo 2015-2019 nei dati forniti dall'Istituto Nazionale per la Previdenza Sociale (7).

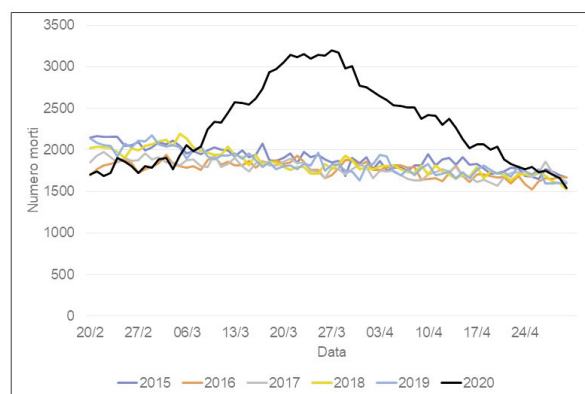


Figura 4
Mortalità per tutte le cause dall'esordio dell'epidemia di COVID-19 in Italia, a tutto l'aprile 2020, rispetto al periodo dal 2015 al 2020. Dati ISTAT sul 92% dei Comuni italiani (10).

attribuito alla pandemia; pazienti che muoiono fuori dall'ospedale, senza possibilità di una diagnosi etiologica. Non sono infatti conteggiati dalla Sorveglianza i pazienti deceduti per i quali il Medico curante formula una diagnosi clinica di COVID-19, non confermata dal tampone.

Ma esiste anche una quota di mortalità indotta indirettamente dalla pandemia. Un recente studio osservazionale italiano in area di cure intensive cardiologiche (11) segnala come il timore di recarsi in ospedale in corso di pandemia abbia condizionato una riduzione del 48,4% dei ricoveri settimanali per infarto miocardico transmurale, del 46,8% dei ricoveri per scompenso cardiaco e del 53,4% dei ricoveri per fibrillazione atriale. Come conseguenza, la mortalità per infarto nei pazienti ospedalizzati risultava aumentare dal 2,8% del 2019 al 9,7% del 2020. Ma occorre considerare anche quel quasi 50% di infarti non giunti in ospedale, dei quali una percentuale rilevante potrebbe verosimilmente essere deceduta a domicilio. Quanto

descritto in dettaglio per la patologia cardiologica è ovviamente altrettanto prevedibile per altre patologie gravi.

È pressoché impossibile stimare con precisione il tasso di mortalità della COVID-19, date le difficoltà a stimare in modo credibile il numero degli infetti, che costituirebbe il denominatore della stima, condizionato dal numero di tamponi effettuati e dal numero di asintomatici. L'ISTAT ha quindi elaborato il numero di decessi per regione, esprimendolo come tasso standardizzato di mortalità: si tratta di un aggiustamento del tasso di mortalità che permette di confrontare popolazioni che hanno distribuzione per età tra loro diverse. Il metodo di standardizzazione diretto per età è quello più utilizzato e consiste nel sommare i tassi che sono calcolati per ogni specifico gruppo di età su una popolazione di struttura standard, in questo caso la Popolazione Italiana al Censimento del 2011. I tassi standardizzati per 100 000 abitanti sono presentati in Figura 5 [dati ISTAT (10) elaborati graficamente dall'Autore].

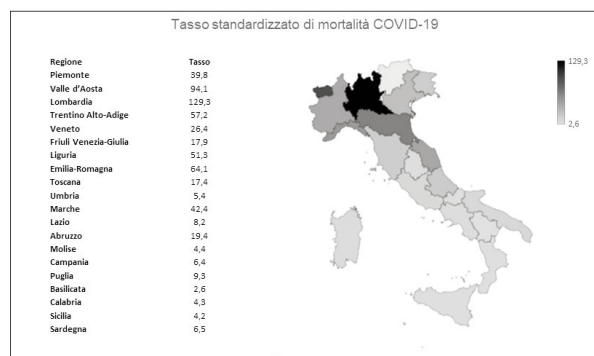


Figura 5
Tasso standardizzato di mortalità da COVID-19 nelle regioni italiane: dati ISTAT (10) elaborati graficamente

Emerge con evidenza come il dato nazionale di un tasso standardizzato del 39,2 per 100 000 abitanti raggruppi valori molto diversi, con valori molto più elevati per le aree del nord (70,3), rispetto al centro (15,2) e al mezzogiorno (6,9). La Lombardia resta la regione più colpita, con un tasso standardizzato di 129,3 per 100 000 abitanti; nella regione si è realizzato il 52% dei decessi COVID-19 documentati dalla Sorveglianza Integrata al 30 aprile.

Quindi l'incremento di 42 634 morti nei mesi di marzo ed aprile segnalati dal documento ISTAT-ISS (9), pari ad un aumento del 41,5% rispetto allo storico, rappresenta non solo le morti direttamente causate dalla COVID-19, ma le morti direttamente o indirettamente condizionate dalla pandemia. Sono numeri che fanno impressione; a mano a mano che le stime provvisorie di mortalità per tutte le cause si renderanno più consolidate, potremo avere numeri più

credibili sull'eccesso di mortalità in corso di pandemia da COVID-19. Sul numero dei morti direttamente o indirettamente legati alla pandemia, invece, potremo solo disporre di stime.

Anche sul denominatore delle stime di mortalità permangono riserve, come sul suoneratore, vista la pressoché impossibilità ad effettuare una stima credibile del numero di infetti.

Ma il problema dell'eccesso di mortalità è un problema soltanto italiano?

Altri paesi europei

Le fonti

Abbiamo effettuato il confronto con i dati di eccesso di mortalità rispetto agli ultimi due anni per alcune nazioni europee per le quali è disponibile pubblicamente un rapporto quotidiano o settimanale sul numero di decessi per tutte le cause.

Le fonti utilizzate per i dati di mortalità sono state:

- Belgio: STATBEL (12)
- Francia: INSEE – Institut National de la statistique et des études économiques (13)
- Paesi Bassi: Central Bureau of Statistics (14)
- Regno Unito – Office for National Statistics (15)
- Svezia – Statistics Sweden (16)
- Svizzera – Federal Statistical Office (17)

È possibile reperire dati aggiornati sui casi ed i decessi da COVID-19 sul sito Open Stats Coronavirus (18), che raccoglie dati da fonti nazionali:

- Belgio: SPF Santé Publique
- Francia: Agence Régionale de Santé
- Paesi Bassi: RIVM - National Institute for Public Health and the Environment
- Regno Unito: National Health Service
- Svezia: Public Health Agency of Sweden
- Svizzera: FOPH – Federal Office of Public Health

I dati

Abbiamo considerato i dati di mortalità per tutte le cause nel periodo 1° marzo – 30 aprile; tale periodo è stato scelto in quanto include il picco dei casi di mortalità per COVID-19 e perché sono disponibili dati di mortalità per tutte le cause, anche se provvisori, nei paesi considerati.

In tutti i paesi europei considerati, la mortalità per tutte le cause è risultata incrementata nel 2020. Le cumulative di mortalità nel periodo considerato sono rappresentate in Figura 6 (colonna A). L'aumento della mortalità per tutte le cause nel periodo considerato del 2020 va interpretato in funzione della mortalità per COVID-19. Il confronto è riportato in Figura 6 (colonna B). I dati numerici sono sintetizzati in Tabella 1.

Nei dati del Belgio, il numero di morti per COVID-19 è superiore all'eccesso di mortalità confrontato con gli anni precedenti; si tratta verosimilmente di un ritardo nella registrazione della mortalità totale, che potrà chiarirsi con l'acquisizione di dati più completi. Una differenza significativa nella quota dei morti in eccesso

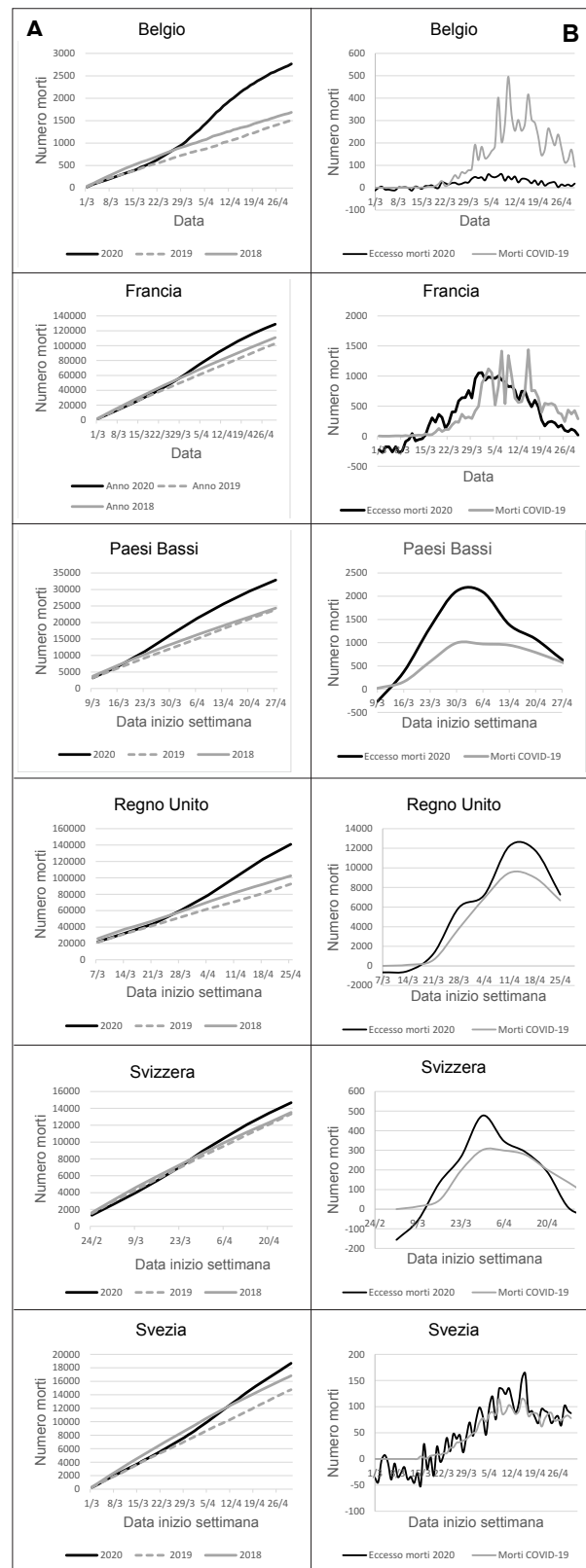


Figura 6

Colonna A: cumulativa di mortalità per tutte le cause nel 2020 e nei due anni precedenti, in 6 paesi europei. Colonna B: eccesso di mortalità nel 2020 rispetto alla media dei due anni precedenti, rispetto al numero ufficiale di morti COVID-19

Tabella 1

Dati di mortalità per tutte le cause e per COVID-19, nel periodo dal 1 marzo al 30 aprile 2020; la differenza è espressa come percentuale del numero di morti per COVID-19

	Morti anno 2020	Media morti 2018-2019	Eccesso morti 2020	Morti COVID-19	Differenza
Belgio	2 742	1 560	1 182	8 959	-7 777
Francia	127 056	104 809	22 247	24 376	-2 129
Paesi Bassi	32 867	24 125	8 742	5 056	3 686
Regno Unito	140 904	97 429	43 475	36 595	6 880
Svizzera	14 673	13 427	1 246	1 473	-227
Svezia	18 674	15 791	2 883	2 874	9

non spiegata dalla mortalità per COVID-19 si rileva per Paesi Bassi e Regno Unito. Lo stesso problema esiste per i dati italiani: il confronto viene effettuato con il quinquennio 2015-2019, e a fronte di un eccesso di morti nel 2020 di 42 633 unità, vengono spiegati come morti COVID-19 27 846 decessi. La differenza è di 14 787 morti, che rappresenterebbe un aumento del 53,1% delle morti attribuite alla COVID-19.

I dati sono eterogenei, e potrebbero risentire innanzitutto del ritardo della notifica dei decessi in generale; si ricordi che il nostro Istituto centrale statistico pubblica i dati consolidati sui decessi dopo oltre un anno, per cui dati provvisori, a latenza così breve, potrebbero essere incompleti o inesatti. Anche i dati sui morti per COVID-19 possono risentire dei criteri con cui ne è fissata l'identificazione e sulla tempestività di raccolta dei dati. Probabilmente non è un caso che la Svizzera e la Svezia, che forniscono i dati più congruenti, sono tra gli stati citati quelli con la numerosità più bassa.

Nei dati italiani è evidente l'apparente sottostima del numero di decessi da COVID-19, legata prevalentemente al criterio molto stringente e documentato con cui i decessi vengono attribuiti alla malattia.

CONCLUSIONI

La riflessione che deriva da questa analisi dei numeri è che, in un momento in cui si cerca di capire le caratteristiche dell'epidemia da COVID-19, la lettura dei numeri, e quindi la loro interpretazione, riesce difficoltosa, sia per l'esigenza di una rapidità maggiore rispetto alle procedure consolidate, che per la definizione non univoca degli eventi.

Per poter disporre di numeri migliori, anche se non ottimali, dovremo attendere tempo.

Informazioni aggiuntive, anche se non esaustive, potranno essere ottenute dai test sierologici fin qui eseguiti e da quelli previsti.

Quanto più ci avvicineremo ad una immagine reale della pandemia e delle sue vittime, tanto più sarà

possibile organizzare e dimensionare gli interventi per contenerla, per gestire un'eventuale seconda ondata e limitarne i danni.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- <https://www.ispionline.it/it/pubblicazione/fase-2-morti-sommerse-eccesso-di-zelo-25878> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-sorveglianza> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <http://dati.istat.it/Index.aspx> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.istat.it/it/archivio/240401> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.epicentro.iss.it/influenza/InflunetMetaStagionale2016-17> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <http://opendata.dpc.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/b0c68bce2cce478eaac82fe38d4138b1> (ultimo accesso: giugno 2020).
- INPS – Coordinamento generale Statistico attuariale. Analisi di mortalità del periodo di epidemia da COVID-19. <https://www.inps.it/nuovoportaleinps/default.aspx?itemdir=53705> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.epicentro.iss.it/influenza/aggiornamenti> (ultimo accesso: giugno 2020).
- Dipartimento della Protezione Civile - <https://github.com/pcm-dpc/COVID-19> (ultimo accesso: giugno 2020).
- https://www.istat.it/it/files//2020/06/Rapp_Istat_Iss_3Giugno.pdf (ultimo accesso: giugno 2020).
- De Rosa S, Spaccarotella C, Basso C, et al. Reduction of hospitalizations for myocardial infarction in Italy in the COVID-19 era. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa409.
- <https://statbel.fgov.be/en/open-data/number-deaths-day-sex-district-age> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.insee.fr/en/statistiques/4493806?sommaire=4493845> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.cbs.nl/en-gb/news/2020/21/mortality-lower-than-normal-in-week-20> (ultimo accesso: giugno 2020).
- <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/datasets/weeklyprovisi>

- onalfiguresondeathsregisteredinenglandandwales (ultimo accesso: giugno 2020).
16. <https://www.scb.se/en/finding-statistics/statistics-by-subject-area/population/population-composition/population-statistics/> (ultimo accesso: giugno 2020).
 17. <https://www.bfs.admin.ch/bfs/en/home/statistics/health/state-health/mortality-causes-death.html> (ultimo accesso: giugno 2020).
 18. <https://www.coronavirus-statistiques.com/> (ultimo accesso: giugno 2020).

Alla scoperta della patogenesi del COVID-19

Massimo Franchini

Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova

La nuova pandemia da COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), causata dal virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), ha messo in grave difficoltà, oltre al mondo intero, anche il mondo scientifico che si è trovato a dover fronteggiare una nuova patologia, fino ad ora sconosciuta (1,2). Ben presto, i ricercatori hanno realizzato che la malattia non era solamente polmonare, ma sistemica coinvolgendo il sistema infiammatorio e la coagulazione (3-5). Gli specialisti in Medicina di Laboratorio hanno moltiplicato i loro sforzi per individuare dei parametri di laboratorio utili ai clinici per valutare la prognosi dei pazienti affetti dalle forme gravi di COVID-19 (6). Contemporaneamente, sono stati pubblicati numerosi studi sulla patogenesi del COVID-19, volti ad individuare i meccanismi molecolari alla base di questa grave patologia infettiva con lo scopo di identificare efficaci strumenti terapeutici (7).

A questo riguardo, la Rassegna di Henry et al. (8), tradotta in Italiano e pubblicata qui di seguito, è particolarmente illuminante. Questo lavoro, che analizza lo stato dell'arte sulla patogenesi dell'infezione SARS-CoV-2, è estremamente chiaro e fornisce un utile aggiornamento per lo specialista in Medicina di Laboratorio riportando gli ultimi sviluppi su un argomento ancora non completamente conosciuto. Riassumo qui gli aspetti fondamentali dei tre capitoli riguardanti l'eziologia della malattia da COVID-19, e cioè l'iperinfiammazione, l'immunotrombosi e l'alterazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS).

Iperinfiammazione: il SARS-CoV-2 esprime proteine che inibiscono la produzione di interferone (IFN) di tipo I, con lo scopo di favorire la replicazione virale. La disregolazione della risposta legata all'IFN di tipo I ha come conseguenza una eccessiva infiltrazione del parenchima polmonare da parte dei monociti/macrofagi e dei neutrofili. Queste cellule, a loro volta, producono elevati livelli di citochine in grado di incrementare ulteriormente lo stato infiammatorio. L'iperinfiammazione, infine, contribuisce in maniera determinante allo sviluppo di varie forme di coagulopatia intravascolare, instaurando così un circolo vizioso.

Immunotrombosi: lo stato iperinfiammatorio promuove l'attivazione endoteliale in senso disfunzionale inducendo uno stato protrombotico. Il concetto di immunotrombosi coinvolge vari attori, tra cui il sistema coagulativo (con attivazione sia della via estrinseca che intrinseca) e le piastrine, che esercitano a loro volta un effetto pro-infiammatorio e richiamano i neutrofili che producono sostanze (i cosiddetti neutrophil extracellular traps o NETs, cioè filamenti di materiale nucleare estrusi nell'ambiente extracellulare in risposta a stimoli infiammatori) in grado di attivare ulteriormente le cellule endoteliali e le piastrine propagando lo stato pro-trombotico. Infine, un ruolo fondamentale nel concetto di immunotrombosi è svolto dal sistema del complemento che viene attivato attraverso varie vie e che amplifica l'attivazione della coagulazione.

Alterazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone: si ipotizza che una disfunzione del sistema RAAS contribuisca in modo significativo allo sviluppo di forme gravi di COVID-19, dal momento che l'ACE2, il recettore del SARS-CoV-2, è un componente fondamentale del sistema RAAS. L'ACE2 converte l'angiotensina II in angiotensina I. Il legame del SARS-CoV-2 al recettore ACE2 ne blocca l'attività producendo come risultato un aumento della concentrazione di angiotensina II che ha un effetto pro-infiammatorio, pro-ossidativo, vasocostrittivo e pro-fibrotico. Il sistema RAAS, infine, è legato intrinsecamente alla cascata coagulativa ed è in grado di incrementare il processo di immunotrombosi descritto precedentemente. Questo stato ipercoagulativo potrebbe spiegare il riscontro autoptico di depositi di fibrina all'interno degli alveoli nelle vittime del COVID-19 con malattia acuta da distress respiratorio (ARDS).

Corrispondenza a: Massimo Franchini, Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova, E-mail massimo.franchini@asst-mantova.it

Ricevuto: 15.06.2020

Revisionato: 16.06.2020

Accettato: 16.06.2020

Pubblicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.068

Gli autori concludono la loro rassegna con alcuni cenni terapeutici derivati dalle precedenti osservazioni sulla fisiopatologia del COVID-19: i farmaci immunomodulanti, anti-infiammatori, anticoagulanti, antiplastrinici e fibrinolitici possono essere utili nell'interrompere il circolo vizioso iperinflamazione-immunotrombosi che si instaura nei pazienti con forme gravi di infezione da SARS-CoV-2.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Zhai P, Ding Y, Wu X, Long J, et al. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020 doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105955 .
2. Peeri NC, Shrestha N, Rahman MS, et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int J Epidemiol* 2020 doi: 10.1093/ije/dyaa033.
3. Leisman DE, Deutschman CS, Legrand M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med* 2020 doi: 10.1007/s00134-020-06059-6.
4. Lee SG, Fralick M, Sholzberg M. Coagulopathy associated with COVID-19. *CMAJ* 2020 doi: 10.1503/cmaj.200685.
5. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol* 2020 doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
6. Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, et al. 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 doi: 10.1515/cclm-2020-0369.
7. Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J Thromb Haemost* 2020 doi: 10.1111/jth.14854.
8. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020;507:167-73.

Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare.

Brandon Michael Henry¹, Jens Vikse², Stefanie Benoit^{3,4}, Emmanuel J. Favaloro^{5,6}, Giuseppe Lippi⁷

¹Cardiac Intensive Care Unit, The Heart Institute, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA

²Clinical Immunology Unit, Stavanger University Hospital, Stavanger, Norway

³Division of Nephrology and Hypertension, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA

⁴Department of Pediatrics, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

⁵Department of Haematology, Sydney Centres for Thrombosis and Haemostasis, Institute of Clinical Pathology and Medical Research, NSW Health Pathology, Westmead Hospital, Westmead, New South Wales, Australia

⁶School of Biomedical Sciences, Charles Sturt University, Wagga Wagga, New South Wales, Australia

⁷Section of Clinical Biochemistry, Department of Neuroscience, Biomedicine and Movement, University of Verona, Verona, Italy

Traduzione a cura di Maria Stella Graziani

Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

ABSTRACT

Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis.

Early clinical evidence suggests that severe cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), are frequently characterized by hyperinflammation, imbalance of renin-angiotensin-aldosterone system, and a particular form of vasculopathy, thrombotic microangiopathy, and intravascular coagulopathy. In this paper, we present an immunothrombosis model of COVID-19. We discuss the underlying pathogenesis and the interaction between multiple systems, resulting in propagation of immunothrombosis, which through investigation in the coming weeks, may lead to both an improved understanding of COVID-19 pathophysiology and identification of innovative and efficient therapeutic targets to reverse the otherwise unfavorable clinical outcome of many of these patients.

INTRODUZIONE

Evidenze cliniche preliminari suggeriscono che i casi più gravi della attuale malattia da coronavirus (COVID-19), la nuova pandemia causata dal virus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), sono caratterizzati frequentemente da iper-infiammazione, squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone, e da una particolare forma di vasculopatia, microangiopatia trombotica e coagulazione

intravascolare.

In studi precedenti, il D-dimero (1), il tempo di protrombina (2) e la piastrinopenia (3) sono stati identificati come marcatori prognostici di COVID-19 grave e/o di mortalità. E' stato ipotizzato che valori elevati di D-dimero al momento del ricovero in ospedale e durante la successiva progressione di malattia possano riflettere l'infiammazione polmonare indotta da COVID-19 con attivazione locale delle piastrine e del sistema della coagulazione, e accompagnata da una

Questo articolo è la traduzione di Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. Clin Chim Acta 2020 doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.027 (disponibile come materiale supplementare 1S).

L'Editore Elsevier autorizza espressamente il riutilizzo dell'articolo in qualsiasi forma e mezzo, purché la fonte originale venga citata, quale contributo alla diffusione e condivisione della informazione e della conoscenza nel corso della pandemia COVID-19. Clinica Chimica Acta non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.

Ricevuto: 04.06.2020

Revisionato: 04.06.2020

Accettato: 05.06.2020

Pubblicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.067

relativa ipofibrinolisi, che in seguito tende a riversarsi in circolo (4). Inoltre, nei pazienti con COVID-19 grave e fatale sono stati anche segnalati valori elevati di lattato deidrogenasi (LDH) e bilirubina, associati spesso a diminuzione della concentrazione di emoglobina (2); l'alterazione di questi biomarcatori, associata all'osservazione clinica suggeriscono una potenziale iper-infiammazione, che conduce a un fenomeno di microangiopatia trombotica.

L'evenienza di questo fenomeno trombotico durante COVID-19 è supportato dalla recente descrizione di un resoconto autoptico che descrive occlusioni multiple e microtrombi nel sistema vascolare polmonare (5). In una coorte danese di pazienti COVID-19 critici in trattamento con eparina a basso peso molecolare (LMWH, a dosaggio standard o elevato), la diagnostica per immagini nei pazienti con sintomi suggestivi di tromboembolismo, ha rilevato trombosi venosa nel 27%, e trombosi arteriosa nel 3,7% dei casi gravi (6).

Lo sviluppo di microtrombi multipli (e probabilmente primitivi) nel sistema vascolare polmonare potrebbe spiegare il rapido deterioramento, fino al collasso polmonare, che viene osservato nei pazienti che progrediscono rapidamente verso la sindrome da distress respiratorio acuto (acute respiratory distress syndrome, ARDS) con importante edema polmonare, ipossiemia, disallineamento fra ventilazione e perfusione e formazione di "shunt". Con il progredire della risposta infiammatoria, una microangiopatia sistemica può portare a disfunzione multiorgano (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) includendo anche cardiomiopatia, insufficienza acuta renale ed epatica, ischemia mesenterica e lesioni neurologiche.

L'emostasi è legata intrinsecamente alla risposta infiammatoria e immunologica. Sulla base di modelli animali e di studi *in vitro* su SARS-CoV-1, come anche dei dati clinici su COVID-19 disponibili al momento, è possibile ipotizzare che SARS-CoV-2 comprometta la risposta anti-virale sia innata che adattativa, inneschi una risposta infiammatoria esagerata e disturbi il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS); tutto questo conduce ad una deleteria ipercoagulabilità ed immunotrombosi. SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 condividono circa l'85% del genoma, ed entrambi utilizzano lo stesso recettore, l'angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), per entrare nelle cellule bersaglio (7). Come conseguenza di questa omologia, ci si aspetta che i due virus condividano anche aspetti clinici ed immunopatogenetici; esistono tuttavia anche importanti diversità e l'estrapolazione di dati da SARS a COVID-19 richiede cautela. Ad esempio, l'affinità di legame per ACE2 della glicoproteina di superficie "spike" di SARS-CoV-2 è molto più elevata della proteina omologa di SARS-CoV-1, aumentando quindi potenzialmente la virulenza e la patogenicità *in vivo* del più recente SARS-CoV-2.

In questo lavoro, presentiamo un modello di immunotrombosi per COVID-19, illustrato in Figura 1. Viene qui discussa la patogenesi sottostante ed anche l'interazione tra diversi sistemi, che propaga iper-

infiammazione e immunotrombosi; questo modello, con l'aiuto di ricerche future, potrà condurci sia ad una migliore comprensione della fisiopatologia di COVID-19 che allo sviluppo di nuovi agenti terapeutici.

IPER-INFIAMMAZIONE

Le cellule del sistema immunitario innato esprimono i "pattern recognition receptors" (PRRs) che sono in grado di riconoscere i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) o a danno aspecifico (DAMPs). I virus a RNA (quali SARS-CoV-2) possono essere riconosciuti dai PRRs citoplasmatici e endosomiali (che includono TLR3, TLR7, RIG-I e MDA-5) ed attivare così la produzione di interferone di tipo I (IFNs) (8). Questi, (IFN- α e IFN- β) giocano un ruolo chiave nella risposta dell'ospite alle infezioni virali, in quanto sono in grado di bloccare la replicazione virale e di aumentare i meccanismi effettori antivirali (8). SARS-CoV-1 (e molto probabilmente il suo omologo SARS-CoV-2) esprimono proteine che inibiscono la produzione di IFNs di tipo I (attraverso l'inibizione della trasduzione del segnale di TLR3 and TLR7) con il risultato di ritardare la risposta antivirale e di facilitare una rapida replicazione del virus con conseguente effetto citopatico diretto indotto dal virus negli stadi precoci della malattia (9-11).

Una risposta persistentemente disregolata e ritardata in termini di IFNs di tipo I condurrà, assieme alle citochine, chemochine e DAMPS rilasciati dagli pneumociti, ad una massiva infiltrazione di monociti/macrofagi (M ϕ) e neutrofilii (PMNs) nel parenchima polmonare (12). I M ϕ e PMNs a loro volta, sono in grado di produrre elevati livelli di citochine pro-infiammatorie [interleukine (IL) 1 β , IL-6 e tumor necrosis factor alpha (TNF α)] e di chemochine, che amplificano ulteriormente il reclutamento di cellule del sistema immunitario innato, culminando così nella iper-infiammazione e nella "tempesta citochinica" che caratterizza i casi più gravi di COVID-19 (13). L'associazione tra la tempestiva risposta di IFNs di tipo I e la gravità della malattia è stata dimostrata in un modello murino di SARS (12). Una precoce somministrazione di IFN- β ricombinante proteggeva il topo dalla malattia, mentre la risposta ritardata e aberrante di IFNs di tipo I era associata ad un grave danno polmonare, con infiltrazione massiva di cellule del sistema immunitario, elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, infiltrazione extravascolare e edema alveolare (12).

Una ulteriore importante osservazione è che i topi che non esprimono i recettori per IFNs di tipo I (Ifnar-/-) avevano una malattia lieve, con una immunopatologia polmonare molto ridotta (12). Questo testimonia che l'attività antivirale degli IFNs di tipo I può contribuire alla infiltrazione polmonare di cellule del sistema immunitario e ad instaurare una iper-infiammazione dannosa se la loro espressione è disregolata. Inoltre, lo stesso modello animale di

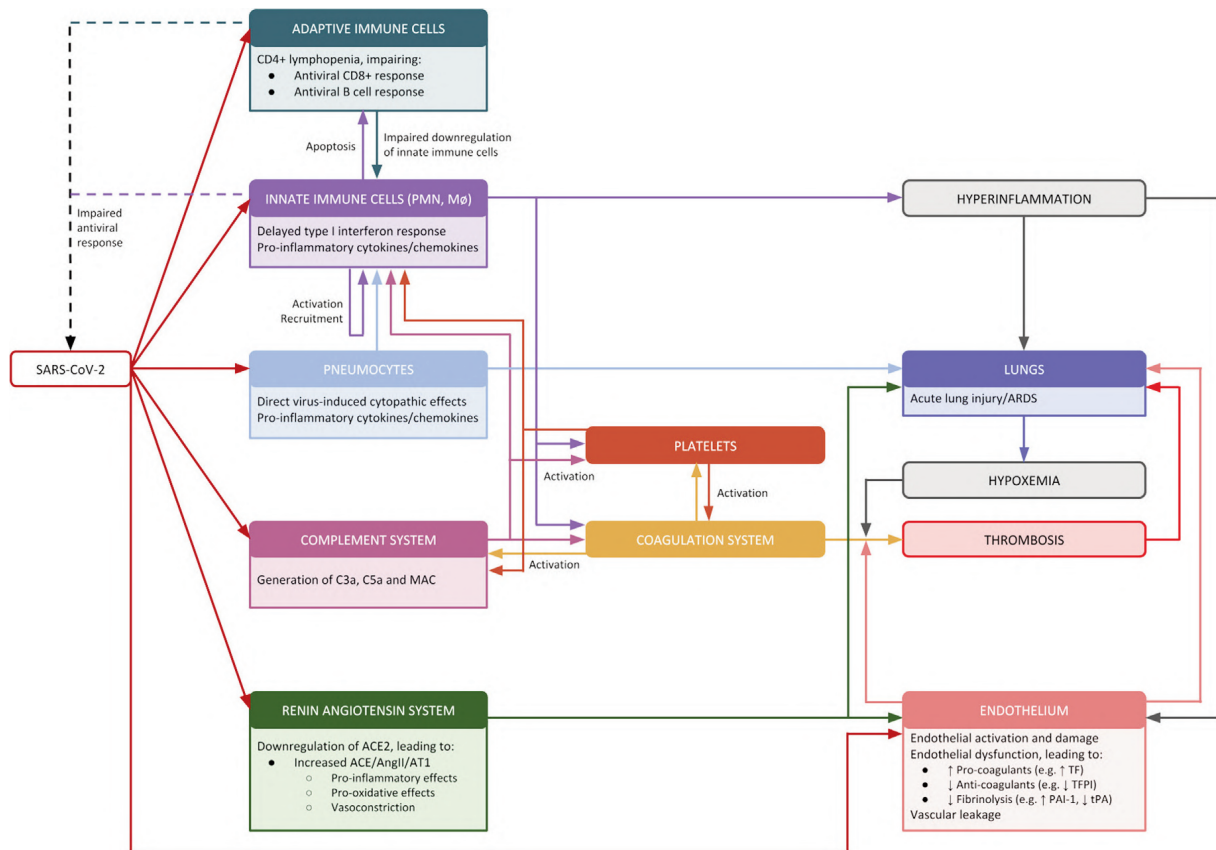


Figura 1

Modello fisiopatologico per l'instaurarsi di immunotrombosi in COVID-19. L'infezione da SARS-Cov-2 è associata ad una risposta virale alterata che porta ad una rapida replicazione virale e ad uno stato iper-infiammatorio successivo. L'iper-infiammazione e lo squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) indotto dal virus, provocano un danno polmonare acuto con conseguente ipossiemia. L'iper-infiammazione, il RAAS e l'ipossiemia inducono una disfunzione endoteliale ed uno stato di iper-coagulabilità con conseguente immunotrombosi diffusa che propaga ulteriormente il danno d'organo.

ACE, angiotensin converting enzyme; ACE2, angiotensin converting enzyme 2; AngII, angiotensina II; ARDS, sindrome da distress respiratorio acuto; AT1, recettore di angiotensina II di tipo 1; MAC, complesso di attacco alla membrana; Mø, monociti/macrofagi; PAI-1, inibitore dell'attivatore del plasminogeno; PMN, neutrofili polimorfonucleati; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TF, fattore tessale; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; tPA, attivatore tessale del plasminogeno.

SARS ha confermato che un aumento dell'arruolamento e della attivazione di Mø gioca un ruolo centrale nella immunopatologia polmonare, dato che una deplezione di Mø migliora il danno polmonare, senza influenzare significativamente la carica virale (12). COVID-19 è associata ad una linfopenia di cellule T CD4+ e CD8+, causata probabilmente dalla combinazione di un effetto citopatico diretto del virus e dell'aumento della apoptosi delle cellule T dovuta alla disregolazione citochinica (14,15). I linfociti CD4+ sono importanti modulatori della risposta immunitaria, e si era ritenuto che la diminuzione di questo tipo di linfociti, che è stata osservata nella SARS, contribuisse alla iper-infiammazione attraverso un meccanismo di "down-regulation" del processo infiammatorio (16,17). Inoltre, una linfopenia CD4+ può compromettere la

risposta virale adattativa attraverso un inadeguato supporto delle cellule T ai linfociti CD8+ citotossici e le cellule B.

I dati provenienti dalla Cina e dall'Italia mostrano che il 64-71% dei pazienti deceduti per COVID-19 sono maschi (18,19), dato che è stato attribuito alle rilevanti differenze osservate fra sessi di alcuni fattori di rischio (co-morbidità) (20). Tuttavia, anche le differenze immunobiologiche di genere possono contribuire a queste diversità. Il gene *TLR7* si trova sul cromosoma X e sfugge alla inattivazione del cromosoma X, risultando così iper-espresso nelle femmine (21). I *TLR7* agonisti inducono un maggiore rilascio di IFN-α dalle cellule nelle femmine (22) e l'estradiolo aumenta il rilascio di IFN di tipo I in seguito all'agonismo del *TLR7* (23). L'espressione bi-allelica di *TLR7* e questa specifica attività

dell'estradiolo possono rendere le femmine meno suscettibili all'antagonismo virale del IFN di tipo I, che può determinare una risposta di IFN di tipo I più sostenuta negli stadi precoci della malattia. Questo meccanismo potrebbe aumentare la risposta antivirale iniziale e prevenire la successiva aberrante iper-infiammazione, spiegando così (almeno in parte) la maggiore gravità della malattia nei maschi. Questa teoria tuttavia necessita di conferme ulteriori.

Nel loro insieme, questi meccanismi possono spiegare l'innescò da parte dell'antagonismo virale di IFN di tipo I, di una cascata di eventi che porta ad un esteso effetto citopatico, indotto dal virus (attraverso il rilascio di DAMPs e di citochine dalle cellule infette) e ad una risposta disregolata di IFN di tipo I. A sua volta, questo contribuisce ad una eccessiva infiltrazione di M ϕ e PMN e alla apoptosi di cellule T, determinando un aumento graduale di uno stato iper-infiammatorio. Come si vedrà più avanti, l'iper-infiammazione può contribuire allo sviluppo di varie forme di coagulopatia intravascolare che favorisce a sua volta la risposta infiammatoria.

IMMUNOTROMBOSI

L'iper-infiammazione promuove l'attivazione delle cellule endoteliali e una disfunzionalità dell'endotelio che può condurre ad uno stato pro-trombotico. L'emostasi e il sistema immunitario innato sono infatti particolarmente interconnessi. Durante l'infezione, le piastrine, i fattori della coagulazione, e gli effettori del sistema immunitario innato (quali M ϕ , PMNs e il sistema del complemento) interagiscono nella formazione di trombi in un processo definito "immunotrombosi" (conosciuto anche come trombo-infiammazione) (24-26). Mentre questo processo è intrinsecamente vantaggioso perché inibisce la diffusione dei patogeni, fornisce un supporto strutturale per l'endotelio ed un sito per l'attivazione delle cellule del sistema immunitario innato, una immunotrombosi non controllata e diffusa può originare una microangiopatia potenzialmente devastante, che contribuisce alla progressione verso una generalizzata ARDS, indotta da COVID-19 (26,27).

Il concetto di immunotrombosi richiede una comprensione di base dei processi coinvolti e delle reciproche interazioni. Il sistema coagulativo è attivato attraverso la via del fattore tissutale (estrinseco), è amplificato dalla via precedentemente conosciuta come "via intrinseca" (ora definita "thrombin burst") che poi converge per attivare la via "comune", dove il fattore V attivato (FVa) e il fattore X attivato (FXa) trasformano la protrombina in trombina (28). La trombina poi trasforma il fibrinogeno in fibrina, che viene stabilizzata, all'interno del coagulo, dal fattore XIII attivato (FXIIIa). I coaguli vengono poi demoliti dalla plasmina, nel processo di fibrinolisi, che è iniziato da due proteine che trasformano il plasminogeno in plasmina: l'attivatore tissutale del

plasminogeno (tPA) e l'urochinasasi (uPA). Il tPA è più specifico per la frammentazione della fibrina, mentre uPA è maggiormente coinvolto nella flogosi acuta, nella cicatrizzazione delle ferite e nella riparazione tessutale (29). Sia tPA che uPA sono inibiti dall'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1). L'equilibrio tra tPA/uPA e PAI-1 assicura una omeostasi bilanciata. Tuttavia nell'ARDS in generale (e in particolare nell'ARDS indotta da COVID-19), questo equilibrio viene disturbato, con una elevata attività di PAI-1 che determina una relativa ipofibrinolisi con conseguente deposizione di fibrina negli alveoli polmonari e microtrombosi dei capillari periaveolari (29).

E' stato ben dimostrato che durante l'infiammazione sia la via estrinseca (fattore tissutale, TF) che la intrinseca (FXII) della coagulazione possono essere attivate. La via estrinseca viene attivata dal TF, che negli stati infiammatori è espresso dalle cellule endoteliali attivate e dai M ϕ (26). Inoltre i PMNs possono rilasciare "neutrophil extracellular traps" (NETs) contenenti DAMPs e varie altre molecole bioattive all'interno di un processo chiamato (NETosi). I NETs stimolano la via intrinseca attraverso l'attivazione del FXII. I NETs attivano anche le cellule endoteliali, le piastrine, e il complemento, e contengono proteasi in grado di inattivare gli anticoagulanti endogeni, propagando così uno stato pro-coagulativo (30). Sebbene NETosi sia un processo tipicamente legato alla risposta contro patogeni extra-cellulari, molte evidenze stanno dimostrando che NETosi è presente anche nelle infezioni virali (31). Una eccessiva quantità di NETs contribuisce al danno acuto polmonare nella polmonite influenzale (32), ma ulteriori studi sono necessari per stabilire il loro contributo nella COVID-19.

Le piastrine svolgono ruoli ben conosciuti nel processo di coagulazione, ma hanno anche effetti pro-infiammatori (33). L'attivazione delle piastrine produce modificazioni della loro forma e un rilascio dei granuli immagazzinati. I granuli piastrinici alfa contengono molecole immunostimolanti quali "including platelet factor 4" (CXCL4), "proplatelet basic protein", "neutrophil-activating peptide-2 (CXCL7)" e "stromal cell-derived factor" (33), che sono coinvolte nella attivazione e nel reclutamento di PMNs e M ϕ . Le piastrine attivate sono anche una importante sorgente di IL-1 β , una interleuchina pro-infiammatoria (33), che è alla base del loro ruolo nel processo di immunotrombosi. La P-selectina, derivata dai granuli è "up-regolata" alla superficie delle piastrine attivate e questo facilita l'interazione con i PMNs reclutati, dando origine a complessi piastrine-neutrofilii (34). Inoltre, le piastrine attivate possono stimolare i PMNs reclutati a sottoporsi al processo di NETosi, che a sua volta attiva altre piastrine, dando origine ad un ciclo di feedback positivo (34). Sebbene questo processo possa essere positivo all'inizio della malattia perché aiuta a contenere la diffusione dell'infezione,

l'accumulo dei complessi piastrine-neutrofili può originare trombi occlusivi e MODS (27).

Le piastrine possono attivare il sistema della coagulazione e viceversa; l'interazione tra piastrine e proteine della coagulazione ha un ruolo intrinseco nella regolazione di entrambi questi fattori chiave. Le piastrine attivate espongono sulla loro superficie fosfolipidi per l'assemblaggio di complessi formati da enzima-cofattore-substrato durante tutta la cascata coagulativa. Le piastrine favoriscono il mantenimento della coagulazione nel sito del trombo emostatico. Questo protegge le proteine della coagulazione dalla inattivazione da parte degli inibitori sia plasmatici che piastrinici e previene così l'instaurarsi di una coagulopatia disseminata (DIC) (35).

Il concetto di immunotrombosi è ulteriormente chiarito dalla complessa interazione tra i sistemi della coagulazione e il complemento (30). Il complemento è composto da proteine circolanti ed è parte del sistema immunitario innato (36). Il complemento viene attivato attraverso tre vie (classica, alternativa e delle lectine), che convergono sul clivaggio proteolitico della proteina C3 (36). L'attivazione del complemento innesca una cascata di eventi che culmina nella generazione di molecole bioattive pleiotropiche, quali C3a, C5a e il complesso di attacco alla membrana (MAC) (36).

Un modello murino di SARS ha dimostrato che una attivazione del complemento disregolata contribuisce alla immunopatologia; infatti i topi knock out per il C3 (C3^{-/-}) hanno mostrato un danno polmonare e una infiammazione sistemica minore in presenza di una carica virale simile a quella dei topi di controllo (37).

C3a e C5a esercitano numerosi effetti pro-infiammatori, che includono la degranolazione delle mast-cellule e il reclutamento di M ϕ e PMN (36). Tuttavia, essi esercitano anche effetti pro-trombotici mediante l'attivazione delle piastrine e di cellule endoteliali, e l'aumento dell'espressione del fattore tissutale e del fattore di von Willebrand (VWF) (30). Altre proteine del complemento (MASP-1 e MASP-2) contribuiscono all'instaurarsi di uno stato di ipercoagulabilità, convertendo la protrombina in trombina e il fibrinogeno in fibrina (30). I componenti attivati della cascata coagulativa (inclusa la trombina) possono a loro volta attivare C3 e C5 (30), aumentando di conseguenza le interazioni immunotrombotiche tra i sistemi coagulativo e del complemento.

Considerato che l'endotelio vascolare esprime ACE2, e che è stato dimostrato essere un sito attivo dell'infezione da SARS-CoV-1 (38), diventa plausibile che SARS-CoV-2 sia in grado di infettare queste cellule, come ipotizzato recentemente da Nicin et al (39). Uno studio istopatologico recentemente pubblicato, ha evidenziato infezione delle cellule endoteliali ed endotelite in tre pazienti con COVID-19 (40). Nonostante gli effetti citopatici diretti del virus, poiché l'iper-infiammazione produce una disfunzione

e un danno endoteliale sia locale che sistemico, si instaura una aumentata permeabilità vascolare, un eccesso di generazione della trombina (che è anche un attivatore potente delle piastrine) e una inibizione della fibrinolisi (27). Nei pazienti con ARDS non-specifica, le concentrazioni plasmatiche di TF e PAI-1 sono significativamente elevate, se confrontate con quelle di pazienti non-ARDS, inducendo una coagulopatia polmonare indotta da una aumentata generazione della trombina e da una depressione broncoalveolare della fibrinolisi (41,42). Inoltre, noi ipotizziamo che l'aumentato rischio di COVID-19 grave e fatale nei pazienti con comorbidità quali il diabete, l'ipertensione, e l'obesità sia in parte dovuto alla sottostante disfunzione endoteliale, che è comune in queste condizioni.

L'"up-regulation" degli elementi pro-coagulanti è guidata dalle citochine pro-infiammatorie, in particolare IL-1 β , IL-6, e TNF α , che sono significativamente aumentate nei pazienti con COVID-19 (2). Queste citochine promuovono il rilascio dei multimeri di VWF a peso molecolare elevato (ultra-large), la produzione di TF e FVII/FVIIa, con aumentata generazione di trombina ed una diminuzione degli anticoagulanti endogeni quali il "tissue factor pathway inhibitor" (TFPI), l'antitrombina e la proteina C attivata (43). Le numerose interazioni tra cellule endoteliali, piastrine, M ϕ , PMNs, i sistemi del complemento e della coagulazione, danno origine ad uno stato di iper-coagulabilità con un aumentato livello di fattori pro-coagulanti, diminuita concentrazione di anticoagulanti e ipofibrinolisi. Sebbene elevate concentrazioni di D-dimero siano riscontrate nei pazienti con COVID-19 grave, noi ipotizziamo che questo rifletta uno squilibrio significativo tra generazione di trombina e fibrinolisi, particolarmente all'interno del sistema vascolare polmonare. Esistono sostanziali evidenze che sia nella ARDS non-specifica che nella sepsi, sia presente uno stato pro-coagulativo, caratterizzato da una massiva produzione di trombina (44). Più specificamente riguardo ai coronavirus, è stato dimostrato che SARS-CoV-1 è in grado di up-regolare il gene *hfgl2 prothrombinase*, che può ulteriormente contribuire alla generazione di trombina e allo stato di iper-coagulabilità in COVID-19 (45).

Complessivamente, con la progressione dell'iper-infiammazione sistemica, questi processi possono culminare in una diffusa immunotrombosi, contribuendo così ad una disfunzione multi-organo. Lo stato di ipercoagulabilità può anche essere accresciuto da altri fattori clinici quali l'ipossiemia (secondaria a ALI-acute lung injury/ARDS), l'ipertermia (che può attivare le piastrine e la coagulazione) e/o l'ipovolemia (secondaria a perdite gastrointestinali o ad un bilancio negativo dovuto al protocollo terapeutico per ARDS) (46). L'ipossiemia innesca una aumentata espressione di fattori inducibili dall'ipossia (HIF). Questo promuove

ulteriormente l'infiammazione, aumentando così la viscosità ematica e contribuendo a peggiorare lo stato di iper-coagulabilità. In più, gli HIFs possono attivare direttamente le piastrine e i fattori della coagulazione, intensificando l'espressione dei TF, aumentando il PAI-1, ed inibendo la proteina endogena anticoagulante S (44).

Uno studio precedente ha suggerito che l'anticoagulazione ottenuta con LMWH può essere associata ad una prognosi migliore nei pazienti con COVID-19 grave (47). L'eparina, oltre ad agire come anticoagulante, possiede alcune proprietà anti-infiammatorie che possono essere di beneficio nella COVID-19. Una meta-analisi ha riportato che nella ARDS non-specifica, la somministrazione di LMWH durante la settimana iniziale era associata ad una riduzione della mortalità del 37% a 28 giorni (48). In una recente piccola serie di casi di 3 pazienti con COVID-19, la somministrazione di tPA ha determinato un miglioramento transitorio della funzionalità polmonare (49). Tuttavia, l'uso di anticoagulanti e fibrinolitici in COVID-19 richiede ulteriori studi, che includano l'identificazione dei componenti più compromessi al fine di stabilire una efficace terapia mirata.

Uno studio recente ha evidenziato la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) in pazienti con COVID-19 (50). La sindrome da anti-fosfolipidi (APS) è definita come trombosi artero e/o venosa (o come patologia gravidica, in caso di APS ostetrica) con positività di anticorpi aPL IgG e/o IgM [anticardiolipina (aCL)] e/o B2 glicoproteina (a β 2GPI) e/o lupus anticoagulant (LAC). Per la diagnosi di APS nell'ambito della trombosi, gli aPL o la positività al LAC devono essere presenti in due diverse occasioni con un minimo di 12 settimane di intervallo. È da sottolineare che una positività transitoria agli anticorpi aPL è spesso presente nelle infezioni, ma che questo reperto non assume necessariamente un significato clinico. Nello studio cui si fa riferimento, sono stati descritti aCL di classe IgA e a β 2GPI IgA/IgG (il titolo e i metodo analitico non erano riportati). Il LAC era negativo e non era evidente una seconda valutazione di aPL (50). Per cui, questo reperto può essere rappresentativo di una positività anticorpale non specifica (e clinicamente irrilevante) correlata all'infezione (nell'ambito di una immunotrombosi non-APS, indotta dal COVID-19), piuttosto che una reale APS.

SQUILIBRIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (RAAS)

Una disfunzione di RAAS ha un ruolo importante nella fisiopatologia della ARDS non-specifica (51,52). ACE2, il recettore dell'ospite di SARS-CoV-2 è un componente maggiore di RAAS (7). L'ipotesi è che le alterazioni di RAAS contribuiscano in modo significativo alla probabilità di sviluppare una COVID-

19 grave (53,54).

L'enzima ACE converte l'angiotensina I (AngI) in angiotensina II (AngII), mentre ACE2 converte AngII in angiotensina 1-7 (Ang1-7). AngII si lega al recettore AngII di tipo 1 (AT1) ed esercita effetti pro-infiammatori, pro-ossidativi, vasocostrittori ed anche fibrotici (53). Al contrario, Ang1-7 si lega al recettore Mas (MasR) ed esercita effetti anti-infiammatori, anti-ossidativi e vasodilatatori (53). Possiamo ipotizzare che il legame di SARS-CoV-2 ad ACE2 attenui l'attività di ACE2 attraverso l'internalizzazione, spostando l'equilibrio ACE/ACE2 verso uno stato dominato da elevati livelli di AngII, che causa vasocostrizione polmonare nonché un danno infiammatorio, ossidativo e fibrotico all'organo stesso, progredendo in definitiva verso ALI/ARDS. COVID-19 sembra più grave nei pazienti con ipertensione, malattie cardiovascolari e diabete (55). Queste condizioni sono associate a livelli di base diminuiti della espressione di ACE2, che si ipotizza renda questi pazienti più suscettibili ad uno squilibrio ACE/ACE2 mediato da SARS-CoV-2 (56).

In un modello animale con SARS-CoV-1, la proteina "spike" del virus provocava un danno polmonare acuto, che era attenuato dall'uso di bloccanti di AT1 (angiotensin receptor blocker, ARB) (57). Liu et al. hanno osservato che le concentrazioni plasmatiche di AngII erano significativamente più elevate in un piccolo gruppo di pazienti COVID-19 che nei soggetti sani (58). Inoltre, hanno anche osservato che i livelli di AngII in questi pazienti erano correlati con la carica virale e il danno polmonare, suggerendo che l'infezione possa provocare uno squilibrio del sistema RAAS e che il segnale predominante ACE/AngII possa costituire un determinante importante per lo sviluppo di ARDS. La vasocostrizione polmonare causata dall'aumento di AngII può anche accrescere l'ipossiemia, che è in grado di influenzare l'iper-coagulabilità, come descritto in precedenza.

Il sistema RAAS è intrinsecamente legato alla cascata coagulativa e può esacerbare il processo di immunotrombosi, promuovendo la formazione di trombi in COVID-19 (Figura 2). Come primo punto, AngII induce l'espressione di TF e PAI-1 da parte delle cellule endoteliali attraverso il recettore AT1, contribuendo a sbilanciare il rapporto PAI-1/tPA e quindi uno stato di iper-coagulazione (59,60). Questo potrebbe spiegare la permanenza di depositi di fibrina osservati nei pazienti con ARDS non-specifica, una caratteristica che è stata anche osservata nei polmoni delle vittime di SARS e COVID-19 (29,37,61). Una altra interessante osservazione è che AngII stimola il rilascio di PAI-1 dagli adipociti attraverso i recettori AT1 e può in parte spiegare la aumentata gravità della malattia nei pazienti con indice di massa corporea elevato (62).

In secondo luogo, ACE metabolizza la bradichinina. La bradichinina stimola la

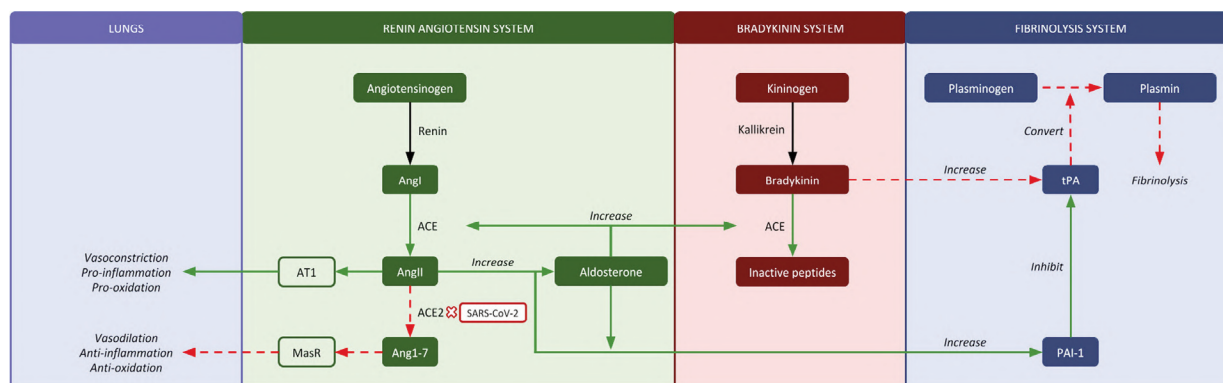


Figura 2

Interazioni potenziali tra il sistema renina-angiotensina, il sistema della bradichinina e la fibrinolisi nella COVID-19 grave. Le frecce indicano le interazioni. Le scritte in corsivo rappresentano la funzione fisiologica della molecola o dell'enzima. Il colore delle frecce indica come SARS-CoV-2 può influenzare. Le frecce verdi piene indicano che in COVID-19 il processo (in corsivo) è accentuato, mentre le frecce rosse tratteggiate indicano che in COVID-19 il processo (in corsivo) è soppresso. Ad esempio: in COVID-19 una diminuzione di ACE2 aumenta AngII, che aumenta l'aldosterone, che aumenta l'espressione di ACE, causando una diminuzione importante di bradichinina, inibendo così il normale aumento di tPA mediato dalla bradichinina stessa.

ACE, angiotensin converting enzyme; ACE2, angiotensin converting enzyme 2; AngI, angiotensina I; AngII, angiotensina II; Ang1-7, angiotensina 1-7; AT1, recettore di angiotensina II di tipo 1; MasR, recettore Mas; PAI-1, inibitore dell'attivatore del plasminogeno; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; tPA, attivatore tissutale del plasminogeno.

vasodilatazione ed il rilascio di tPA dalle cellule endoteliali (63). È tuttavia ancora poco chiaro in quale modo il sistema kallikreina/bradichinina possa venire alterato dallo squilibrio del sistema RAAS indotto dalla COVID-19. Si può ipotizzare che la risposta infiammatoria all'infezione induca un aumento della produzione di bradichinina (e quindi un aumento di tPA). Tuttavia, un aumento di AngII porterebbe ad un aumento di aldosterone che potrebbe ulteriormente stimolare l'attività di ACE, che converte la bradichinina a peptidi inattivi, attenuando così l'aumento di tPA mediato dalla bradichinina (64). Basandosi sull'osservazione di ipopotassiemia nei pazienti COVID-19, è stato supposto un iperaldosteronismo in COVID-19 grave (65). I livelli di aldosterone e i livelli di PAI-1 sono correlati (66). È stato dimostrato inoltre che l'aldosterone aumenta direttamente l'espressione di PAI-1, specialmente nel tessuto renale (69).

Da questo deriva che, mentre la bradichinina (e quindi tPA) può essere aumentata, ACE, AngII e aldosterone (e quindi PAI-1) sono aumentati in maniera molto più significativa, provocando una diminuzione del rapporto tPA/PAI-1, e promuovendo così una ipofibrinolisi. In aggiunta alla formazione di microtrombi, questo sbilanciamento (tPA e uPA diminuiti e PAI-1 aumentato) può condurre ad una scarsa risoluzione delle lesioni alveolari e spiegare il significativo grado di fibrosi osservato nei pazienti COVID-19 (29,61).

Complessivamente, i livelli aumentati di AngII possono esacerbare una eventuale disfunzione endoteliale (sia essa attiva o al limite) e contribuire così al danno polmonare in COVID-19. Gli ACE inibitori (ACEi) sono in grado di migliorare la funzione endoteliale ed è stato suggerito che il trattamento con ACEi si associ a forme di meno gravi di COVID (54,70). È interessante osservare che gli ACEi possono diminuire i livelli di PAI-1 ed aumentare il rilascio di tPA perché aumentano la concentrazione di bradichinina (71-75). D'altra parte, è stato dimostrato che gli ARBs hanno un effetto variabile sul PAI-1 [aumento (76), diminuzione (77), o nessun effetto (78,79)] e non aumentano i livelli di tPA (74).

Lo spironolattone, un bloccante del recettore per l'aldosterone, è in grado di diminuire i livelli di PAI-1 (66,80). In uno studio della durata di una settimana, il trattamento con spironolattone di pazienti ipertesi, ha significativamente ridotto i livelli di PAI-1 e aumentato il tPA rispetto ai valori basali (80). Altri studi tuttavia non hanno evidenziato tali modificazioni (81). Le differenze tra studi diversi mettono bene in evidenza la complessità del sistema RAAS; differenze nella volemia e nel grado di attivazione del sistema RAAS sono probabilmente fattori contribuenti (80, 81). Gli effetti del sistema RAAS sul sistema polmonare e sull'emostasi, lo rendono un allettante obiettivo per il trattamento di COVID-19, ma ulteriori e urgenti studi sono necessari per confermare queste ipotesi e definire gli obiettivi terapeutici ottimali (53,54).

CONCLUSIONI

L'iper-infiammazione e l'immunotrombosi sono probabilmente fattori centrali nella fisiopatologia di COVID-19. L'iper-reattività piastrinica, l'ipercoagulabilità, l'ipofibrinolisi, l'esagerata attivazione del complemento e lo squilibrio del sistema RAAS, concomitanti ad una disfunzione endoteliale (indotta dalla infiammazione) conducono probabilmente ad una coagulopatia COVID-indotta. Fortunatamente, la medicina moderna dispone di numerose opzioni terapeutiche contro i diversi meccanismi coinvolti, purchè i componenti che influenzano la malattia siano identificati. L'immunomodulazione (che include gli inibitori delle citochine e del complemento), gli inibitori del RAAS, gli anticoagulanti, gli antiplastrinici, e i fibrinolitici, possono tutti avere un ruolo nella terapia della COVID-19. Sono dunque urgentemente necessari altri studi per definire quale sistema e quali componenti sono danneggiati e quali contribuiscono maggiormente alla morbilità e mortalità in COVID-19. Studi multicentrici e collaborazioni internazionali consentiranno di poter rispondere a queste questioni aperte permettendo interventi terapeutici e di monitoraggio mirati.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- G. Lippi, E.J. Falavero, D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis, *Thromb. Haemost.* (2020), <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709650>.
- B.M. Henry, M.H.S. de Oliveira, S. Benoit, M. Plebani, G. Lippi, 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. (CCLM)*. 1 (2020), <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369>.
- G. Lippi, M. Plebani, B.M. Henry, Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis, *Clin. Chim. Acta*. 506 (2020) 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.022>.
- J. Thachil, The versatile heparin in COVID-19, *J. Thromb. Haemost.* (2020), <https://doi.org/10.1111/jth.14821>.
- W. Luo, H. Yu, J. Gou, X. Li, Y. Sun, J. Li, L. Liu, Clinical Pathology of Critical Patient with Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19), (2020). <https://www.preprints.org/manuscript/202002.0407/v1> (accessed April 5, 2020).
- F.A. Klok, M.J.H.A. Kruip, N.J.M. van der Meer, M.S. Arbous, D.A.M.P.J. Gommers, K.M. Kant, F.H.J. Kaptein, J. van Paassen, M.A.M. Stals, M.V. Huisman, H. Endeman, Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19, *Thromb. Res.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013>.
- P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H.-R. Si, Y. Zhu, B. Li, C.-L. Huang, H.-D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R.-D. Jiang, M.-Q. Liu, Y. Chen, X.-R. Shen, X. Wang, X.-S. Zheng, K. Zhao, Q.-J. Chen, F. Deng, L.-L. Liu, B. Yan, F.-X. Zhan, Y.-Y. Wang, G.-F. Xiao, Z.-L. Shi, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature* 579 (2020) 270–273, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- S. Jensen, A.R. Thomsen, Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion, *J. Virol.* 86 (2012) 2900–2910, <https://doi.org/10.1128/JVI.05738-11>.
- K.-L. Siu, K.-H. Kok, M.-H.J. Ng, V.K.M. Poon, K.-Y. Yuen, B.-J. Zheng, D.-Y. Jin, Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3-TANK-TBK1/IKKepsilon complex, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16202–16209, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008227>.
- X. Chen, X. Yang, Y. Zheng, Y. Yang, Y. Xing, Z. Chen, SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex, *Protein Cell*. 5 (2014) 369–381, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0026-3>.
- S.-W. Li, C.-Y. Wang, Y.-J. Jou, S.-H. Huang, L.-H. Hsiao, L. Wan, Y.-J. Lin, S.-H. Kung, C.-W. Lin, SARS Coronavirus Papain-Like Protease Inhibits the TLR7 Signaling Pathway through Removing Lys63-Linked Polyubiquitination of TRAF3 and TRAF6, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016), <https://doi.org/10.3390/ijms17050678>.
- R. Channappanavar, A.R. Fehr, R. Vijay, M. Mack, J. Zhao, D.K. Meyerholz, S. Perlman, Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice, *Cell Host Microbe* 19 (2016) 181–193, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>.
- P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown, E. Sanchez, R.S. Tattersall, J.J. Manson, COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *The Lancet*. 395 (2020) 1033–1034, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0).
- X. Wang, W. Xu, G. Hu, S. Xia, Z. Sun, Z. Liu, Y. Xie, R. Zhang, S. Jiang, L. Lu, SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion, *Cell. Mol. Immunol.* (2020) 1–3, <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0424-9>.
- L. Tan, Q. Wang, D. Zhang, J. Ding, Q. Huang, Y.-Q. Tang, Q. Wang, H. Miao, Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study, *Signal Transduct. Targeted Therapy*. 5 (2020) 1–3, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>.
- J. Chen, Y.F. Lau, E.W. Lamirande, C.D. Paddock, J.H. Bartlett, S.R. Zaki, K. Subbarao, Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cells are important in control of SARS-CoV infection, *J. Virol.* 84 (2010) 1289–1301, <https://doi.org/10.1128/JVI.01281-09>.
- R. Channappanavar, S. Perlman, Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology, *Semin Immunopathol.* 39 (2017) 529–539, <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>.
- The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020, *CCDCW. 2* (2020) 113–122.
- Italian National Institute of Health, Report on the characteristics of COVID-19 positive patients deceased in Italy (2020).
- C. Wenham, J. Smith, R. Morgan, COVID-19: the

- gendered impacts of the outbreak, *The Lancet*. 395 (2020) 846–848, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30526-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30526-2).
21. M. Souyris, C. Cenac, P. Azar, D. Daviaud, A. Canivet, S. Grunenwald, C. Pienkowski, J. Chaumeil, J.E. Mejía, J.-C. Guéry, TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells, *Sci. Immunol.* 3 (2018), <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aap8855>.
 22. B. Berghöfer, T. Frommer, G. Haley, L. Fink, G. Bein, H. Hackstein, TLR7 ligands induce higher IFN- α production in females, *J. Immunol.* 177 (2006) 2088–2096, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2088>.
 23. C. Seillet, S. Laffont, F. Trémollières, N. Rouquié, C. Ribot, J.-F. Arnal, V. Douin- Echinard, P. Gourdy, J.-C. Guéry, The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor α signaling, *Blood* 119 (2012) 454–464, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371831>.
 24. L. Guo, M.T. Rondina, The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02204>.
 25. F. Gaertner, S. Massberg, Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity, *Semin. Immunol.* 28 (2016) 561–569, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.010>.
 26. S.P. Jackson, R. Darbousset, S.M. Schoenwaelder, Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms, *Blood* 133 (2019) 906–918, <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-882993>.
 27. F. Frantzeskaki, A. Armaganidis, S.E. Orfanos, Immunothrombosis in Acute Respiratory Distress Syndrome: Cross Talks between Inflammation and Coagulation, *Res.* 93 (2017) 212–225, <https://doi.org/10.1159/000453002>.
 28. G. Lippi, D. Adcock, E.J. Favaloro, Understanding the “philosophy” of laboratory hemostasis, *Diagnosis (Berl.)* 6 (2019) 223–226, <https://doi.org/10.1515/dx-2018-0099>.
 29. H. Kwaan, Coronavirus Disease 2019: The Role of the Fibrinolytic System from Transmission to Organ Injury and Sequelae, *Semin. Thromb. Hemost.* (2020), <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709996>.
 30. C.B. Keragala, D.F. Draxler, Z.K. McQuilten, R.L. Medcalf, Haemostasis and innate immunity - a complementary relationship: A review of the intricate relationship between coagulation and complement pathways, *Br. J. Haematol.* 180 (2018) 782–798, <https://doi.org/10.1111/bjh.15062>.
 31. G. Schönrich, M.J. Raftery, Neutrophil Extracellular Traps Go Viral, *Front. Immunol.* 7 (2016) 366, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>.
 32. T. Narasaraju, E. Yang, R.P. Samy, H.H. Ng, W.P. Poh, A.-A. Liew, M.C. Phoon, N. van Rooijen, V.T. Chow, Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 199–210, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.013>.
 33. C.N. Morrell, A.A. Aggrey, L.M. Chapman, K.L. Modjeski, Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells, *Blood* 123 (2014) 2759–2767, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-462432>.
 34. A.Z. Zucoloto, C.N. Jenne, Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection, *Front Cardiovasc Med.* 6 (2019), <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00085>.
 35. P.N. Walsh, Platelet coagulation-protein interactions, *Semin. Thromb. Hemost.* 30 (2004) 461–471, <https://doi.org/10.1055/s-2004-833481>.
 36. J.V. Sarma, P.A. Ward, The complement system, *Cell Tissue Res.* 343 (2011) 227–235, <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>.
 37. L.E. Gralinski, T.P. Sheahan, T.E. Morrison, V.D. Menachery, K. Jensen, S.R. Leist, A. Whitmore, M.T. Heise, R.S. Baric, Complement Activation Contributes to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pathogenesis, *MBio.* 9 (2018), <https://doi.org/10.1128/mBio.01753-18>.
 38. J. Ye, B. Zhang, J. Xu, Q. Chang, M.A. McNutt, C. Korteweg, E. Gong, J. Gu, Molecular pathology in the lungs of severe acute respiratory syndrome patients, *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 538–545, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060469>.
 39. L. Nicin, W.T. Abplanalp, H. Mellentin, B. Kattih, L. Tombor, D. John, J.D. Schmitto, J. Heineke, F. Emrich, M. Arsalan, T. Holubec, T. Walther, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Cell type-specific expression of the putative SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human hearts, *Eur Heart J.* (n.d.), <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa311>.
 40. Z. Varga, A.J. Flammer, P. Steiger, M. Haberecker, R. Andermatt, A.S. Zinkernagel, M.R. Mehra, R.A. Schuepbach, F. Ruschitzka, H. Moch, Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19, *The Lancet.* (2020), [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5).
 41. A. Ozolina, M. Sarkele, O. Sabelnikovs, A. Skesters, I. Jaunalksne, J. Serova, T. Ievins, L.J. Bjertnaes, I. Vanags, Activation of Coagulation and Fibrinolysis in Acute Respiratory Distress Syndrome: A Prospective Pilot Study, *Front Med (Lausanne)* 3 (2016), <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00064>.
 42. G.J. Glas, K.F. Van Der Sluijs, M.J. Schultz, J.-J.H. Hofstra, T. Van Der Poll, M. Levi, Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome, *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 17–25, <https://doi.org/10.1111/jth.12047>.
 43. N. Beristain-Covarrubias, M. Perez-Toledo, M.R. Thomas, I.R. Henderson, S.P. Watson, A.F. Cunningham, Understanding Infection-Induced Thrombosis: Lessons Learned From Animal Models, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2569, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02569>.
 44. S. Schulman, COVID-19, prothrombotic factors and venous thromboembolism, *Semin. Thromb. Hemost.* (2020).
 45. M. Han, W. Yan, Y. Huang, H. Yao, Z. Wang, D. Xi, W. Li, Y. Zhou, J. Hou, X. Luo, Q. Ning, The nucleocapsid protein of SARS-CoV induces transcription of hfg12 prothrombinase gene dependent on C/EBP α , *J. Biochem.* 144 (2008) 51–62, <https://doi.org/10.1093/jb/mvn042>.
 46. M.A.S. Meyer, S.R. Ostrowski, A. Overgaard, M.S. Ganio, N.H. Secher, C.G. Crandall, P.I. Johansson, Hypercoagulability in response to elevated body temperature and central hypovolemia, *J. Surg. Res.* 185 (2013) e93–e100, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.06.012>.
 47. N. Tang, H. Bai, X. Chen, J. Gong, D. Li, Z. Sun, Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy, *J. Thromb. Haemost.* (2020), <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
 48. J. Li, Y. Li, B. Yang, H. Wang, L. Li, Low-molecular-weight heparin treatment for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 11 (2020) 414–422.
 49. J. Wang, N. Hajizadeh, E.E. Moore, R.C. McIntyre, P.K. Moore, L.A. Veress, M.B. Yaffe, H.B. Moore, C.D. Barrett, Tissue Plasminogen Activator (tPA) Treatment for COVID-19 Associated Acute Respiratory Distress Syndrome

- (ARDS): A Case Series, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. n/a (n.d.). <https://doi.org/10.1111/jth.14828>.
50. Y. Zhang, M. Xiao, S. Zhang, P. Xia, W. Cao, W. Jiang, H. Chen, X. Ding, H. Zhao, H. Zhang, C. Wang, J. Zhao, X. Sun, R. Tian, W. Wu, D. Wu, J. Ma, Y. Chen, D. Zhang, J. Xie, X. Yan, X. Zhou, Z. Liu, J. Wang, B. Du, Y. Qin, P. Gao, X. Qin, Y. Xu, W. Zhang, T. Li, F. Zhang, Y. Zhao, Y. Li, S. Zhang, Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19, *N. Engl. J. Med.* (2020) e38, <https://doi.org/10.1056/NEJMc2007575>.
 51. E. Vrigkou, I. Tsangaris, S. Bonovas, A. Tsantes, P. Kopterides, The evolving role of the renin-angiotensin system in ARDS, *Crit. Care* 21 (2017), <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1917-5>.
 52. H. Zhang, A. Baker, Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy, *Crit. Care* 21 (2017), <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1882-z>.
 53. B.M. Henry, J. Vikse, Clinical Characteristics of Covid-19 in China, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020), <https://doi.org/10.1056/NEJMc2005203>.
 54. F. Sanchis-Gomar, C.J. Lavie, C. Perez-Quilis, B.M. Henry, G. Lippi, Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Anti-Hypertensives (Angiotensin Receptor Blockers and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors) in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *Mayo Clinic Proceedings*. (2020) 19.
 55. W.-J. Guan, Z.-Y. Ni, Y. Hu, W.-H. Liang, C.-Q. Ou, J.-X. He, L. Liu, H. Shan, C.-L. Lei, D.S.C. Hui, B. Du, L.-J. Li, G. Zeng, K.-Y. Yuen, R.-C. Chen, C.-L. Tang, T. Wang, P.-Y. Chen, J. Xiang, S.-Y. Li, J.-L. Wang, Z.-J. Liang, Y.-X. Peng, L. Wei, Y. Liu, Y.-H. Hu, P. Peng, J.-M. Wang, J.-Y. Liu, Z. Chen, G. Li, Z.-J. Zheng, S.-Q. Qiu, J. Luo, C.-J. Ye, S.-Y. Zhu, N.-S. Zhong, China Medical Treatment Expert Group for Covid-19, Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China, *N. Engl. J. Med.* (2020), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.
 56. C. Tikellis, M.C. Thomas, Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease, *Int J Pept. 2012* (2012), <https://doi.org/10.1155/2012/256294>
 57. K. Kuba, Y. Imai, S. Rao, H. Gao, F. Guo, B. Guan, Y. Huan, P. Yang, Y. Zhang, W. Deng, L. Bao, B. Zhang, G. Liu, Z. Wang, M. Chappell, Y. Liu, D. Zheng, A. Leibbrandt, T. Wada, A.S. Slutsky, D. Liu, C. Qin, C. Jiang, J.M. Penninger, A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.* 11 (2005) 875–879, <https://doi.org/10.1038/nm1267>.
 58. Y. Liu, Y. Yang, C. Zhang, F. Huang, F. Wang, J. Yuan, Z. Wang, J. Li, J. Li, C. Feng, Z. Zhang, L. Wang, L. Peng, L. Chen, Y. Qin, D. Zhao, S. Tan, L. Yin, J. Xu, C. Zhou, C. Jiang, L. Liu, Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury, *Sci. China Life Sci.* 63 (2020) 364–374, <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1643-8>.
 59. D.E. Vaughan, S.A. Lazos, K. Tong, Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 995–1001, <https://doi.org/10.1172/JCI117809>.
 60. S. Nakamura, I. Nakamura, L. Ma, D.E. Vaughan, A.B. Fogo, Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo¹, *Kidney Int.* 58 (2000) 251–259, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00160.x>.
 61. X.H. Yao, T.Y. Li, Z.C. He, Y.F. Ping, H.W. Liu, S.C. Yu, H.M. Mou, L.H. Wang, H.R. Zhang, W.J. Fu, T. Luo, F. Liu, C. Chen, H.L. Xiao, H.T. Guo, S. Lin, D.F. Xiang, Y. Shi, Q.R. Li, X. Huang, Y. Cui, X.Z. Li, W. Tang, P.F. Pan, X.Q. Huang, Y.Q. Ding, X.W. Bian, A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies, *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 49 (2020) E009, <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193>.
 62. Skurk Thomas, Lee Yu-Mi, Hauner Hans, Angiotensin II and Its Metabolites Stimulate PAI-1 Protein Release From Human Adipocytes in Primary Culture, *Hypertension* 37 (2001) 1336–1340, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.5.1336>.
 63. N.J. Brown, J.H. Nadeau, D.E. Vaughan, Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin, *Thromb. Haemost.* 77 (1997) 522–525.
 64. D. Stoll, R. Yokota, D. Sanches Aragão, D.E. Casarini, Both aldosterone and spironolactone can modulate the intracellular ACE/ANG II/AT1 and ACE2/ANG (1–7)/ MAS receptor axes in human mesangial cells, *Physiol Rep.* 7 (2019).
 65. G. Lippi, A.M. South, B.M. Henry, ANNALS EXPRESS: Electrolyte Imbalances in Patients with Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *Ann Clin Biochem.* (2020) 0004563220922255. <https://doi.org/10.1177/0004563220922255>.
 66. P. Sawathiparnich, S. Kumar, D.E. Vaughan, N.J. Brown, Spironolactone abolishes the relationship between aldosterone and plasminogen activator inhibitor-1 in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 448–452, <https://doi.org/10.1210/jcem.87.2.7980>.
 67. J. Ma, A. Weisberg, J.P. Griffin, D.E. Vaughan, A.B. Fogo, N.J. Brown, Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against aldosterone-induced glomerular injury, *Kidney Int.* 69 (2006) 1064–1072, <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000201>.
 68. N.J. Brown, S. Nakamura, L. Ma, I. Nakamura, E. Donnert, M. Freeman, D.E. Vaughan, A.B. Fogo, Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo, *Kidney Int.* 58 (2000) 1219–1227, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00277.x>.
 69. J. Yuan, R. Jia, Y. Bao, Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells, *J. Biochem. Mol. Biol.* 40 (2007) 180–188, <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.2.180>.
 70. Rajagopalan Sanjay, Harrison David G., Reversing Endothelial Dysfunction With ACE Inhibitors, *Circulation* 94 (1996) 240–243, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.3.240>.
 71. N.J. Brown, K.S. Kim, Y.Q. Chen, L.S. Blevins, J.H. Nadeau, S.G. Meranze, D.E. Vaughan, Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 336–344, <https://doi.org/10.1210/jcem.85.1.6305>.
 72. Nancy J. Brown, Mehmet A. Agirbasli, Gordon H. Williams, W. Reid Litchfield, Douglas E. Vaughan, Effect of Activation and Inhibition of the Renin-Angiotensin System on Plasma PAI-1, *Hypertension* 32 (6) (1998) 965–971, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.32.6.965>.
 73. D.E. Vaughan, J.L. Rouleau, P.M. Ridker, J.M. Arnold, F.J. Menapace, M.A. Pfeffer, Effects of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction, *HEART Study Investigators, Circulation.* 96 (1997) 442–447, <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.2.442>.
 74. T. Matsumoto, K. Minai, H. Horie, N. Ohira, H. Takashima,

- Y. Tarutani, Y. Yasuda, T. Ozawa, S. Matsuo, M. Kinoshita, M. Horie, Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II type 1 receptor antagonism augments coronary release of tissue plasminogen activator in hypertensive patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (2003) 1373–1379, [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(03\)00162-1](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(03)00162-1).
75. K. Minai, T. Matsumoto, H. Horie, N. Ohira, H. Takashima, H. Yokohama, M. Kinoshita, Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, *J. Am. Coll. Cardiol.* 37 (2001) 1565–1570, [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01202-5](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01202-5).
76. R. Fogari, A. Zoppi, A. Mugellini, P. Maffioli, P. Lazzari, G. Derosa, Role of angiotensin II in plasma PAI-1 changes induced by imidapril or candesartan in hypertensive patients with metabolic syndrome, *Hypertens. Res.* 34 (2011) 1321–1326, <https://doi.org/10.1038/hr.2011.137>.
77. L. Liu, S.-P. Zhao, H.-N. Zhou, Q.-Z. Li, J.-X. Li, Effect of fluvastatin and valsartan, alone and in combination, on postprandial vascular inflammation and fibrinolytic activity in patients with essential hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50 (2007) 50–55, <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31805751d3>.
78. T.-H. Lin, W.-C. Voon, H.-W. Yen, C.-H. Huang, H.-M. Su, W.-T. Lai, S.-H. Sheu, Lercanidipine and losartan effects on blood pressure and fibrinolytic parameters, *Kaohsiung J. Med. Sci.* 22 (2006) 177–183, [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70304-3](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70304-3).
79. T. Skurk, Y.-M. Lee, T.-O. Nicuta-Röfhs, B. Haastert, A. Wirth, H. Hauner, Effect of the angiotensin II receptor blocker candesartan on fibrinolysis in patients with mild hypertension, *Diabetes Obes. Metab.* 6 (2004) 56–62, <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2004.00316.x>.
80. A.I. Yalcin, M. Dincer, V. Aslan, Z. Gulbas, Effect of spironolactone on impaired fibrinolysis of hypertensive patients, *Kidney Blood Press. Res.* 25 (2002) 260–264, <https://doi.org/10.1159/000066348>.
81. P. Sawathiparnich, L.J. Murphey, S. Kumar, D.E. Vaughan, N.J. Brown, Effect of Combined AT1 Receptor and Aldosterone Receptor Antagonism on Plasminogen Activator Inhibitor-1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*

Diagnosi del diabete gestazionale durante l'emergenza COVID-19: semplificazione del protocollo.

Andrea Mosca¹, Martina Montagnana²

¹Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano

²Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona

Abbiamo avuto modo recentemente di presentare due contributi sul ruolo del laboratorio nella diagnosi del diabete gestazionale (1, 2). Torniamo ora sull'argomento per presentare un altro documento (un "position statement") prodotto dalle due principali associazioni diabetologiche italiane, la Società Italiana di Diabetologia (SID) e l'Associazione Medici Diabetologi (AMD) (3). Lo scopo di tale documento è di evitare che lo screening del diabete gestazionale venga del tutto abbandonato laddove non sia possibile, per le donne in gravidanza, effettuare la curva da carico orale di glucosio, come prescritto dalle linee guida vigenti (4, 5) per effetto della pandemia di COVID-19 (infezione da SARS-CoV-2) in corso, che ha imposto (ed è possibile che possa imporre nel prossimo futuro) restrizioni nell'accesso alle strutture sanitarie.

Il documento fa quindi il punto sulla procedura per lo screening del diabete gestazionale e sostanzialmente propone una semplificazione nella procedura, che consisterebbe nel limitarsi ad effettuare la sola misurazione della glicemia plasmatica a digiuno, al posto dell'intera curva da carico orale di glucosio per consentire alle gravide di trascorrere il minor tempo possibile all'interno degli ambulatori.

Senza entrare nei dettagli del documento, ci preme qui sottolineare alcuni aspetti:

- La procedura semplificata è valida fino a che non verrà dichiarata cessata l'emergenza nazionale, da parte del Governo e/o dal Ministero della Salute.
- La procedura vale solo se sono rispettate le indicazioni temporali per effettuare lo screening (cioè attorno alla 14[°] settimana per le donne a rischio 1, ed attorno alla 26[°] per le donne a rischio 2).
- La procedura ha un limite, perché molte donne in gravidanza, che stanno sviluppando il diabete gestazionale, possono avere una glicemia basale ben inferiore a 92 mg/dL (5,2 mmol/L) ma mostrare poi glicemie alterate ad un'ora e/o a due ore dal carico. Quindi va presa come semplificazione, con l'indicazione di tornare alla procedura raccomandata nel più breve tempo possibile.
- La decisione in merito al rapporto rischio/benefici va presa dal team diabetologico che include certamente il responsabile di laboratorio ed altre figure di rilievo nella gestione dell'ambulatorio.
- Abbiamo chiesto di inserire nel documento AMD-SID un esplicito riferimento alla corretta gestione della fase pre-analitica per la determinazione del glucosio plasmatico, in base alle raccomandazioni inter-societarie recentemente definite (ultimo paragrafo del Documento e riferimento 6 della bibliografia del documento citato).
- La procedura va archiviata e tenuta in considerazione nel malaugurato caso che si debba andare incontro ad altri periodi di confinamento, sia per una recrudescenza della pandemia COVID-19 sia per altre emergenze. Il documento ha quindi un valore che va al di là della presente situazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonetti G, Giavarina D, Urbani D et al. Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:143-8.
2. Carta M, Giavarina D, Bonetti G. Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:206-8.
3. Position statement AMD SID. Raccomandazioni per la diagnosi del diabete gestazionale durante la pandemia COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi 10.19186/BC_2020.049
4. Sistema nazionale per le linee guida. Gravidanza fisiologica. Linea Guida 20. SNLG-ISS, Roma 2010. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1436_allegato.pdf. (ultimo accesso: aprile 2020)
5. Lapolla A, Mosca A. Screening e diagnosi del diabete gestazionale: definite le raccomandazioni. *Biochim Clin* 2012;36:12-4.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano, E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 14.05.2020

Revisionato: 14.05.2020

Accettato: 14.05.2020

Pubblicato on-line: 25.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.055



POSITION STATEMENT AMD SID

Raccomandazioni per la diagnosi del diabete gestazionale durante la pandemia COVID-19 (Versione 08-05-2020)

A cura di:

Elisabetta Torlone Annunziata Lapolla

in qualità di referenti rispettivamente per SID ed AMD, del panel delle LG per la gravidanza Fisiologica dell'ISS insediato nel gennaio 2020.

In collaborazione con il:

GRUPPO DI STUDIO INTERASSOCIATIVO AMD-SID DIABETE E GRAVIDANZA

Comitato di Coordinamento

Coordinatore *Elisabetta Torlone*

Coordinatore eletto *Laura Sciacca*

Consiglieri *Camilla Festa, Gloria Formoso, Marina Scavini, Maria Angela Sculli, Elena Succurro*

Il presente documento è stato condiviso con:

SIE (*Società Italiana di Endocrinologia*)

SIBioC (*Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica*)

SIPMEL (*Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio*)

SIGO (*Società Italiana di Ostetricia e Ginecologia*)

AOGOI (*Associazione degli Ostetrici e Ginecologi Ospedalieri Italiani*)

AGUI (*Associazione Ginecologi Universitari Italiani*)

AGEO (*Associazione Ginecologi Extraospedalieri*)

SIMP (*Società Italiana di Medicina Perinatale*)

Questo Documento è pubblicato congiuntamente da Biochimica Clinica e dalle Società Scientifiche che hanno partecipato alla sua stesura

Ricevuto: 14.05.2020

Revisionato: 14.05.2020

Accettato: 14.05.2020

Pubblicato on-line: 25.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.055



Introduzione

La pandemia COVID-19 ha richiesto una sostanziale modifica nelle procedure di accesso ai servizi sanitari.

La condizione di gravidanza richiede comunque una serie di controlli e di valutazioni cliniche che devono permettere un regolare sviluppo del nascituro e, condizione fondamentale perché questo avvenga, una buona salute della madre.

Il DPCM del 11/03/2020, in cui sono state varate misure per il contenimento del contagio da Coronavirus, concernenti limitazioni alla possibilità di spostamento delle persone fisiche all'interno di tutto il territorio nazionale, ha mantenuto tra le prestazioni da erogare le "visite in gravidanza". **E' stata confermata, infatti, l'organizzazione della rete materno- neonatale ed i percorsi raccomandati prevedono l'assistenza nel servizio consultoriale /territoriale e nel contesto ospedaliero; sono inoltre garantite le prestazioni diagnostiche e strumentali non procrastinabili in quanto correlate ad età gestazionale specifica, purchè siano adottate tutte le disposizioni di sicurezza.**

Il Diabete Gestazionale (GDM) è una condizione temporanea ma, se non **adeguatamente riconosciuto e trattato** si traduce in un maggior rischio di complicanze materne e fetali sia nel breve che nel lungo termine. Non ci sono ad oggi evidenze su COVID-19 e GDM, ma è noto che l'effetto dell'iperglicemia, di qualsiasi natura, peggiora le condizioni di risposta immunitaria alle infezioni e che lo stato infiammatorio a sua volta peggiora il quadro di insulino-resistenza.

Pertanto anche in questa situazione di pandemia è necessario non ridurre l'attenzione nei confronti della diagnosi e trattamento del GDM.

Nel nostro Paese la diagnosi viene effettuata secondo le Linee Guida pubblicate nel 2011 dall'ISS che prevedono uno screening per fattori di rischio e la possibilità di effettuare l'OGTT fra 16 e 18 settimane nei casi ad alto rischio, da ripetere nel caso di negatività fra 24-28 settimane, così come viene effettuato nei casi di medio rischio.

Lo scopo di questo documento è quello di:

-stilare una guida **TEMPORANEA per lo screening**, da limitare a tutte quelle situazioni in cui la procedura classica non possa essere attuata a causa di un rapporto rischio/beneficio sfavorevole per la salute della gestante o in quelle condizioni in cui i servizi ambulatoriali si trovano nella impossibilità di erogare la prestazione.

Tutto ciò premesso:

1. Le raccomandazioni concernenti le modifiche alla procedura di screening del diabete gestazionale (GDM) di seguito riportate sono state prodotte **specificamente** in relazione all'emergenza sanitaria dovuta alla pandemia COVID-19.
2. Tali raccomandazioni dovranno essere sostituite dalle precedenti (LG Gravidanza Fisiologica ISS e Standard di Cura SID/AMD 2018 (1, 2) o eventuali successivi aggiornamenti nel momento in cui si dichiara cessata l'emergenza nazionale.
3. Fermo restando che:
 - a. le evidenze scientifiche al momento disponibili non forniscono alcuna alternativa di pari valore diagnostico alla curva con carico orale effettuata con 75 grammi di glucosio e con prelievi per glicemia ai tempi 0', 60', 120' e che tale metodica resta il gold-standard per la diagnosi di GDM;



- b. viene considerata l'eccezionale emergenza sanitaria in cui versa il nostro Paese e le peculiarità del COVID-19;
- c. viene considerato il rapporto rischio/beneficio contingente a tale situazione;

si suggerisce di attuare le seguenti deviazioni dall'algoritmo di screening per il GDM e dalla consueta modalità di svolgimento delle visite nel caso in cui il team decisionale della struttura/Ente di afferenza ravveda un rapporto rischio/beneficio sfavorevole relativamente all'esposizione della donna gravida al pericolo di contagio e/o qualora il Sistema Sanitario debba erogare prestazioni in modo limitato.

1. Al primo riscontro di gravidanza in tutte le donne va esclusa la presenza di un "Diabete preesistente alla gravidanza". Si pone diagnosi di diabete manifesto in presenza di una glicemia plasmatica a digiuno ≥ 126 mg/dL, di una glicemia plasmatica random ≥ 200 mg/dL, o di una emoglobina glicata ≥ 48 mmol/mol (6.5%)(Fig. 1).

Razionale: una serie di studi ha evidenziato che il diabete preesistente alla gravidanza se non riconosciuto e trattato tempestivamente determina outcomes materni e fetali avversi. In particolare, un recente studio Canadese (3) ha analizzato gli outcomes materni e fetali di 995,990 donne in gravidanza ed evidenziato che il 2.6% delle stesse presentava un diabete preesistente alla gravidanza, in esse il parto pretermine, la mortalità perinatale, le malformazioni congenite e l'ipoglicemia neonatale erano significativamente più elevate rispetto alle donne con Diabete gestazionale.

2. a. Si ritiene accettabile la diagnosi di GDM, quando la procedura di screening non può essere eseguita in sicurezza, quando il valore della glicemia plasmatica a digiuno è ≥ 92 mg/dL. Perché il dato sia accettabile come diagnosi, la valutazione deve essere eseguita esclusivamente nelle finestre temporali raccomandate in relazione ai fattori di rischio definiti dalle predette LG. (Fig. 1).

b. Nel caso in cui sia possibile effettuare lo screening per GDM tale procedura dovrà essere effettuata nel rispetto delle disposizioni di distanziamento sociale in atto in tutti i servizi. Sia la gestante che il personale sanitario dovranno utilizzare i dispositivi di protezione individuale (mascherina chirurgica e guanti).

Razionale: per fare diagnosi di GDM è sufficiente un solo punto alterato dell'OGTT. Dati in letteratura suggeriscono che è possibile utilizzare la sola glicemia plasmatica a digiuno per far diagnosi di Diabete gestazionale poiché la sensibilità e la specificità della glicemia plasmatica a digiuno in un campione di 500 donne in gravidanza sono risultate del 88,8% e del 95,2% (4). **Tuttavia, è importante sottolineare che questa procedura, limitata alla glicemia basale, sottostima la diagnosi di GDM;** infatti una certa percentuale di pazienti ha glicemia basale < 92 mg/dl, mentre i valori post-carico risultano patologici. Inoltre dobbiamo sottolineare che l'esecuzione dell'intero test, anche quando si rilevi un valore diagnostico a digiuno, permette di identificare disturbi metabolici che hanno un diverso impatto clinico e, conseguentemente, di definire la strategia terapeutica più appropriata stratificando le pazienti in base al rischio metabolico e cardiovascolare a breve e a lungo termine.



Tale modalità di screening determina quindi un beneficio sensibile per la donna e per il feto. Durante la pandemia da COVID-19 è possibile che il rischio connesso all'esecuzione dell'intera curva glicemica superi il beneficio che potremmo apportare alla mamma ed al feto nei casi in cui si documenti già un valore di glicemia a digiuno che raggiunge o supera la soglia di 92 mg/dL. Si ribadisce che tale valore può essere considerato diagnostico **esclusivamente nei casi in cui sia ottenuto nell'epoca gestazionale in cui si sarebbe dovuto effettuare l'OGTT ovvero fra 16-18 settimane nelle gestanti ad alto rischio o fra 24 e 28 settimane nel medio rischio.**

Screening del GDM modificato per l'emergenza COVID-19

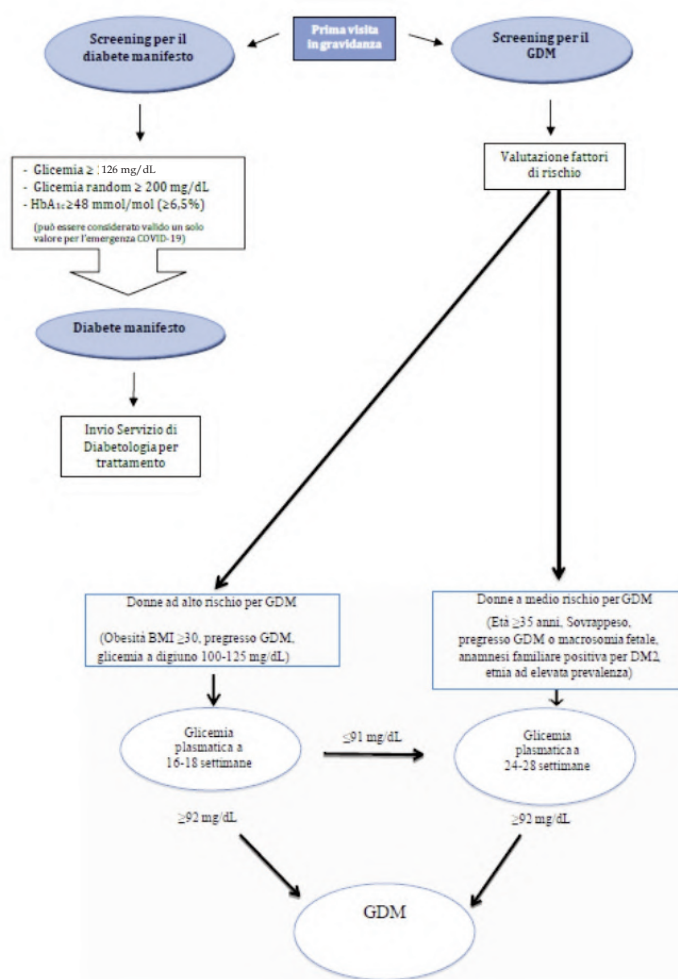


FIG.1



3. Successivamente alla diagnosi di GDM dopo la prima visita presso il centro di diabetologia, verrà mantenuto un contatto periodico attivando un percorso di controlli da remoto (telemedicina) con modalità che verranno indicate con PDTA specifici.

Razionale: nell'ottica di ridurre gli accessi ai presidi sanitari è opportuno che vengano definiti e standardizzati alcuni processi di gestione condivisa mediante strumenti di comunicazione registrazione e monitoraggio; le strutture diabetologiche del nostro Paese condividono per lo più la stessa cartella informatizzata e si stanno attivando dei processi di registrazione da remoto nella stessa cartella dei dati dell'automonitoraggio glicemico attraverso APP MySugr o altri strumenti di condivisione. La stesura di PDTA fornisce un supporto gestionale ed è volto ad armonizzare i comportamenti clinici con strumenti innovativi quali la telemedicina.

4. Ottimizzare la prescrizione e l'esecuzione di esami di laboratorio e strumentali cercando di far convergere le prescrizioni dei vari specialisti coinvolti nella gestione della gravidanza, limitando le uscite della paziente e i suoi contatti con presidi sanitari.

Razionale: la gravidanza complicata da GDM comporta un aumento del rischio di complicanze a medio e lungo termine per la madre e per il feto. In tal senso, la gestione di tale condizione è particolarmente rigorosa e si può avvalere di un maggiore frequenza di controlli di laboratorio e di diagnostica strumentale come adiuvanti del percorso terapeutico (es. monitoraggio dei parametri di crescita fetale) e/o come strumenti diagnostici precoci di eventuali complicanze. Ponendo al numeratore il fatto che generalmente questi esami richiedono accessi a presidi sanitari e dunque determinano un maggior rischio di esposizione al contagio, e al denominatore il vantaggio in termini di riduzione del rischio di complicanze materno fetali grazie all'esecuzione dei suddetti esami, è compito di ciascun clinico quantificare il rapporto rischio/beneficio per ciascuna paziente e agire condividendo il percorso anche con gli altri specialisti coinvolti.

5. Differire l'OGTT postpartum alla fine dell'emergenza sanitaria nel Paese, fatti salvi i casi in cui si ravvedano situazioni di rischio per la donna (es. persistenza di valori di glicemia capillare elevati nell'immediato post-partum o elevato fabbisogno insulinico durante la gravidanza). In tutti i casi la donna dovrà essere informata sull'importanza dello screening post-partum e della partecipazione alle visite di follow up, che nel frattempo potranno essere effettuate in telemedicina soprattutto nell'ottica di monitorare la gestione nutrizionale durante l'allattamento per ridurre le complicanze anche a lungo termine.



Razionale: una gravidanza complicata da GDM espone la donna ad un aumento del rischio di patologie metaboliche e cardiovascolari a breve e a lungo termine. Le società scientifiche SID/AMD raccomandano l'esecuzione di un OGTT dopo almeno 6 settimane dal parto ed entro 6 mesi al fine di identificare precocemente eventuali alterazioni glicemiche e viene suggerito di rivalutare anche gli altri parametri metabolici ove necessario in relazione ai dati anamnestici. **L'attuale pandemia impone in primis di limitare tutte le condizioni non strettamente necessarie che possono esporre la popolazione a rischio infettivo.** Pertanto, sebbene sia necessario e fondamentale eseguire il follow up del GDM, tale valutazione può essere procrastinata alla fine dell'attuale condizione di emergenza, fatta eccezione per i casi in cui si sospetti un persistere della condizione di diabete per cui anche attraverso il percorso in telemedicina potrà essere definita dallo specialista l'opportunità di ulteriori valutazioni.

6. In caso di positività al COVID-19 intensificare il controllo glicemico.

Razionale: Attualmente non sono descritti in letteratura casi di gravidanze complicate da GDM e COVID-19. In generale, sembra che il diabete, pur non aumentando il rischio di contrarre l'infezione da SARS-COV-2 possa peggiorarne la prognosi (5). Si conferma che l'unica terapia suggerita in caso di iperglicemia non-responder alla terapia medica-nutrizionale è l'insulina.

7. **Considerata l'importanza che nella presente raccomandazione riveste la misura della glicemia a digiuno, si raccomanda che siano rispettate le condizioni di standardizzazione della fase pre-analitica, soprattutto per quanto riguarda la scelta dell'anticoagulante adeguato, al fine di evitare l'occorrenza di falsi negativi dovuti ad un abbassamento della glicemia in vitro, tra il momento in cui il campione di sangue viene prelevato ed il momento nel quale esso viene analizzato in laboratorio.** Per maggiore approfondimento si fa esplicito riferimento alle raccomandazioni inter-societarie recentemente definite (6).



Bibliografia

- 1: Linee Guida Gravidanza Fisiologica ISS- CEVEAS - http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=1436
- 2: Standard di cura AMD-SID 2018 - <https://aemmedi.it/standard-di-cura/>
- 3: Lee D, Booth GL, Ray JG, Ling V, Feig DS. Undiagnosed type 2 diabetes during pregnancy is associated with increased perinatal mortality: a large population-based cohort study in Ontario, Canada. *Diabet Med*. 2020 Jan 28. doi: 10.1111/dme.14250. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31994233.
- 4: Poomalar GK, Rangaswamy V. A comparison of fasting plasma glucose and glucose challenge test for screening of gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol*. 2013 Jul;33(5):447-50. doi: 0.3109/01443615.2013.771156. PubMed PMID: 23815193.
- 5: Fadini GP, Morieri ML, Longato E, Avogaro A. Prevalence and impact of diabetes among people infected with SARS-CoV-2. *J Endocrinol Invest*. 2020 Mar 28. doi: 10.1007/s40618-020-01236-2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32222956.
- 6: Bonetti G, Carta M, Lapolla A, Miccoli R, Testa R, Mosca A in qualità di delegati SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Diabetologia (SID) e per il Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete Mellito. Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico. *Biochimica clinica* 2018;42:263-5.

Importanza dello screening per il deficit di G6PD durante l'emergenza COVID-19

Andrea Mosca¹, Ettore Capoluongo²

¹Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - DAI - Medicina di Laboratorio e Trasfusionale - AOU Federico II - CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

ABSTRACT

Screening for G6PD deficit during COVID-19 emergency.

Hydroxychloroquine, a well known anti-malaria drug, is now widely used in the early treatment of patients infected with SARS-CoV-2. Since chloroquine and its derivatives may cause an acute hemolytic crisis in subjects with glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, with different penetrance in men and in women, we recommend that: a) before using these drugs, especially in elderly subjects, the G6PD catalytic activity should be quantitatively estimated; b) all the G6PD deficient subjects treated with chloroquine and its derivatives have to be characterized at molecular level, in order to identify G6PD deficient subjects in their families; c) to be on the safe side, the use of hydroxychloroquine or chloroquine in carriers of severe G6PD deficiency, and infected by SARS-CoV-2, should be avoided; if treated, the patients should be alerted on the possible hemolytic risks, and care should be paid to the best laboratory indicators of such episodes (whole blood cell count, serum bilirubin, serum LDH, and hemoglobinuria).

E' in corso di pubblicazione su *Biochimica Clinica* una rassegna sul difetto di glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD) che ha cercato di coprire i molteplici aspetti di eterogeneità che caratterizzano questa condizione su base genetica (1). Proprio mentre preparavamo questa rassegna è esplosa la pandemia di COVID-19 (infezione da SARS-CoV-2) che ha imposto (ed è possibile che possa imporre nel prossimo futuro) le restrizioni che tutti abbiamo sperimentato.

Come noto, uno dei primi presidi curativi consiste nella somministrazione di idrossiclorochina (nome commerciale: Plaquenil), un farmaco anti-malarico già utilizzato anche per l'artrite reumatoide per i suoi noti effetti antiinfiammatori. Dal momento che è noto che la cloroquina ed i suoi derivati possono scatenare crisi emolitiche nei soggetti con deficit di G6PD, occorre porre attenzione al fatto che tali soggetti, se non preventivamente individuati, possono subire importanti crisi emolitiche dopo l'assunzione del farmaco. In considerazione poi del fatto che il gene della G6PD è localizzato sul cromosoma X, e che, per effetto della

lyonizzazione, anche alcune donne portatrici del deficit in eterozigosi possono manifestare le crisi emolitiche come i soggetti maschi emizigoti, l'occorrenza degli episodi emolitici potrebbe colpire anche le donne, oltre che gli uomini.

Pertanto vale la pena prestare attenzione ai seguenti punti:

- La somministrazione di idrossiclorochina o di altri sali della cloroquina a pazienti anziani dovrebbe essere preceduta almeno dalla valutazione biochimica dell'attività enzimatica, in quanto, nei portatori di difetti di G6PD, si potrebbero verificare eventi avversi dovuti a questi medicinali.
- Le crisi emolitiche, che tipicamente si manifestano dopo 2-7 giorni dall'assunzione del farmaco, potrebbero essere gravi, con abbassamenti dell'emoglobina totale fino a 20 g/L, rispetto ai valori precedenti il trattamento, e comparsa di emoglobinuria.
- E' difficile predire il numero di soggetti portatori di deficit di G6PD all'interno di una popolazione affetta da COVID-19, ma i dati epidemiologici italiani indica-

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano, E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 19.05.2020

Revisionato: 20.05.2020

Accettato: 20.05.2020

Pubblicato on-line: 29.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.059

no una prevalenza media per questo deficit attorno al 2,2%, con punte significativamente più alte nell'Italia insulare (in Sardegna la prevalenza media è attorno al 7,5%).

- Tutti i soggetti ospedalizzati che vengono trattati con idrossiclorochina, preventivamente testati e risultati portatori di deficit di G6PD, dovrebbero essere poi caratterizzati dal punto di vista molecolare, anche per l'identificazione dei familiari portatori.
- Per sicurezza, nei soggetti portatori di deficit grave di G6PD e con infezione da SARS-CoV-2 i trattamenti farmacologici con idrossiclorochina o cloroquina dovrebbero essere evitati; quando invece trattati, i pazienti andrebbero monitorati dal punto di vista laboratoristico per gli aspetti relativi agli indicatori di emolisi (emocromo, bilirubina, lattato deidrogenasi, in particolare).

Tali raccomandazioni sono state esplicitate in un lavoro pubblicato durante l'insorgenza della pandemia (2) e successivamente ribadite anche da una raccomandazione dell'Istituto Superiore di Sanità (3).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Mosca A, Paleari R, Capoluongo E. Il deficit di G6PD in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2020;44:in corso di stampa.
2. Capoluongo E, Amato F, Castaldo G. The friendly use of Chloroquine in the COvid19 disease: a warning for the G6PD-deficientmales and for unaware carriers of pathogenic alterations of G6PD-gene. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi.org/10.1515/cclm-2020-0442.
3. Gruppo di lavoro ISS Malattie Rare COVID-19. Indicazioni ad interim per un appropriato sostegno delle persone con enzimopenia G6PD (favismo) nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2. Rapporto ISS COVID-19, n. 14/2020. https://www.iss.it/rapporti-covid-19/-/asset_publisher/btw1J82wtYzH/content/id/5334891 (ultimo accesso: maggio 2020).

COVID-19 e coagulazione: un legame indissolubile

Massimo Franchini

Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova

Un nuovo coronavirus simil-influenzale chiamato SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), responsabile del COVID-19 (Coronavirus Disease 2019, una grave malattia coinvolgente prevalentemente il tratto respiratorio), è apparso per la prima volta a fine 2019 nella città di Wuhan in Cina (1). Successivamente il virus si è rapidamente diffuso in tutto il mondo globalizzato, infettando più di 7 500 000 persone e causando più di 420 000 morti (2). L'Italia è stato uno dei paesi maggiormente colpiti dalla pandemia COVID-19 con più di 240 000 casi e 34 000 decessi (dati aggiornati al 13 giugno 2020). Subito dopo la segnalazione dei primi casi di COVID-19 è apparso evidente che questa grave malattia virale non è confinata esclusivamente ai polmoni, ma che il SARS-CoV-2 innesca una serie di molteplici risposte infiammatorie sistemiche ed attivazione della coagulazione (3,4). Lo studio delle alterazioni dell'emostasi in corso di infezione da nuovo coronavirus 2019 si è rilevato pertanto fondamentale per capire la patogenesi di questa malattia e pianificare cure efficaci (5). A questo riguardo, vengono pubblicati in questo Supplemento di *Biochimica Clinica* due articoli estremamente interessanti del Gruppo di Studio SIBioC Emostasi (6,7). Il primo articolo (6) analizza in dettaglio i meccanismi fisiopatologici alla base della coagulopatia associata a COVID-19, passando in rassegna le alterazioni dei vari fattori che svolgono un ruolo fondamentale nell'emostasi, e cioè l'endotelio, le piastrine, la coagulazione e la fibrinolisi. Gli autori, inoltre, cercano di individuare, in base alle attuali conoscenze, quei parametri di laboratorio (ad esempio il conteggio delle piastrine, il tempo di protrombina ed il D-dimero) in grado di indicare la possibile evoluzione negativa (cioè verso la temuta coagulazione intravascolare disseminata o DIC) delle alterazioni coagulative durante l'infezione da SARS-CoV-2 (6). Il secondo articolo (7) parte dalla patogenesi della trombosi nella malattia da COVID-19 per analizzare le varie terapie anticoagulanti disponibili. Infine, si sofferma sul trattamento con l'eparina a basso peso molecolare, la più promettente tra le terapie antitrombotiche durante COVID-19, analizzando in maniera dettagliata il ruolo del Laboratorio di coagulazione nel suo monitoraggio.

Si tratta di due articoli complementari che forniscono allo specialista in Medicina di Laboratorio una panoramica chiara, completa ed attuale delle alterazioni coagulative in corso di COVID-19. Essi, inoltre, documentano come la Medicina di Laboratorio rappresenti un ausilio fondamentale per i clinici, sempre più spesso chiamati a prendere decisioni difficili e complesse nella gestione dei pazienti con malattia grave da SARS-CoV-2. Non mi resta che augurarvi buona lettura!

BIBLIOGRAFIA

1. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-62.
2. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (ultimo accesso giugno 2020).
3. Giannis D, Ziogas IA, Gianni P. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J Clin Virol*. 2020 doi: 10.1016/j.jcv.2020.104362.
4. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 2020 doi: 10.1182/blood.2020060000.
5. Tang N, Bai H, Chen X, Gong J, Li D, Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020;18:1094-9.
6. Morelli B, Montaruli B, Bazzan M, et al; per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020; SS2:S50-S60
7. Montaruli B, Morelli B, Marchetti M, et al; per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi. Il ruolo del Laboratorio di Coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19. *Biochim Clin* 2020;SS2:S61-S72

Corrispondenza a: Massimo Franchini, Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia, ASST Mantova, E-mail massimo.franchini@asst-mantova.it

Ricevuto: 15.06.2020

Accettato: 16.06.2020

Publicato on-line: 07.08.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.071

Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19)

Benedetto Morelli¹, Barbara Montaruli², Mario Bazzan³, Paola Calzoni⁴, Paolo Fassina⁵, Paola Pradella⁶, per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

¹Synlab Castenedolo, Castenedolo (BS)

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

³CMID, Centro Malattie Rare, San Giovanni Bosco, Torino

⁴Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, ULSS7 Pedemontana, Santorso, Vicenza

⁶Servizio di Medicina Trasfusionale, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste

ABSTRACT

Alterations of hemostasis during SARS-CoV-2 infection (COVID-19).

The corona virus infection (named COVID-19), first identified in December 2019 in Wuhan, China, has contributed to significant mortality in several countries with the number of infected cases increasing exponentially worldwide, in particular in Italy and in the USA. The majority of the most severely ill patients initially presents with single organ failure (i.e. severe respiratory syndrome), but some of them progress to more systemic disease and multiple organ failure (MOF). One of the most significant poor prognostic features in these patients is the development of coagulopathy, similarly to patients who develop sepsis from various infectious agents. Coagulopathy in patients with COVID-19 may be asymptomatic but, in some cases, the septic state may evolve into Sepsis-Induced Coagulopathy (SIC) and overt Disseminated Intravascular Coagulopathy (DIC). In patients with severe clinical manifestations, a cytokine storm occurs that contributes to triggering a greater imbalance of the hemostatic mechanisms by promoting the development of microthrombosis at the level of the pulmonary endothelium. The effectiveness of anticoagulant therapies, performed primarily with low-molecular weight heparin, is greater the earlier the diagnosis is made. This is possible through the adoption of diagnostic protocols that include laboratory tests and clinical scores. The laboratory tests suggested for this purpose by the available Guidelines are prothrombin time, platelet count, D-dimer and fibrinogen. D-dimer appears to be the parameter with the greatest prognostic significance since it also allows a stratification of the thrombotic risk.

INTRODUZIONE

Dai primi mesi del 2020 il Servizio Sanitario Nazionale italiano è stato messo a dura prova dall'arrivo di COVID-19, una malattia infettiva virale proveniente dalla Cina che sta mietendo numerose vittime a causa della sua elevata contagiosità e mortalità [10 volte più letale della influenza, secondo i dati recenti comunicati dalla organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)]. La malattia si è diffusa con grande velocità anche negli altri paesi europei e nel resto del mondo (negli Stati Uniti in particolare), ed ha costretto l'OMS a dichiarare lo stato di

pandemia l'11 marzo 2020. Dal sito dell'OMS risultano al 13 maggio 2020 oltre 4 milioni di persone contagiate ed oltre 280 000 decessi (1). La malattia prende il nome di COVID-19 dall'acronimo inglese COroNaVIrus Disease 19 ed è anche definita malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). L'intero spettro della malattia comprende quattro fasi a seconda della gravità clinica: lieve, moderata, grave e critica. Il più grande studio epidemiologico condotto in Cina ha mostrato che tra 44 672 casi confermati, l'80,9% presentava polmonite lieve o moderata, il 13,8% grave, il 4,7% critica. Il tasso

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Synlab Castenedolo, via Beato L. Pavoni 18 – 25014 – Castenedolo (BS) Tel 3407912302, E-mail benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 16.04.2020

Revisionato: 17.04.2020

Accettato: 15.05.2020

Publicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.056

di letalità per i pazienti critici è stato del 49%, con pazienti con comorbidità (malattie cardiovascolari, diabete, malattie respiratorie croniche, ipertensione, neoplasie) con tassi più elevati (10,5%, 7,3%, 6,5%, 6,0%, 5,6% rispettivamente) rispetto a quelli senza comorbidità (0,9%) (2). Il tempo mediano dal primo sintomo alla dispnea è stato di 5,0 giorni, al ricovero in ospedale di 7,0 giorni e all' Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) di 8,0 giorni: questo significa che purtroppo la malattia può progredire rapidamente da moderata a grave o critica e quindi devono essere rapidamente prescritti gli esami diagnostici e le terapie conseguenti.

Il COVID-19, analogamente ad altri agenti infettivi, è in grado di indurre nell'organismo contagiato uno stato di sepsi che determina l'insorgenza della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS) come risposta all'invasione di tessuti, fluidi o cavità corporee normalmente sterili. Le complesse interazioni tra il microrganismo infettante, il sistema immunitario dell'ospite, le risposte infiammatorie e la coagulazione influenzano l'esito nella sepsi (3). La sepsi, malgrado sia meno nota, ha un tasso di mortalità cinque volte superiore all'ictus e dieci volte superiore all'infarto (4). La diagnosi tempestiva è fondamentale per la gestione della sepsi, come l'inizio di una corretta terapia precoce è fondamentale per ridurre la mortalità da sepsi grave (5).

Molti organi vengono interessati dalle complicanze della malattia, in particolare i pazienti con COVID-19 grave e critica possono presentare grave compromissione polmonare con ARDS, (67%), insufficienza renale acuta (29%), insufficienza cardiaca (23%) e disfunzione epatica (29%) (6). Non esiste a tutt'oggi un unico protocollo terapeutico per i pazienti affetti da COVID-19, ma si fa sempre più spesso ricorso alla combinazione di diverse terapie indirizzate al contenimento dell'infezione e dei suoi effetti. In particolare, nei pazienti con COVID-19 vengono utilizzati farmaci antivirali come lopinavir e ritonavir (già in uso contro l'HIV), darunavir e remdesivir (già in uso per altri coronavirus) (7), farmaci antimalarici come cloroquina e idrossicloroquina (8), antibiotici (azitromicina) (9), anticorpi monoclonali anti-IL-6 come tolicilizumab, sarilumab e siltixumab (10), anticorpi monoclonali anti-C5-convertasi (eculizumab) (11), anticoagulanti come l'eparina a basso molecolare o l'eparina standard (12). È inoltre da poco stata sperimentata con successo la terapia che utilizza il plasma iperimmune di soggetti guariti dal COVID-19 che hanno sviluppato anticorpi contro il SARS-CoV-2 (13).

Dalla compromissione degli organi coinvolti derivano alterazioni di grado diverso di molti esami di laboratorio (14). In una recente metanalisi Lippi et al. (15) hanno analizzato i dati di 8 studi cinesi riscontrando che i parametri maggiormente alterati nei pazienti con prognosi sfavorevole sono: il conteggio dei leucociti, dei granulociti neutrofilici e dei linfociti, l'albumina sierica, la lattato deidrogenasi, le transaminasi (sia alanina che

aspartato amino transferasi), la bilirubina, la creatinina, la troponina cardiaca, il D-dimero, il tempo di protrombina (PT), la procalcitonina (PCT) e la proteina C reattiva (PCR). Ancora più recentemente Favalaro et al. (16) raccomandano dei profili minimi di esami di tipo ematologico e biochimico da eseguire nei pazienti con COVID-19 per il monitoraggio prognostico della malattia.

ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI IN CORSO DI COVID-19

Molti pazienti affetti da COVID-19, soprattutto quelli con manifestazioni più gravi, presentano alterazioni a carico di tutte le componenti del sistema emostatico (endotelio, piastrine, coagulazione plasmatica e fibrinolisi); ne deriva una coagulopatia che, come in altri stati settici, può progredire da semplice alterazione asintomatica dei parametri della coagulazione ad uno stato di Sepsis Induced Coagulopathy (SIC) (17) sino ad arrivare alla coagulazione intravascolare disseminata (DIC) con un significativo aumento della mortalità (Figura 1).

Endotelio

L'endotelio, insieme alle componenti corpuscolate del sangue (leucociti, eritrociti e piastrine), svolge un ruolo fondamentale nella formazione di trombi in combinazione con l'attivazione del sistema della coagulazione e una delle caratteristiche tipiche della DIC associata alla sepsi è la lesione endoteliale (18); il danno endoteliale causato dal virus provoca un rilascio transitorio dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), seguito da una sovraregolazione immediata della produzione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), che contribuisce alla massiccia deposizione di fibrina nel microcircolo (19,20). Oltre ai cambiamenti nella funzione fibrinolitica, si verificano effetti protrombotici dovuti a disfunzione endoteliale causata dalla riduzione del rilascio di ossido nitrico e prostaciclina, e incrementata espressione del fattore tissutale (TF) e del fattore di von Willebrand (VWF) e perdita del glicocalice (19). Il glicocalice è lo strato sottile gelatinoso che copre l'endotelio vascolare ed è un importante bersaglio di infezione e infiammazione (21). Il glicocalice è composto da proteoglicani, glicosaminoglicani e proteine plasmatiche come albumina e antitrombina. L'attività antitrombotica dell'antitrombina è significativamente aumentata per effetto del legame alle catene laterali di eparansolfato del glicocalice e la stabilità del glicocalice è aumentata dal legame dell'antitrombina per mantenere l'omeostasi vascolare (22,23). Durante la sepsi, i componenti del glicocalice vengono eliminati nel sangue e rappresentano biomarcatori clinicamente rilevanti: si ritiene quindi che la perdita del glicocalice contribuisca alla disfunzione del microcircolo (24).

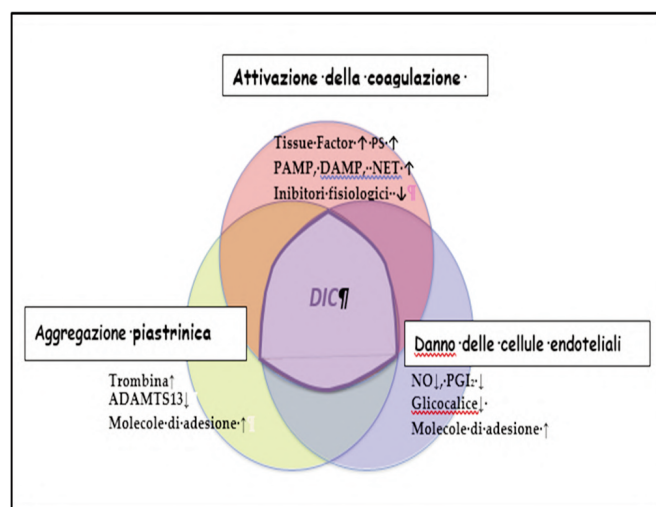


Figura 1

Meccanismi patogenetici della Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC)

ADAMTS-13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns; NET, Neutrophil Extracellular Traps; NO, Ossido Nitrico; PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns; PGI₂, Prostaglandina I₂; PS, Fosfatidilserina.

Modificato da Iba T et al. *Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation J Clin Med* 2019; 8: 728.

Piastrine

Anche il conteggio delle piastrine rappresenta un parametro fondamentale nello studio della evoluzione della coagulopatia nel paziente con COVID-19; la trombocitopenia è uno dei parametri di laboratorio più importanti nella diagnostica delle complicanze emostatiche perché la diminuzione delle piastrine si verifica virtualmente in tutti i pazienti con DIC. Il numero delle piastrine nella sepsi è influenzata da molteplici fattori. Nonostante l'aumento dei livelli di trombopoietina, la produzione di piastrine nel midollo osseo è spesso soppressa a causa degli effetti delle tossine patogene e dei mediatori infiammatori. Nella sepsi si verifica l'attivazione piastrinica che contribuisce alla diminuzione del loro numero, alla generazione di trombina, all'infiammazione e alla secrezione del fattore di von Willebrandt (VWF) (25). Le piastrine sono anche attivate da trombina e da mediatori dell'infiammazione incluso il complemento e partecipano attivamente alla patogenesi della DIC associata alla sepsi. La trombina induce attivazione piastrinica mediante scissione dei Protease-Activated Receptors (PAR) espressi sulle piastrine rilasciando il contenuto dei granuli piastrinici (in particolare ADP e serotonina) (26). L'attivazione piastrinica attraverso l'attivazione del recettore PAR è anche associata alla generazione di trombocitopenia A2 e al rilascio di una vasta gamma di citochine proinfiammatorie. Le piastrine rilasciano anche High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), uno dei principali Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP) della sepsi, il quale nella forma attivata svolge un ruolo critico nella trombosi, nel reclutamento dei monociti e nella produzione di Neutrophil Extracellular Traps (NET) (27).

Coagulazione plasmatica

Numerosi fattori sono in grado di attivare la coagulazione durante la sepsi; i Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) attivano le risposte infiammatorie attivando molteplici vie e i recettori che includono i Pattern-Recognizing Receptors (PRR), i DAMP, l'HMGB1, il DNA e gli istoni (28). Quando questi mediatori vengono rilasciati dai tessuti e dalle cellule danneggiate, possono iniziare l'infiammazione e la coagulopatia. Ulteriori mediatori umorali responsabili della coagulopatia includono citochine proinfiammatorie come interleuchina (IL) -1, IL-6, il Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), l'elastasi, la catepsina G e le proteine del sistema del complemento, come risposta sistemica nella sepsi (29). Inoltre anche i NET, costituiti da DNA, istoni e proteine granulari rilasciate da neutrofilii attivati e da altri granulociti, sono implicati nella formazione di trombi (30,31). Ricerche recenti hanno anche dimostrato interazioni tra NET e vescicole extracellulari e vescicole extracellulari recanti NET che aumentano la generazione di trombina (32). Il fattore tissutale, l'iniziatore della via estrinseca della coagulazione, è espresso su macrofagi, monociti e cellule endoteliali e svolge un ruolo centrale nello sviluppo della coagulopatia e della DIC nella sepsi (33). A seguito di una lesione cellulare, il fattore tissutale espresso sulle vescicole extracellulari promuove ulteriormente le risposte procoagulanti (34). In sintesi, tutti questi mediatori infiammatori attivano la trombina come parte delle risposte di difesa dell'ospite che conduce alla Multi-Organ Failure (MOF) associata alla sepsi.

Anche gli inibitori fisiologici sono coinvolti nello sbilanciamento del sistema emostatico in senso

protrombotico. Tutti gli inibitori della coagulazione plasmatica (antitrombina, proteina C e proteina S) risultano ridotti in corso di coagulopatia correlata a Sepsis Induced Coagulopathy (SIC) o a DIC.

La trombina è un mediatore chiave della patogenesi della DIC associata alla sepsi e l'antitrombina è il più importante inibitore fisiologico della trombina (35,36). Si stima che l'antitrombina fornisca l'80% dell'attività inibitoria contro la trombina e altri fattori di coagulazione. L'antitrombina inibisce molteplici fattori della coagulazione, inclusi i fattori X, IX, VII, XI e XII (37). Tuttavia, i livelli di antitrombina sono noti per essere ridotti nella sepsi a causa del consumo, della sintesi alterata (specialmente nel sottogruppo di pazienti con epatite acuta ischemica associata a shock settico), stravasamento e degradazione da parte di elastasi rilasciata da neutrofili attivati. L'antitrombina esercita effetti antinfiammatori locali sulla superficie delle cellule endoteliali legandosi ai glicosaminoglicani. Come detto, l'endotelio vascolare sano è ricoperto da un glicocalice; se questo viene alterato a causa dei meccanismi instaurati dalla sepsi aumenta la trombogenicità dell'endotelio, aumenta la permeabilità capillare e l'adesione cellulare all'endotelio danneggiato (38).

L'antitrombina è parte integrante del glicocalice dove si lega ai glicosaminoglicani costituendo insieme ad essi una barriera fisiologica a difesa dell'endotelio stesso durante la sepsi (39); pertanto, il ruolo dell'antitrombina non è solo quello di inattivare la trombina, ma anche quello di mantenere una normale funzione endoteliale mediante il legame col glicocalice.

Un altro importante sistema anticoagulante è il sistema trombomodulina/proteina C/proteina S. In situazioni fisiologiche la proteina C viene attivata dalla trombomodulina sulla superficie endoteliale e la proteina C attivata esercita molteplici attività biologiche, tra cui effetti antitrombotici, citoprotettivi e antinfiammatori, per mantenere l'integrità vascolare (40). La proteina C attivata esercita attività antitrombotica attraverso l'inattivazione proteolitica dei fattori Va e VIIIa, e attività citoprotettiva sulle cellule endoteliali mediata da recettori come il recettore della proteina C endoteliale (EPCR) e il PAR-1. Queste molteplici attività si traducono in attività anti-apoptotica e anti-infiammatoria, regolazione dell'espressione genica e stabilizzazione della barriera endoteliale (41). La alterazione del sistema trombomodulina/proteina C nella sepsi è ben noto e il ridotto livello di proteina C è riconosciuto come un utile biomarcatore della sepsi grave. Analogamente all'antitrombina, i livelli di proteina C sono particolarmente bassi nei pazienti con epatite ischemica acuta (42) e i livelli di entrambe le proteine anticoagulanti sono stati segnalati come predittori significativi di mortalità (43). La trombomodulina è degradata proteoliticamente, viene staccata dalla superficie cellulare e circola in forma solubile. Livelli plasmatici aumentati di trombomodulina solubile sono stati riportati in pazienti con sepsi e disfunzione d'organo. Alcuni

autori ipotizzano che la trombomodulina circolante inibisca l'adesione dei leucociti all'endotelio perché il dominio della trombomodulina ricco di serina / treonina espresso sulle cellule endoteliali vascolari lega le integrine $\beta 2$ leucocitarie (LFA-1 e Mac-1) (44). Sebbene la trombomodulina solubile sia eliminata attraverso meccanismi renali, i livelli sono correlati alla gravità della disfunzione d'organo o del danno endoteliale e sono stati misurati per valutare la lesione endoteliale nella sepsi (45).

Fibrinolisi

La fibrinolisi è il componente finale del sistema emostatico ed ha il compito fondamentale di rimuovere la fibrina che si è generata attraverso l'azione combinata dell'emostasi primaria e della coagulazione plasmatica. Esistono profonde differenze nei meccanismi fibrinolitici che caratterizzano i vari tipi di DIC; oggi la classificazione della DIC anziché in compensata, scompensata o acuta viene meglio definita con una nuova terminologia in base alla minore o maggiore attivazione della fibrinolisi.

In base alla classificazione proposta da Asakura et al. (46) le DIC possono essere distinte in tre tipi:

- DIC con fibrinolisi ridotta
- DIC con fibrinolisi aumentata
- DIC con fibrinolisi bilanciata

Al primo tipo appartiene la DIC presente nel paziente con sepsi; la DIC con fibrinolisi aumentata si riscontra ad esempio nei pazienti con leucemia promielocitica acuta, nell'aneurisma dell'aorta, nel cancro della prostata; mentre la fibrinolisi bilanciata è presente nei pazienti con tumori solidi. Per comprendere i meccanismi che portano alla soppressione della fibrinolisi nella sepsi è opportuno ricordare il comportamento della fibrinolisi nel soggetto sano. L'enzima chiave della fibrinolisi è la plasmina la cui attività è regolata principalmente dall'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e dal suo inibitore, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1). Gli attivatori del plasminogeno convertono il plasminogeno in plasmina. Le cellule endoteliali vascolari partecipano alla modulazione della fibrinolisi discernendo sia il t-PA che il PAI-1. La disfunzione delle cellule endoteliali è una caratteristica essenziale nella patogenesi della DIC associata alla sepsi (47). Il marcato aumento del livello di PAI-1 porta al blocco della fibrinolisi e questo evento chiave rappresenta la caratteristica tipica della DIC di tipo trombotico che si presenta nel paziente con sepsi. Oltre alla massiccia formazione di coaguli, la fibrinolisi compromessa impedisce la rimozione della fibrina e porta a trombosi microvascolare sistemica (48). Ciò si verifica con l'arresto fibrinolitico indotto principalmente dalla sovrapproduzione di PAI-1. I livelli plasmatici di PAI-1 sono stati segnalati come predittivi della elevata gravità e della mortalità nei pazienti settici (49).

Un ulteriore importante meccanismo che determina un blocco della fibrinolisi nella DIC associata a sepsi è

rappresentato dalla diminuzione dell'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAFI). Il TAFI riduce la generazione di plasmina e la degradazione della fibrina rimuovendo il sito di legame al plasminogeno della fibrina degradata dopo l'attivazione da parte di trombina o plasmina. Contrariamente al PAI-1, i livelli di TAFI diminuiscono a causa dell'attivazione e del consumo estesi nella sepsi e, pertanto, possono avere un impatto minore rispetto al PAI-1 nella soppressione della fibrinolisi (50). Infine anche la riduzione dei livelli di plasminogeno può contribuire alla riduzione dell'attività fibrinolitica (51).

Evoluzione da coagulopatia a DIC

Tutti i meccanismi sopra descritti a carico delle componenti del sistema emostatico possono condurre il paziente con COVID-19 ad un netto peggioramento della prognosi; in questo caso gli interventi terapeutici mirati alla correzione della coagulopatia non sono nella maggior parte dei casi efficaci, sottolineando la necessità di intervenire in fasi precoci della DIC. A questo scopo il sottocomitato della International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) per la DIC ha proposto una nuova categoria di DIC definita SIC (17,52) con lo scopo di facilitare la diagnosi precoce di DIC e interventi potenzialmente più rapidi in questi pazienti critici.

Lo score ISTH per la DIC acuta prevede unicamente l'utilizzo di parametri di laboratorio facilmente disponibili (il conteggio piastrinico, PT, fibrinogeno, marcatori

specifici della degradazione plasminica della fibrina come FDP o D-dimero); ad ognuno di questi 4 parametri viene attribuito un punteggio, se la somma di questi punteggi è ≥ 5 il paziente ha una DIC acuta e questi stessi parametri dovranno poi essere ripetuti nel tempo per seguire il decorso della malattia e l'efficacia delle terapie instaurate (Tabella 1) (53-59).

Lo score SIC comprende solo 3 parametri di laboratorio (viene escluso il fibrinogeno) ma include il Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (60) che è un punteggio per la valutazione della disfunzione d'organo nei pazienti affetti da sepsi, e considera parametri inerenti i seguenti apparati/sistemi: respiratorio, emostasi, epatico, cardiovascolare, sistema nervoso centrale (SNC), renale (Tabella 1).

Per ogni parametro viene assegnato un punteggio variabile tra 0 e 4, la cui somma costituisce il SOFA score; questo valore è strettamente correlato alla mortalità:

- Per il sistema respiratorio il parametro considerato è il rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (dove PaO_2 è la tensione arteriosa dell'ossigeno misurata in mmHg e FiO_2 è la frazione di ossigeno nell'aria inspirata): questo rapporto si riduce quando il parenchima polmonare è danneggiato.
- Per l'emostasi si utilizza il conteggio delle piastrine con diversi punteggi, da 0 a 4 (la scala va da <20 a $\geq 150 \cdot 10^9/\text{L}$)
- Per il fegato si utilizza la bilirubina con diversi punteggi, da 0 a 4 a seconda del valore (la scala va da

Tabella 1

Criteri di punteggio per la diagnosi di Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC) e la Coagulopatia indotta dalla Sepsis (SIC)

Parametro	Punteggio	DIC acuta (criteri ISTH)	SIC
		Valore	Valore
Piastrine ($10^9/\text{L}$)	2	<50	<100
	1	$\geq 50; <100$	$\geq 100; <150$
D-dimero (FDP)	3	Forte incremento	-
	2	Moderato incremento	-
Tempo di protrombina (ratio)	2	$>1,4$	$>1,4$
	1	$>1,2; \leq 1,4$	$>1,2; \leq 1,4$
Fibrinogeno (g/L)	1,00	<100	-
SOFA score	2	-	≥ 2
	1	-	1
Score totale per DIC o SIC		≥ 5	≥ 4

Legenda: SOFA = Sequential Organ Failure Assessment

Modificata da "Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation", Iba T, et al. J Clin Med, 2019 (rif 17).

- <1,2 a >12,0 mg/dL)
- Per il sistema cardiovascolare si utilizza la pressione media arteriosa o la necessità di somministrare vasopressori.
 - Per il SNC viene utilizzato il "Glasgow Coma Scale" (61) che è una scala di valutazione neurologica utilizzata per seguire l'evoluzione clinica dello stato del paziente in coma; essa si basa su tre tipi di risposta agli stimoli (oculare, verbale e motoria) e si esprime sinteticamente con un numero che è la somma delle valutazioni delle tre funzioni.
 - Per la funzionalità renale si utilizza la creatinina con diversi punteggi, da 0 a 4 (la scala va da <1,2 a ≥5,0 mg/dL)

Nel SOFA score utilizzato per la SIC vengono utilizzati solo 4 sistemi: respiratorio, cardiovascolare, epatico e renale (risultano quindi esclusi il SOFA per l'SNC e per l'emostasi) (vedi Tabella 1).

Particolare attenzione deve essere rivolta al conteggio delle piastrine in quanto, oltre che nella SIC e nella DIC, una piastrinopenia può essere riscontrata in pazienti critici con microangiopatie trombotiche (MAT) e con Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT) di tipo 2, malattie gravi caratterizzate da manifestazioni trombotiche importanti.

RUOLO DEL LABORATORIO DI COAGULAZIONE NELLA GESTIONE DELLA COVID-19

Il decorso clinico della COVID-19 comprende 3 distinte fasi cliniche della malattia (62) (Figura 2).

Una fase iniziale durante la quale il virus si replica all'interno delle cellule dell'ospite (Infezione allo stadio iniziale - Stadio I).

La malattia può poi evolvere verso una seconda fase caratterizzata da alterazioni morfo-funzionali a livello polmonare causate sia dagli effetti diretti del virus sia dalla risposta immunitaria dell'ospite (Fase Polmonare - Stadio II). Questa fase è caratterizzata da un quadro di polmonite interstiziale molto spesso bilaterale associata ad una sintomatologia respiratoria che nella fase precoce è stabile e senza ipossiemia (IIA) ma può successivamente sfociare verso una progressiva instabilità clinica (IIB). I pazienti in questa fase hanno ipomobilità per l'allettamento e in questa fase l'eparina a basso peso molecolare (EBPM) dovrà essere utilizzata a dose profilattica allo scopo di prevenire il tromboembolismo venoso.

- La terza fase (Fase Iperinfiammatoria - Stadio III), fortunatamente limitata ad un numero molto più esiguo di pazienti, è caratterizzata da una tempesta citochinica e dal conseguente stato iperinfiammatorio che determina conseguenze locali e sistemiche e rappresenta un fattore prognostico negativo producendo, a livello polmonare, quadri di vasculopatia arteriosa e venosa con trombizzazione dei piccoli vasi ed evoluzione verso lesioni polmonari gravi. Le fasi finali di questo gravissimo quadro clinico portano ad una ARDS grave e in alcuni casi alla DIC. In tale fase si è osservata un'alterazione progressiva di alcuni parametri infiammatori quali PCR, ferritina, e citochine pro-infiammatorie (IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, TNF α ed altre) (63,64) e coagulativi, quali aumentati livelli dei frammenti di degradazione della fibrina come il D-dimero, consumo di fattori della coagulazione, trombocitopenia, allungamento del PT (65-68).

Mentre le scelte terapeutiche della prima fase e della seconda fase iniziale (IIA) devono mirare al contenimento della crescita virale, nella seconda fase

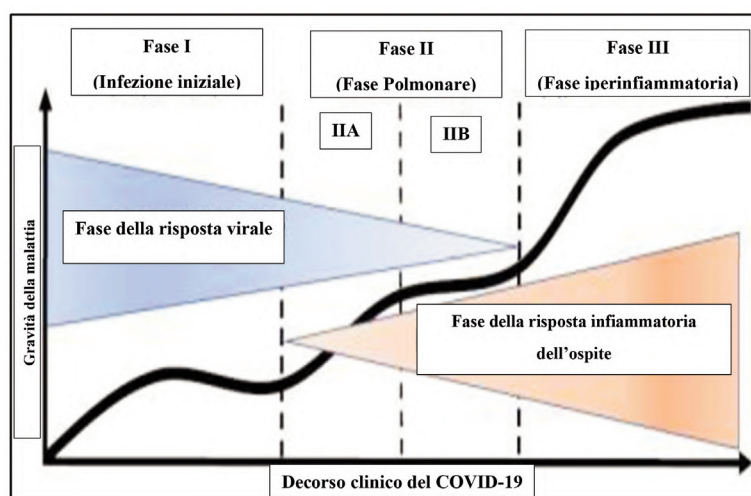


Figura 2

Decorso clinico del COVID-19

Modificato da Hasan K et Al. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant* 2020 (rif 62).

avanzata (IIB) e nella terza fase della malattia l'obiettivo è il contenimento dell'iperinfiammazione e delle sue conseguenze utilizzando farmaci che bloccano la cascata citochimica e la attivazione della coagulazione ricorrendo alle EBPM o all'eparina non frazionata a dosi terapeutiche, come da raccomandazioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) dell'11 aprile 2020 (69), della Federazione dei Centri per la diagnosi della trombosi e la Sorveglianza delle Terapie Antitrombotiche (FCSA) (70) e della Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi (SISSET) (71).

Le EBPM hanno dimostrato di possedere anche proprietà antinfiammatorie: infatti la frazione non anticoagulante della enoxaparina ha mostrato soppressione in vitro del rilascio di IL-6 e IL-8 da parte di cellule epiteliali polmonari umane (72). L'eparina possiede infatti, oltre all'azione anticoagulante, numerose funzioni immunomodulanti: inibizione dell'infiammazione, inibizione del reclutamento dei granulociti neutrofili, inibizione dei mediatori infiammatori indotti dai lipopolisaccaridi (LPS), inibizione della migrazione dei granulociti eosinofili. Inoltre, studi sperimentali in vitro ed in vivo hanno dimostrato che i coronavirus umani utilizzano proteoglicani con eparansolfato per legarsi alle cellule bersaglio (73). In effetti, è stata recentemente dimostrata l'interazione tra il dominio di legame del recettore della proteina Spike S1 SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 S1 RBD) e l'eparina suggerendo un ruolo per l'eparina nell'armamentario terapeutico contro il COVID-19 (74).

Va qui ricordato che particolare attenzione va posta nei confronti dei pazienti con COVID-19 che al momento dell'infezione erano già in terapia anticoagulante per varie indicazioni con anti-Vitamina K (AVK), coumadin e sintrom o con i Direct Oral AntiCoagulant (DOAC). In tali casi l'uso di terapie con antibiotici o con antivirali, interferisce con l'azione anticoagulante di questi farmaci ed è stato suggerito di sospendere DOAC e AVK e di

adottare una terapia con eparina (69).

Parametri dell'emostasi ed evoluzione della coagulopatia e mortalità

Tra i parametri di laboratorio più rilevanti per seguire l'evoluzione della coagulopatia presente nei pazienti affetti da COVID-19 risultano particolarmente utili:

- il conteggio piastrinico
- il PT
- il D-dimero

Come riportato in diversi studi, il D-dimero è il parametro che correla meglio con l'evoluzione clinica del paziente. In uno studio di Tang et al. (75) sono stati indagati 449 pazienti, di cui 99 (22,0%) avevano ricevuto un trattamento con eparina per almeno 7 giorni, 94 con EBPM (40-60 mg di enoxaparina/giorno) e 5 con eparina non frazionata (ENF) (10 000-140 000 U/ giorno). Fra questi pazienti, 97 (21,6%) soddisfano i criteri di SIC (punteggio totale ≥ 4) e sono stati classificati come casi gravi. Alla fine dello studio [a 28 giorni di monitoraggio, 315 pazienti (70,2%) erano sopravvissuti e 134 (29,8%) pazienti erano deceduti]. Nessuna differenza sulla mortalità a 28 giorni è stata riscontrata tra utilizzatori di eparina e non utilizzatori (30,3% versus 29,7%, $p=0,910$). Sono stati confrontati i risultati degli esami dell'emostasi tra sopravvissuti e non sopravvissuti, applicando un modello di regressione logistica multivariata per identificare un fattore di correlazione indipendente della mortalità a 28 giorni della COVID-19; è stata riscontrata significatività statistica ($p<0,001$) solo per il D-dimero, il PT e la conta piastrinica. È stata valutata l'associazione tra trattamento con eparina ed esiti in pazienti stratificati in base al punteggio SIC o al risultato del D-dimero (Figura 3). Il trattamento con eparina è stato associato a una mortalità inferiore nei pazienti con punteggio SIC ≥ 4 (40,0% versus 64,2%, $p=0,029$), rispetto a quelli con punteggio SIC <4 (29,0% versus 22,6%, $p=0,419$). Poiché i pazienti sono stati stratificati in base al risultato del D-dimero, la mortalità

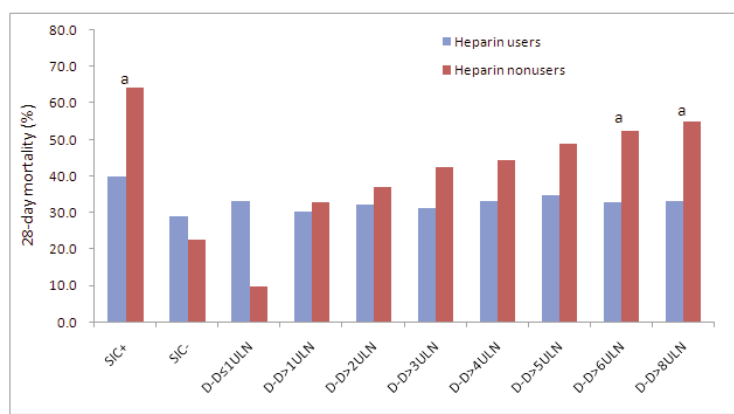


Figura 3

Relazione tra mortalità a 28 giorni, positività o negatività allo score SIC ($\geq 0 \leq 4$), e valori del D-dimero

Legenda: SIC = Sepsis-Induced Coagulopathy, ULN = Upper Limit of Normal ($<0,5$ mg/L)

Modificato da "Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy". Tang N, et al. *J Thromb Haemost* 2020 (rif 75).

nei pazienti in trattamento con eparina si è sostanzialmente mantenuta allo stesso livello, mentre nei non trattati con eparina, la mortalità è aumentata con l'aumento del D-dimero. Quando il D-dimero era superiore a 3,0 mg/L (6 volte il limite superiore del normale, 6 ULN - Upper Limit of Normal), è stata rilevata una riduzione approssimativa di circa il 20% della mortalità nei pazienti che ricevevano eparina (32,8% *versus* 52,4%, $p = 0,017$).

In uno studio di Huang et al. sono stati arruolati 41 pazienti con COVID-19, 13 ricoverati in terapia intensiva, 28 al di fuori della terapia intensiva: i livelli del D-dimero sono risultati più elevati nei pazienti in terapia intensiva con una mediana di 2,4 mg/L (intervallo 0,6-14,4) rispetto a 0,5 mg/L (intervallo 0,3-0,8, $p = 0,0042$) dei pazienti non in terapia intensiva (14).

In un altro studio di Wang et al. sono stati valutati 138 pazienti, 36 ricoverati in terapia intensiva e 102 no; i livelli del D-dimero al momento del ricovero erano più alti nei pazienti in terapia intensiva con una mediana di 0,41 mg/L (intervallo 0,19-1,32) rispetto a 0,17 mg/L (intervallo 0,10-0,28), $p < 0,001$ dei pazienti non in terapia intensiva (76). Il profilo dinamico dei risultati di laboratorio è stato monitorato in 33 pazienti (5 non sopravvissuti e 28 sopravvissuti), con un aumento delle concentrazioni del D-dimero più elevato nei non sopravvissuti rispetto ai sopravvissuti (76).

Ancora più numerosi sono stati i pazienti reclutati nello studio di Guan et al. che ha incluso 1099 pazienti; in questi pazienti è stata operata una distinzione in base al valore soglia del D-dimero ($\geq 0,5$ mg/L). Nei pazienti classificati come gravi, il D-dimero era elevato nel 59,6% dei casi (65 su 109) rispetto al 43,2% nei casi non gravi (195 su 451) (69). Nei pazienti che sono stati ricoverati nelle Unità di Terapia Intensiva per la necessità di ventilazione meccanica o che sono deceduti, i valori del D-dimero sono risultati elevati nel 69,4% dei casi (34 su 49) rispetto al 44,2% (226 su 511) degli altri pazienti (77).

Nello studio retrospettivo e multicentrico di Zhou et al. sono stati inclusi 191 pazienti: di questi, 137 sono stati dimessi e 54 sono morti in ospedale (78). I valori del D-dimero sono risultati più alti nei non sopravvissuti con una mediana di 5,2 mg/L (intervallo 1,5 -21,1) rispetto a 0,6 mg/L (intervallo 0,3-1,0), $p < 0,0001$ dei sopravvissuti (70). Inoltre, lo studio ha esaminato la percentuale di pazienti con tre diversi intervalli di concentrazioni di D-dimero ($\leq 0,5$; da $>0,5$ a ≤ 1 ; e > 1 mg/L). L'81% dei non sopravvissuti (44 su 54) aveva valori di D-dimero > 1 mg/L rispetto al solo 24% dei sopravvissuti (28 su 118) (78).

Le modifiche temporali sono state monitorate per i marcatori di laboratorio dall'insorgenza della malattia e i valori mediani del D-dimero erano statisticamente diversi tra i sopravvissuti e i non sopravvissuti per ogni misurazione dopo il 4° giorno di malattia (giorni 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22) (70). L'evoluzione dei valori mediani del D-dimero nei sopravvissuti è rimasta relativamente stabile a partire da 0,3 mg/L al giorno 4 rispetto a 0,5 mg/L al giorno 22. Ciò è sorprendentemente diverso dai valori di D-dimero nei non sopravvissuti che si è evoluto

da 1,5 mg/L al giorno 4 rispetto a 42,2 mg/L al giorno 22 (78).

Inoltre, gli autori hanno voluto esplorare i fattori di rischio associati alla morte intra-ospedaliera, quindi hanno eseguito un modello di regressione logistica univariata e multivariata. Sono state scelte 5 variabili per l'analisi multivariata sulla base dei risultati di studi clinici precedenti. L'analisi multivariata ha confermato che le probabilità crescenti [OR = 20,04 (6,52-61,56) $p < 0,0001$] di morte in ospedale erano associate a livelli di D-dimero superiori a 1,0 mg/L al momento del ricovero. Nell'analisi multivariata, lo studio ha trovato probabilità crescenti [OR = 18,42 (2,64-128,55) $p = 0,0033$] di morte in ospedale associate a livelli di D-Dimero superiori a 1,0 mg/L al momento del ricovero (78).

Infine Thachil et al. coll. nella Linea Guida "ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19" (65) sottolineano l'utilità di impiegare 4 parametri dell'emostasi facilmente disponibili in tutti i laboratori, per il riconoscimento della coagulopatia: D-Dimero, PT, conteggio delle piastrine e fibrinogeno, elencati per ordine di importanza. Per il D-dimero viene altresì suggerito che un aumento di 3-4 volte al limite superiore di normalità può essere classificato come aumento marcato. In base a questo valore viene proposto un algoritmo suddividendo i pazienti in tre gruppi:

- Pazienti ad alto rischio che si presentano al momento del ricovero con D-dimero marcatamente aumentato, PT prolungato, piastrine $< 100 \times 10^9/L$ e/o fibrinogeno $< 2,0$ g/L. Questi pazienti devono essere monitorati con lo stesso pannello di esami quotidianamente o anche due volte al giorno.
- Pazienti ricoverati con D-dimero non marcatamente aumentato, PT normale, conteggio piastrinico normale e fibrinogeno elevato a causa di altre patologie devono essere monitorati quotidianamente con lo stesso pannello di esami.
- Pazienti non ricoverati con D-dimero non marcatamente elevato, PT normale, conteggio piastrinico normale e fibrinogeno elevato: questi dati potranno essere utilizzati in seguito se i pazienti presenteranno dei sintomi.

CONCLUSIONE

Alla luce degli studi sopra condotti è importante eseguire sui pazienti con COVID-19 in fase critica una serie di esami di coagulazione semplici e alla portata di tutti i laboratori per mettere in luce in maniera precoce alterazioni importanti a carico del sistema emostatico. Questi esami sono il PT, il conteggio delle piastrine, la determinazione del fibrinogeno e del D-dimero. E' importante porre particolare attenzione alla determinazione del D-dimero che deve essere ripetuto con cadenza diversa a seconda della gravità del quadro clinico del paziente (65). E' anche opportuno ricordare che un ulteriore contributo può essere richiesto al laboratorio di coagulazione nel caso in cui il paziente sia sottoposto a trattamento anticoagulante con EBPM; in

questo caso, oltre alla determinazione della creatinina, è necessario eseguire la misura con metodo cromogenico dell'attività anti-Xa (l'intervallo deve essere compreso tra 0,2-0,5 U anti-Xa/mL) in quanto una funzionalità renale alterata può portare ad accumulo del farmaco e quindi esporre il paziente ad un rischio emorragico importante. In alternativa si può utilizzare eparina non frazionata mantenendo un livello del tempo di tromboplastina parziale attivato ratio intorno a 1,5 (cercando di mantenere i livelli al limite superiore dell'intervallo raccomandato) (70).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano sentitamente la dott.ssa Nicoletta Erba, componente del Direttivo di FCSA, per il contributo fattivo alla stesura del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

- WHO Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (ultimo accesso: maggio 2020).
- Wang Y, Wang Y, Chen Y, et al. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol* doi: 10.1002/jmv.25748.
- Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:345-52.
- Busani S, Serafini G, Mantovani E, et al. Mortality in patients with septic shock by multidrug resistant bacteria: risk factors and impact of sepsis treatments. *J Intensive Care Med* 2019;34:48-54.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41:580-637.
- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumoniae in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395:507-13.
- Youseffard M, Zali A, Mohamed Ali K, et al. Antiviral therapy in management of COVID-19: a systematic review on current evidence. *Arch Acad Emerg Med* 2020;8:e45. eCollection2020.
- Ferner RE, Aronson JK. Chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19. *BMJ*. 2020;369:m1432.
- Seftel MD. Additional safety consideration for azithromycin in the management of SARS-CoV-2 infection. *CMAJ* 2020;192:E483.
- Zhao M. Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Int J Antimicrob Agents*.2020 Apr 16:105982.
- Diurno F, Numis FG, Porta G, et al. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24:4040-7.
- Thachil J. The versatile heparin in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1020-1022.
- Chen L, Xiong J, Bao L, et al. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020;20:398-400.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506.
- Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Chim Chem Lab Med* 2020 pii: /j/ccim.ahead-of-print/ccim-2020-0198/ccim-2020-0198.xml.
- Favaloro EJ, Lippi G. Recommendations for Minimal Laboratory Testing Panel in Patients with COVID-19: Potential for Prognostic Monitoring. *Semin Thromb Hemost* 2020 doi: 10.1055/s-0040-1709498.
- Iba T, Nisio MD, Levy JH, et al. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of a nationwide survey. *BMJ Open* 2017; 7(9):e017046. doi: 10.1136/bmjopen-2017-017046.
- Iba T; Levy JH. Inflammation and thrombosis: Roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost* 2018;16,231-241.
- López-Aguirre Y, Páramo JA. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb Res* 1999;94,95-101.
- Muth H, Maus U, Wygrecka M, et al. Pro- and antifibrinolytic properties of human pulmonary microvascular versus artery endothelial cells: Impact of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* 2004;32,217-226.
- Iba T; Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *J Thromb Haemost* 2019;17,283-294.
- Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF-α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2008;104,78-89.
- Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, et al. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J Clin Med* 2018;7(11) pii: E400. doi: 10.3390/jcm7110400.
- Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, et al. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: Relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 2008;30,623-627.
- Kitchens CS. Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC). *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 2009:240-6. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.240.
- Lopez E, Bermejo N, Berna-Erro A, et al. Relationship between calcium mobilization and platelet α- and δ-granule secretion. A role for TRPC6 in thrombin-evoked δ-granule exocytosis. *Arch Biochem Biophys* 2015;585,75-81.
- Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004;103,2096-2104.
- Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care* 2014;2(1), 67.
- Lupu F, Keshari RS, Lambris JD, et al. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res* 2014;133,S28-S31.
- Iba T, Miki T, Hashiguchi N, et al. Is the neutrophil a 'prima donna' in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care* 2014;18:230.

31. Liaw PC, Ito T, Iba T, et al. The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev* 2016;30,257–261.
32. Wang Y, Luo L, Braun OÖ, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci Rep* 2018;8,4020.
33. Østerud B, Bjørklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001;27,605–617.
34. Iba T; Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care* 2018;6:68.
35. Iba T; Gando S, Thachil J. Anticoagulant therapy for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: The view from Japan. *J Thromb Haemost* 2014;12,1010–1019.
36. Levy JH, Sniecinski RM, Welsby IJ, et al. Antithrombin: Anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb Haemost* 2016;115,712–728.
37. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, et al. Antithrombin: A new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13,657–670.
38. Mehta D, Ravindran K, Kuebler WM. Novel regulators of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;307,L924–L935.
39. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009;83,388–396.
40. Griffin J.H, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: Biased for translation. *Blood* 2015;125,2898–2907.
41. Choi Q, Hong KH, Kim JE, et al. Changes in plasma levels of natural anticoagulants in disseminated intravascular coagulation: High prognostic value of antithrombin and protein C in patients with underlying sepsis or severe infection. *Ann Lab Med* 2014;34,85–91.
42. Warkentin TE. Microvascular thrombosis and ischaemic limb losses in critically ill patients. *Hamostaseologie* 2019;39,6–19.
43. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 2012;95,333–345.
44. Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, et al. Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;511,312–317.
45. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, et al. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002;30,S302–S312.
46. Asakura H, Takahashi H, Uchiyama T, et al for DIC subcommittee of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis. Proposal for new diagnostic criteria for DIC from the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis. *Thromb J* 2016;14:42.
47. Madoiwa S. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: Endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *J Intensive Care* 2015;3,8.
48. Semeraro N, Ammolto CT, Semeraro F, et al. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Re.* 2012;129,290–295.
49. Lorente L, Martín MM, Borreguero-León JM, et al. Sustained high plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Thromb Re.* 2014;134,182–186.
50. Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, et al. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res* 2006;118,205–212.
51. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Economou M, et al. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: Comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27,1853–1859.
52. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1989-94.
53. Wada H, Thachil J, Di Nisio M, et al. Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2013 Feb 4. doi: 10.1111/jth.12155.
54. Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327– 30.
55. Levi M, Toh CH, Thachil J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2009; 145:24– 33.
56. Di Nisio M, Baudo F, Cosmi B, et al, on behalf of the Italian Society for Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation: Guidelines of the Italian Society for Haemostasis and Thrombosis (SISST). *Thromb Res* 2012; 129: e177– 84.
57. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016 Feb 23;315:775-87.
58. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al for Scientific and Standardization Committee on DIC, and the Scientific and Standardization Committee on Perioperative and Critical Care of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019 ;17:1989-1994.
59. Iba T, Di Nisio M, Levy JH, et al. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of a nationwide survey. *BMJ Open* 2017;7(9):e017046.
60. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine". *Intensive Care Med* 1996; 22:707–10.
61. Teasdale G, Jennett B (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale". *The Lancet* 1974;2(7872):81-4.
62. Hasan K et al. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant.* 2020 doi:10.1016/j.healun.2020.03.012.
63. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, et al. Interleukin-6 use in COVID-19 pneumonia related macrophage activation syndrome. *Autoimmunity Reviews.* In Press, Journal Pre-proof <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>.
64. Shimabukuro-Vornhagen A, Godel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 2018;15;6:56.
65. Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 doi:10.1111/JTH.14810.
66. Lippi G, Plebani M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections:

- A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020 pii:S0009-8981(20)30124-8.
67. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumoniae. *J Thromb Haemost* 2020 doi: 10.1111/jth.14832.
 68. Lillcrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:786-787.
 69. Dal Sito AIFA: Eparine a basso peso molecolare nei pazienti adulti con COVID-19. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19_sperimentazioni_in_corso_27.03.2020.pdf/b2391bac-7920-0945-51a1-66db453053cf.
 70. Dal Sito FCSA PROFILASSI DEL TROMBOEMBOLISMO VENOSO nei pazienti con infezione COVID-19 <http://www.fcsa.it/assets/files/FCSA%20COVID19%203.pdf>.
 71. Dal Sito Siset: De Candia E. COVID-19 ed Emostasi. http://www.siset.org/images/sisetonline/Siset_online_03-2020.pdf
 72. Shastri MD, Stewart N, Horne J, et al. In-vitro suppression of IL-6 and IL-8 release from human pulmonary epithelial cells by non-anticoagulant fraction of enoxaparin. *PLoS One* 2015;11;10(5): e01267638).
 73. Milewska A, Zarebski M, Nowak P, et al. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *J Virol* 2014;88:13221-30.
 74. Mycroft-West C, Su D, Elli S, et al. The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding *bioRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971093>.
 75. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020;27. doi: 10.1111/jth.14817.
 76. 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;323:1061-1069.
 77. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020:1-13. doi:10.1056/nejmoa2002032
 78. 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;6736(20):1-9.

Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19

Barbara Montaruli¹, Benedetto Morelli², Marina Marchetti³, Mario Bazzan⁴ *per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.O. Ordine Mauriziano, Torino

²Synlab Castenedolo, Castenedolo (BS)

³Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

⁴CMID, Centro Malattie Rare, San Giovanni Bosco, Torino

ABSTRACT

The role of laboratory monitoring in heparin treatment of COVID-19 patients.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) can be associated with serious clinical complications such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis and multiple organ failure (MOF). A key event in the pathophysiology of ARDS is immunothrombosis, a process initiated by the innate immune system that provides a first line of defense for local control of infection. In its physiological form, immunothrombosis is intended to facilitate the recognition, containment and destruction of pathogens, thus protecting the integrity of the host without inducing significant collateral damage. The cytokine storm that occurs during COVID-19 induces often venous and arterial thrombotic events affecting different organs, not limited to the respiratory system. It is therefore necessary to introduce an anticoagulant treatment in patients with COVID-19 to prevent the onset and the extension of thrombotic events. The low molecular weight heparin (LMWH) is the first-choice drug recommended by the main international scientific societies; alternatively, unfractionated heparin (UFH) or fondaparinux can be used. The dosage of these drugs in patients with COVID-19 is still under discussion. The coagulation testing plays an important role in monitoring the efficacy and safety of UFH treatment; in the case of LMWHs, these usually do not require monitoring but, if alterations of renal function occur, it is important to perform the chromogenic determinations of the anti-Xa activity, paying a particular attention to the timing of sampling, the pre-analytical variables, calibration of the test and reference ranges.

INTRODUZIONE

La malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) è causata dal virus SARS-CoV2, un patogeno appartenente alla famiglia dei coronavirus (CoV), virus respiratori responsabili di malattie con forme sintomatiche che possono variare da lievi (come il comune raffreddore) a moderate, fino a sindromi respiratorie gravi come la sindrome respiratoria mediorientale (MERS) e la sindrome respiratoria acuta grave (SARS) (1-3).

La maggior parte dei pazienti affetti da COVID-19 presenta sintomi da lievi a moderati come febbre, tosse secca, affaticamento, mal di testa e dolore muscolare; meno frequentemente presenta mal di gola, naso che

cola, diarrea, emottisi e brividi. Tuttavia, il 15% di essi progredisce verso una forma grave di polmonite interstiziale, che richiede ospedalizzazione e supporto d'ossigeno, e circa il 5% alla fine sviluppa una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), sepsi e shock settico e/o insufficienza multipla d'organo (MOF), a tal punto da richiedere cure intensive. L'acidosi metabolica e la presenza di coagulopatia, inclusa la coagulazione disseminata intravascolare (CID), si associano a queste forme gravi di infezione (1). Gli adulti più anziani, quelli con disturbi immunitari e comorbidità, rappresentano i soggetti più a rischio di sviluppare ARDS, così come le altre complicanze potenzialmente fatali; tuttavia anche i pazienti giovani e altrimenti sani non ne sono completamente esenti.

Corrispondenza a: Barbara Montaruli, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.O. Ordine Mauriziano, Largo Turati 62, 10124 Torino, Tel 3409877153, E-mail bmontaruli@mauriziano.it

Ricevuto: 08.06.2020

Revisionato: 08.06.2020

Accettato: 18.06.2020

Publicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.072

Anche il sistema cardiovascolare viene interessato dall'infezione virale, con complicanze quali miocardite, infarto acuto del miocardio, insufficienza cardiaca, disritmia ed eventi tromboembolici venosi (2,3). Il rischio di eventi trombotici è particolarmente elevato nei pazienti COVID-19 ricoverati in terapia intensiva, con stime che vanno dal 25% delle casistiche cinesi, al 31% di un recente studio olandese, in pazienti già in profilassi eparinica (4). L'attivazione della coagulazione e/o della fibrinolisi si verificano come parte della risposta infiammatoria acuta ad una infezione, e la forma grave di COVID-19 è comunemente complicata da una grave coagulopatia, nella quale livelli di D-dimero marcatamente elevati si associano ad una prognosi infausta (5).

L'ARDS è caratterizzata da una interruzione dell'integrità della barriera endoteliale e da danno polmonare diffuso. Lo squilibrio tra coagulazione e infiammazione è una caratteristica predominante dell'ARDS, che porta ad un'estrema risposta infiammatoria e alla deposizione diffusa di fibrina nel letto capillare vascolare e negli alveoli. È stato osservato che la maggior parte dei pazienti affetti da una forma grave di COVID-19 presentano livelli sierici particolarmente elevati di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-6 e IL-1 β , nonché di IL-2, IL-8, IL-17, Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) ed altre (6,7).

Questa è una fase molto critica della malattia, caratterizzata da una "tempesta citochinica", ovvero da una infiammazione fuori controllo indotta dal sistema immunitario disregolato (7-9). Alti livelli di citochine pro-infiammatorie possono causare shock e danni ai tessuti nel cuore, nel fegato e nei reni, nonché insufficienza respiratoria e MOF; inoltre, stimolano una massiccia infiltrazione di neutrofilii e macrofagi nei polmoni, causando danno alveolare e formazione di membrane ialine ed ispessimento della parete alveolare.

PATOGENESI DELLA IMMUNOTROMBOSI NEL PAZIENTE COVID-19

Un evento chiave nella fisiopatologia dell'ARDS è l'immunotrombosi, un processo avviato dal sistema immunitario innato che fornisce una prima linea di difesa per il controllo localizzato dell'infezione (10). La fibrina costituisce la base strutturale, l'impalcatura (scaffold) dei coaguli immunotrombotici e il suo assemblaggio prevede l'azione concertata di fattori della coagulazione, piastrine e leucociti, all'interno dei vasi sanguigni e in particolare nei microvasi.

L'immunotrombosi nella sua forma fisiologica è deputata a facilitare il riconoscimento, il contenimento e la distruzione dei patogeni, proteggendo così l'integrità dell'ospite senza indurre danni collaterali importanti all'ospite. Tuttavia, se non controllata, l'immunotrombosi è un processo biologico che favorisce le patologie associate alla trombosi.

Sebbene la capacità di formare trombi di fronte a una lesione dei vasi sia nota da tempo come essenziale per il mantenimento dell'emostasi, fino a poco tempo fa non era stata riconosciuta come un meccanismo intravascolare di difesa immunitaria. Il termine immunotrombosi è stato coniato da Engelmann e Massberg, che lo hanno descritto come un potenziale ausilio biologico per contenere la diffusione dell'infezione (11).

Le tappe fondamentali attraverso le quali l'immunotrombosi previene la diffusione dell'infezione sono quattro ed includono:

- la cattura dei patogeni nel microcircolo e il blocco della loro diffusione
- il blocco dell'invasione dei tessuti anche lontani attraverso la formazione di microtrombi
- la concentrazione di battericidi per l'eliminazione dei patogeni da parte delle cellule immunitarie innate
- il reclutamento di altre cellule immunitarie nel sito dell'infiammazione per eliminare i restanti patogeni.

In questo processo un ruolo fondamentale è svolto dai "Neutrophil Extracellular Traps" (NETs). I NETs sono costituiti da reti extracellulari di cromatina, proteine microbicide ed enzimi ossidanti rilasciati dai neutrofilii attivati per contenere le infezioni (12). Tuttavia, se non adeguatamente regolati, i NETs hanno il potenziale di propagare l'infiammazione e indurre trombosi microvascolare (13). È infatti stato dimostrato che i vari costituenti dei NETs sono in grado di agire sul processo coagulativo mediante attivazione della via da contatto, contribuire all'attivazione piastrinica, modulare la fibrinolisi e indurre l'espressione di Fattore Tissutale (14) (Figura 1). Il ruolo dei NETs in pazienti con COVID-19 è stato recentemente esplorato da Zuo et al. (15). In particolare, gli autori hanno osservato che i sieri di pazienti con COVID-19 (50 pazienti, 84 campioni) presentano elevati livelli di DNA libero (cell-free DNA, cfDNA), mieloperossidasi associata a DNA (MPO-DNA) e di istone citrullinato H3 (Cit-H3); gli ultimi due sono marcatori altamente specifici dei NET. I livelli di cfDNA correlavano con le molecole di fase acuta tra cui la proteina C-reattiva, il D-dimero e la lattato deidrogenasi (LDH), nonché con la conta assoluta dei neutrofilii. Gli autori hanno mostrato inoltre che sia i livelli di cfDNA che di MPO-DNA sono più elevati nei pazienti ospedalizzati che ricevevano ventilazione meccanica rispetto ai pazienti ospedalizzati che respiravano aria nella stanza.

Non solo i NETs hanno un ruolo nel processo dell'immunotrombosi. Un altro attore molto importante in questo fenomeno è l'endotelio vascolare (16). Nell'emostasi fisiologica, la coagulazione e la fibrinolisi sono strettamente regolate e mantenute in equilibrio dall'endotelio, in modo tale da consentire al sangue di fluire liberamente senza sanguinamento sistemico o coagulazione. Il TF è una glicoproteina

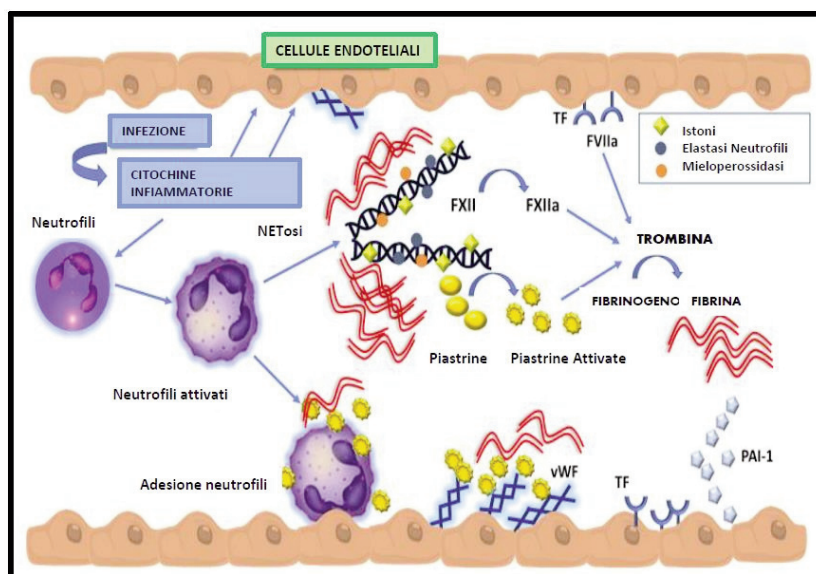


Figura 1

Meccanismi patogenetici della immunotrombosi.

vWF, von Willebrand Factor; TF, Tissue Factor; PAI-1, Inibitore 1 dell'attivatore del Plasminogeno.

transmembrana procoagulante sintetizzata dall'endotelio e dai leucociti, che, in complesso con il FVIIa, attiva i FIX e FX, porta alla fine alla formazione del coagulo. L'endotelio regola l'attività del TF producendo il suo inibitore (Tissue Factor Inhibitor o TFPI), che limita la deposizione di fibrina legandosi al FXa e inibendo il complesso FVIIa/TF. Inoltre, l'endotelio regola ulteriormente l'anticoagulazione attivando la proteina C tramite la trombomodulina e il recettore della proteina C endoteliale (EPCR), che inibisce il FV, il FVIII e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1). Il PAI-1, un'altra glicoproteina sintetizzata dall'endotelio e dal fegato, regola la fibrinolisi inibendo l'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) in condizioni fisiologiche, ma viene rilasciato progressivamente durante l'infiammazione. In condizioni di infiammazione e sepsi, le citochine e le specie reattive inducono uno stato protrombotico, antifibrinolitico. Le stesse sostanze pro-infiammatorie rendono l'endotelio proadesivo, inducendone l'esposizione di molecole di adesione [P-selettina, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)] che iniziano l'adesione dei leucociti, portando alla loro tras migrazione ai tessuti, in un processo chiamato diapedesi. Nei tessuti, i leucociti possono rilasciare mediatori infiammatori e molecole reattive per distruggere i patogeni, ma allo stesso tempo possono potenzialmente causare danni ai tessuti stessi.

Sappiamo che il SARS-Cov2, per infettare le cellule dell'ospite, utilizza il recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE2) espresso dagli

pneumociti del rivestimento alveolare epiteliale, causando così lesioni ai polmoni. Tuttavia, il recettore ACE2 è anche ampiamente espresso sulle cellule endoteliali, che sono presenti in numerosi organi (miocardio, tratto gastrointestinale, midollo osseo, reni e milza), potenziale spiegazione della lesione multiorgano osservata nei pazienti con infezione da SARS-CoV2.

Il reclutamento delle cellule immunitarie, sia da parte dell'endotelio infettato o immunomediato, può provocare una disfunzione endoteliale sistemica che può portare all'apoptosi. L'endotelio vascolare è un organo paracrino, endocrino e autocrino attivo che è indispensabile per la regolazione del tono vascolare e il mantenimento dell'omeostasi vascolare.

La disfunzione endoteliale è un determinante principale della disfunzione microvascolare spostando l'equilibrio vascolare verso una maggiore vasocostrizione con successiva ischemia d'organo, infiammazione con edema tissutale associato e stato procoagulante. Uno studio su preparati autoptici effettuato da Varga Z et al. (17) in una serie di pazienti deceduti per COVID19, ha evidenziato la presenza di elementi virali all'interno delle cellule endoteliali da distretti vascolari di vari organi, così come la presenza di una infiammazione endoteliale diffusa. Questi risultati suggeriscono che l'infezione da SARS-CoV-2 facilita l'induzione di una endotelite in diversi organi come conseguenza diretta del coinvolgimento virale (come notato dalla presenza di corpi virali) e della risposta infiammatoria dell'ospite. Inoltre, l'induzione dell'apoptosi e della piroptosi (una forma altamente infiammatoria di morte cellulare programmata che si

verifica più frequentemente in seguito a infezione da agenti patogeni) potrebbe avere un ruolo importante nella lesione delle cellule endoteliali nei pazienti con COVID-19.

Non bisogna dimenticare che all'interno delle cellule endoteliali si trovano dei granuli, i cosiddetti Weibel Palade Bodies (WPB), contenenti sostanze proinfiammatorie e procoagulanti, come il fattore di von Willebrand (vWF), la P-selettina e l'angiotensina 2, che hanno il potenziale di regolare l'immunotrombosi. È stato infatti dimostrato da vari studi *in vitro* ed *in vivo* che gli istoni associati ai NETs sono in grado di stimolare attivamente la secrezione dei WPB dalle cellule endoteliali, con liberazione dei multimeri ad altissimo peso molecolare di vWF sulla superficie endoteliale, che possono così legare le piastrine in condizioni di flusso (18).

L'endotelite COVID-19 potrebbe spiegare la funzione microcircolatoria compromessa sistemica in diversi letti vascolari nonché le sequele cliniche in questi pazienti. Questa ipotesi fornisce una logica per le terapie mirate a stabilizzare l'endotelio mentre si affronta la replicazione virale, in particolare con farmaci anti-infiammatori anti-citochine, ACE-inibitori e statine. Questa strategia potrebbe essere particolarmente rilevante per i pazienti vulnerabili con disfunzione endoteliale preesistente, che è associata a sesso maschile, abitudine al fumo, ipertensione, diabete, obesità e malattie cardiovascolari accertate, tutte associate a esiti avversi nel COVID-19.

In conclusione, l'attivazione incontrollata dell'infiammazione e la concomitante attivazione della coagulazione e dell'endotelio vascolare possono esitare nel fenomeno patologico dell'immunotrombosi anche nei pazienti con COVID-19. A causa delle chiare somiglianze tra la presentazione clinica di COVID-19 grave e le NETopatie note - ARDS e microtrombosi - è verosimile che un eccesso di NETs possa svolgere un ruolo importante nella malattia, e l'obiettivo terapeutico diretto e / o indiretto verso i NETs con i farmaci disponibili potrebbe rappresentare un presidio importante per ridurre la grave sintomatologia clinica di COVID-19 (19).

LE TERAPIE ANTICOAGULANTI NEL PAZIENTE CON COVID-19

Pur essendo disponibili studi preliminari e raccomandazioni da parte di gruppi di lavoro e Società Scientifiche, ad oggi non esistono lavori scientifici né linee guida che abbiano dimostrato efficacia nel trattamento della coagulopatia da COVID-2019 (COVID Associated Coagulopathy, CAC). Non sono ancora disponibili, in quanto ancora in corso, i risultati di studi clinici adeguati (prospettici, randomizzati) che possano definire chiare strategie terapeutiche. Sono state pubblicate serie di casi clinici o riscontri aneddotici su numeri esigui di pazienti. Ciò è dovuto al fatto che la pandemia da COVID-19 ha costituito, per la prima volta nella storia moderna, una

terribile emergenza che nei drammatici momenti iniziali ha travolto i Sistemi Sanitari Nazionali, non consentendo una immediata programmazione di studi clinici.

In questa fase iniziale della pandemia sono state segnalate ed utilizzate numerose strategie terapeutiche, basate sull' utilizzo di farmaci attivi sull'emostasi e di farmaci di altra natura, in grado di generare un miglioramento della mortalità o della sintomatologia della sindrome associata a COVID-19 ed alla CAC, complicità avanzata della sindrome stessa, descritta nelle fasi 3-4 della malattia (Figura 2).

È opportuno ricordare anche il ricorso ad alcune molecole in grado di evitare o ridurre la "tempesta citochinica", correlata all'enorme aumento dei livelli circolanti di IL-1, IL-6 ed IL-8, TNF-alfa ed altre, virus-indotte, che precedono e possono indurre la CAC.

Clorochina ed idrossiclorochina sono farmaci antimalarici ed antireumatici, che hanno dimostrato avere *in vitro* attività anti SARS-CoV2, ritardando o impedendo al virus la penetrazione attraverso la membrana cellulare; se somministrati in fase precoce, sono in grado di migliorare la prognosi e spesso di evitare la necessità del trattamento in terapia intensiva (ventilazione assistita). È stato anche riportato che alcuni antivirali (lopinavir/ritonavir, darunavir/ritonavir, darunavir/cabicitat, remdesivir) già utilizzati per il virus ebola o per altri coronavirus mostrano una scarsa attività nel frenare il COVID-19 (20). La validità dei corticosteroidi è ancora discussa in tale contesto, mentre pare favorevole l'azione di un antibiotico, l'azitromicina, in associazione con l'idrossiclorochina; tolicizumab, sarilumab e saltixumab sono anticorpi monoclonali anti-IL-6. Baricitinib, ruxolitinib ed imatinib sono molecole utilizzate nelle forme mieloproliferative croniche, ed hanno una attività anti JAK1/JAK2. Anakinra ha attività anti IL-1, mentre eculizumab agisce contro la cascata complementare, in particolare contro la C5-convertasi. Questi farmaci, da soli o in associazione, sono stati utilizzati con risultati non sempre univoci, e non sono privi di effetti collaterali. Una caratteristica comune a molte di queste molecole è comunque quella di contenere la "tempesta citochinica", di fatto riducendo la possibilità di evoluzione clinica verso una fase più grave di malattia, e verso una CAC. Bisogna ricordare che nei protocolli terapeutici e negli studi clinici queste molecole sono state utilizzate con modalità "off-label", cioè al di fuori dell'indicazione ministeriale contenuta nella scheda tecnica.

La recentissima letteratura scientifica inoltre ha cercato di definire la CAC da un punto di vista fisiopatologico e laboratoristico, differenziandola dalla CID e dalla coagulopatia indotta da sepsi (SIC) (21). Per quanto queste ultime due entità nosologiche siano note da tempo, non esiste un trattamento consolidato e sicuramente efficace se non il rimuovere la causa scatenante; la stessa definizione

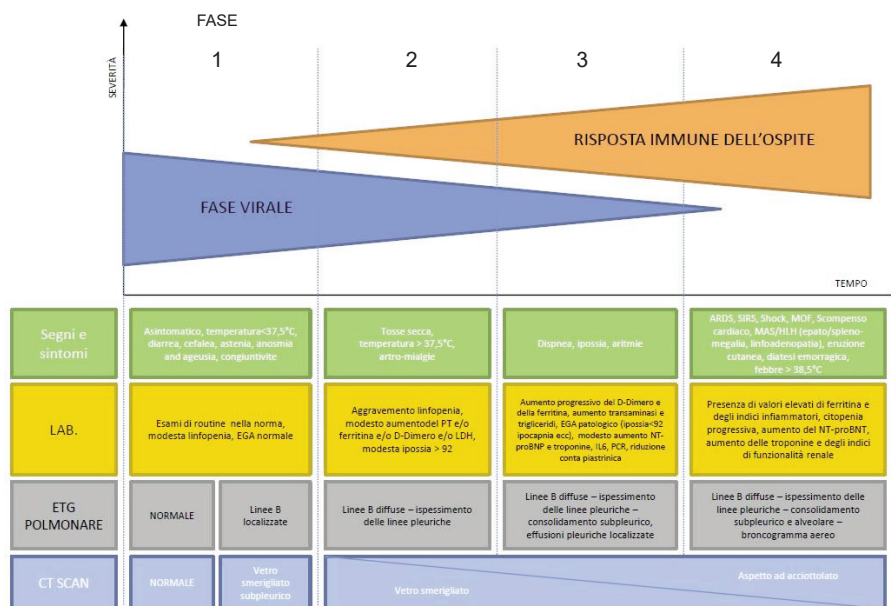


Figura 2
 Algoritmo per la diagnosi e l'evoluzione clinica della malattia da COVID-19.

Modificata dal sito: <http://www.rheumapainacademy.com/wp-content/uploads/2020/03/algoritmo-28.03.pdf>.

EGA, emogasanalisi; PT, Tempo di protrombina; LDH, Lattico Deidrogenasi; PCR, Proteina C reattiva; IL6, Intereleuchina 6; ETG, Ecografia toracica polmonare; CT-SCAN, Tomografia computerizzata.

di CID/SIC vede differenze fra diverse Società Scientifiche (22). Dal punto di vista delle analisi di laboratorio le caratteristiche differenziali sono riportate nella Tabella 1.

I parametri di laboratorio utilizzati nella diagnosi differenziale sono: conteggio piastrinico, FDP o D-dimero, fibrinogeno e tempo di protrombina. Che si tratti di CID o di SIC, le indicazioni terapeutiche e i risultati di studi clinici non sono concordanti. Mentre vi è un certo consenso nell'utilizzo di eparine a basso peso molecolare (EBPM) a dosi di profilassi (4 000 U/die), come suggerito dalle principali Società Scientifiche del settore [la International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH), la Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi (SISST), Federazione dei Centri per la Diagnosi della Trombosi e la Sorveglianza delle terapie Antitrombotiche (FCSA)], l'antitrombina (AT), la trombomodulina, e la proteina S sono state utilizzate negli studi clinici che hanno incluso un limitato numero di pazienti e non hanno fornito risultati univoci. Di fatto questi farmaci non sono ancora entrati a far parte della comune terapia in tale contesto. Vi è però un certo accordo nell'utilizzo di AT se i valori circolanti di AT sono inferiori al 70%, ed è stata proposta un trattamento con AT ad alte dosi nelle CID/SIC ad elevato rischio emorragico, nelle quali si preferisce evitare l'uso delle EBPM.

Pur non essendo facile distinguere la CID o SIC dalla CAC, alcune caratteristiche peculiari sono

emerse dai primi resoconti sulla CAC, prevalentemente dall'esperienza cinese di Wuhan. Nella CAC, il D-dimero è generalmente molto elevato, ed i suoi livelli correlano con aumentata mortalità (23). AT e piastrine sono raramente ridotte in modo significativo ed il tempo di protrombina (PT) è di poco alterato. Il fibrinogeno è normale, elevato o molto elevato, la proteina C reattiva (PCR) e l'IL-6 sono molto elevati. A fronte di una non risposta alla terapia, questi parametri possono poi peggiorare evolvendo verso una forma di CID conclamata, con allungamento di PT e tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), riduzione significativa del numero delle piastrine e del fibrinogeno (fase 4 della Tabella 1).

L'ISTH ha prodotto una "Interim Guidance" definendo alcune caratteristiche della CAC, già riscontrate nell'esperienza cinese (24). Il D-dimero elevato, il PT solo lievemente allungato e le piastrine nella norma o lievemente ridotte costituivano la caratteristica comune alla maggior parte dei pazienti con sindrome COVID-19 correlata (25). In particolare, per quanto riguarda il D-dimero, Tang et al. (26) hanno osservato che gli elevati livelli (>3,0 mg/L) correlavano direttamente con una cattiva prognosi. Questa linea guida raccomanda la terapia con EBPM in tutti i pazienti sintomatici ricoverati, a dosi profilattiche, escludendo solo i pazienti con grave piastrinopenia (<25 x 10⁹/L) o con sanguinamenti in atto.

Tabella 1

Diagnosi differenziale della Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC) e della Coagulopatia Indotta da Sepsis (SIC).

	JMHW	ISTH	ISTH modificato	JAAM	SIC
Sintomi clinici	Patologia sottostante: 1 p Sanguinamento: 1 p Insufficienza d'organo: 1 p	0 p 0 p 0 p	0 p 0 p 0 p	0 p SIRS score >3:1 p 0 p	0 p SOFA 4 elementi*: 1:1 p >2:2 p
Conta Piastrinica	80-120:1 p 50-<80: 2 p <50:3 p	50-100:1 p <50:2 p	50-100:1 p <50: 2 p	80-120 o ↓ >30% 24h: 1 p 50-<80 o ↓50% 24h :2 p	100-150: 1 p <100:2 p
Markers associati alla Fibrina	FDP 10-20:1 p 20-40:2 p >40:3 p	FDP, D-Dimero, SF Aumento moderato:2 p Aumento forte: 3 p	FDP, D-Dimero, SF Aumento moderato: 2 p Aumento forte: 3 p	FDP 10-25:1 p >25:3 p	Nessuno
Fibrinogeno (mg/dL)	100-150:1 p <100:2 p	<100:1 p	Nessuno	Nessuno	Nessuno
PT	PT ratio 1.25-1.67:1 p >1.67: 2 p	PT prolungato (s) 3-6:1 p >6:2 p	PT prolungato (s) 3-6:1 p >6:2 p	PT ratio 1.2:1 p	PT ratio 1.2-1.4:1 p >1.4: 2 p
Diagnosi di CID	≥7 p	≥5 p	≥4p	≥4 p	≥4 p (coagulopatia)

JMHW, Japanese Ministry of Health and Welfare; ISTH, International Society of Thrombosis and Haemostasis; JAAM, Japanese Association for Acute Medicine; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; FDP, Prodotti di Degradazione e della Fibrina; SF, Fibrina Solubile; PT, Tempo di Protrombina.

*SOFA 4 elementi include valutazione cardiovascolare, respiratoria, epatica e renale.

Modificata da "Haemostasis disseminated intravascular coagulation score in critically ill patients with sepsis 3.0: a retrospective study." Ding R, et al (22).

I pazienti ricoverati per polmonite COVID-19 correlata hanno generalmente una degenza di circa 4-6 settimane, in condizioni spesso febbrili, con ridotta mobilità o immobilità, che richiederebbe comunque una rigorosa prevenzione antitrombotica. Inoltre è stato dimostrato che la "tempesta citochinica" riscontrata nei pazienti più gravi induce una condizione importante di ipercoagulabilità (26). L'evidenza che elevati livelli di D-dimero in pazienti con COVID-19 correlano con la mortalità indica un ruolo preminente della trombosi nella morbilità e mortalità di tali pazienti. Gli eventi trombotici sono generalmente rappresentati da trombosi venose profonde o embolie polmonari, ma anche da eventi arteriosi come stroke o infarto miocardico acuto. Inoltre, un'analisi di sottogruppo condotta in uno studio osservazionale a Wuhan (25,26) ha dimostrato una miglior prognosi nei pazienti più gravi se trattati con una EBPM (enoxaparina). Referti autoptici hanno poi evidenziato un quadro di trombosi del microcircolo polmonare (non embolia polmonare) in numerosi pazienti studiati.

L'insieme di queste osservazioni ha indotto ad utilizzare EBPM in tutti questi pazienti. Non è ancora ben definita la dose di EBPM da utilizzare, anche se questa generalmente varia a seconda che vi sia indicazione a prevenzione (profilassi) o terapia del tromboembolismo venoso.

Il protocollo proposto dal Policlinico di Milano - Regione Lombardia (27) stratifica i pazienti COVID-19 in 3 fasce basate sulla criticità clinica. L'aumento del numero di complicanze trombotiche osservato in pazienti COVID-19 è alla base della scelta di incrementare le dosi di EBPM, rispetto a schemi precedentemente pubblicati.

- bassa intensità di cura: enoxaparina 100 U/kg/die. Se il paziente è obeso o è a rischio trombotico elevato: dosaggio sub-terapeutico di 70 U/kg x 2/die
 - intensità intermedia-alta: enoxaparina 70 U/kg x 2/die
 - terapia intensiva: enoxaparina 100 U/kg x 2/die
- Per quanto riguarda la bassa intensità di cura, la scelta fra le due opzioni può essere guidata dallo score Sequential Organ Failure Score (SOFA) (28), utilizzando la dose più elevata se lo score è >6.

La terapia con EBPM deve essere effettuata per tutto il periodo del ricovero ed essere continuata anche dopo la dimissione, per altre 2 settimane.

E' evidente che non tutti i protocolli raccomandano le stesse modalità terapeutiche con l'eparina; ad oggi non esiste una chiara evidenza di quale possa essere il miglior schema terapeutico, in termini di ridotti eventi trombotici, controllo della CAC e ridotti eventi emorragici, oltre all'outcome globale.

Il monitoraggio dell'attività anti-Xa è indicato in condizioni particolari (insufficienza renale, sovra-

sottopeso, complicanze emorragiche, etc). La terapia con EBPM è sconsigliata se l'insufficienza renale è grave (eGFR <30 mL/min/1,73m²) e nel paziente a rischio emorragico o con emorragia in atto; in tali situazioni è indicata la elastocompressione o compressione pneumatica intermittente.

Riassumendo, l'unico farmaco utilizzato, raccomandato e verosimilmente attivo, con azione diretta sull'emostasi nella sindrome COVID-19 correlata e nella CAC è risultata essere l'EBPM. In sostanza la CAC deve essere soprattutto prevenuta, quando possibile, con una terapia basata su associazione di farmaci antivirali, idrossiclorochina, anti IL-1, IL-6, anti JAK 1 ed anti JAK2 in grado di ridurre la tempesta citochinica, mentre l'EBPM deve essere somministrata a tutti i pazienti con COVID-19 ospedalizzati.

IL TRATTAMENTO EPARINICO IN CORSO DI COVID-19

Mentre le scelte terapeutiche delle prime fasi dell'infezione devono mirare al contenimento della crescita virale, nelle fasi avanzate l'obiettivo è il contenimento dell'iperinfiammazione e delle sue conseguenze, utilizzando farmaci che bloccano la cascata citochinica e l'attivazione della coagulazione ricorrendo alle EBPM o all'eparina non frazionata a dosi terapeutiche, come da raccomandazioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) dell'11 aprile 2020 (29), della FCSA (30) e della Siset (31).

Le EBPM sono glicosaminoglicani che derivano dalla eparina non frazionata (ENF) dopo trattamento con depolimerizzazione chimica o enzimatica; hanno un peso molecolare medio tra 4 000 e 5 000 daltons con un intervallo compreso tra 2 000 e 9 000 daltons. La depolimerizzazione dell'ENF produce frammenti a basso peso molecolare che presentano un legame ridotto con le proteine plasmatiche e con le cellule. La ridotta affinità per le proteine plasmatiche e le cellule spiega le differenze anticoagulanti, farmacocinetiche ed altre differenze biologiche tra ENF e EBPM. Pertanto, rispetto all'ENF, le EBPM hanno una ridotta capacità di inattivare la trombina perché i frammenti più piccoli non possono legarsi contemporaneamente all'AT e alla trombina. Il legame ridotto alle proteine plasmatiche diverse dall'AT è responsabile della relazione dose-risposta più prevedibile delle EBPM. La diminuzione del legame con i macrofagi e con le cellule endoteliali spiega la maggiore emivita plasmatica delle EBPM rispetto all'ENF, mentre il legame ridotto con le piastrine e il fattore piastrinico 4 (PF4) spiega la minore incidenza di trombocitopenia indotta da eparina (HIT).

Come l'ENF, anche le EBPM producono il loro principale effetto anticoagulante catalizzando l'inibizione dei fattori attivati della coagulazione attraverso la mediazione dell'AT. Analogamente alla ENF, anche per il legame delle EBPM all'AT è

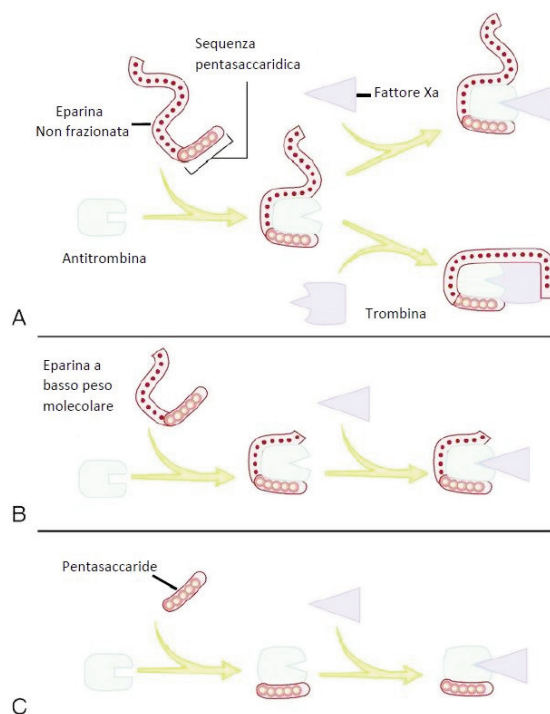
richiesta una sequenza pentasaccaridica; questa sequenza si trova su meno di un terzo delle molecole di EBPM. Poiché solo le catene di eparina contenenti pentasaccaridi, composte da almeno 18 unità saccaridiche, sono di lunghezza sufficiente per collegare l'AT alla trombina, molte molecole di EBPM (dal 50% al 75%) hanno catene troppo corte per catalizzare l'inibizione della trombina (Figura 3). Tuttavia, queste catene sono in grado di promuovere l'inattivazione del fattore Xa da parte dell'AT perché questa reazione non richiede un legame tra l'eparina e il fattore attivato. Poiché praticamente tutte le molecole di ENF contengono almeno 18 unità di saccaride, l'eparina non frazionata ha, per definizione, un rapporto anti-Xa/anti-IIa di 1:1. Al contrario, le EBPM hanno rapporti anti-Xa / anti-IIa tra 2:1 e 4:1 a seconda delle loro dimensioni molecolari (32,33).

Ad oggi sono ormai numerose le società scientifiche che hanno raccomandato la stratificazione del rischio e l'adozione della tromboprolifassi in tutti i pazienti ricoverati con COVID-19 con EBPM, ma anche con ENF o con fondaparinux (farmaco analogo sintetico della catena pentasaccaridica dell'eparina) alle dosi previste nelle rispettive schede tecniche, salvo controindicazioni, come un sanguinamento in atto, insufficienza renale, precedente storia di HIT o un conteggio piastrinico <25 x 10⁹/L (34,35). La Siset, nel raccomandare fortemente la tromboprolifassi, ha preso in considerazione anche la possibilità di una profilassi a dosi intermedie (ad esempio enoxaparina 4.000 U ogni 12 ore) in base alla valutazione individuale, nel caso di coesistenza di multipli fattori di rischio, sottolineando la mancanza di dati a supporto dell'utilizzo di anticoagulanti a dosi terapeutiche (35). In questo ambito, infatti, sono dibattuti possibili effetti benefici dell'eparina, per la sua azione antinfiammatoria (38,39) e, secondo alcuni modelli sperimentali, anche antivirali (40,41).

Le EBPM hanno dimostrato di possedere anche proprietà antinfiammatorie: infatti la frazione non anticoagulante della enoxaparina ha anche mostrato soppressione in vitro del rilascio di IL-6 e IL-8 da parte di cellule epiteliali polmonari umane (42). L'eparina possiede infatti, oltre all'azione anticoagulante, numerose funzioni immunomodulanti:

- inibizione dell'infiammazione
- inibizione del reclutamento dei granulociti neutrofili
- inibizione dei mediatori infiammatori indotti dai lipopolisaccaridi (LPS)
- inibizione della migrazione dei granulociti eosinofili.

Inoltre, studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che i coronavirus umani utilizzano proteoglicani con eparansolfato per legarsi alle cellule bersaglio (43). In effetti, è stata recentemente dimostrata l'interazione tra il dominio di legame del recettore della proteina Spike S1 SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 S1 RBD) e l'eparina suggerendo un ulteriore ruolo per l'eparina nell'armamentario terapeutico contro il COVID-19 (41).

**Figura 3**

Attività farmacologica dell'eparina non frazionata, dell'eparina a basso peso molecolare e del fondaparinux.

A: Eparina non frazionata

B: Eparina a basso peso molecolare

C: Fondaparinux.

Modificata da: Cronenwett JL, Jonsthorp KW. *Antithrombotic therapy*. In: *Rutherford's Vascular Surgery*. ed. Saunders Elsevier, 2014: capitolo 35.

Va inoltre ricordato che particolare attenzione va posta nei confronti dei pazienti con COVID-19 che al momento dell'infezione erano già in terapia anticoagulante per varie indicazioni, con farmaci anticoagulanti di tipo anti-vitamina K (AVK, coumadin o sintrom) o con i Direct Oral AntiCoagulant (DOAC). In tali casi, l'uso di terapie con antibiotici o con antivirali, interferisce con l'azione anticoagulante di questi farmaci; in questi pazienti è stato quindi suggerito di sospendere i DOAC e gli AVK e di adottare una terapia con eparina (29).

IL RUOLO DEL LABORATORIO DI COAGULAZIONE NEL MONITORAGGIO DEL TRATTAMENTO EPARINICO

Metodi Cromogenici per il dosaggio dell'attività anti X attivato

Principio del metodo

Il metodo cromogenico per la determinazione dell'attività anti-X attivato nel plasma (attività anti-Xa) introdotto alla fine degli anni 1970 è il metodo di riferimento per la determinazione dell'EBPM e del

fondaparinux e per il controllo degli anticoagulanti orali diretti contro il FXa (denominati cumulativamente xabani) (32,44). Questo metodo misura in maniera indiretta la quantità di EBPM presente nel plasma del paziente attraverso la misura dell'inibizione dell'attività del fattore X attivato della coagulazione.

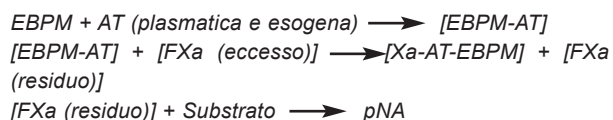
Ci sono diverse tipologie di metodi cromogenici che misurano l'attività anti-Xa: questi includono i test "one-stage", i test "two-stage" ed i test "ibridi".

I test di tipo "one-stage" e di tipo "two-stage" possono misurare sia l'EBPM che l'eparina non frazionata (ENF) attraverso l'uso di una calibrazione appropriata. Esistono inoltre, dei test definiti "ibridi" che utilizzano un'unica curva di calibrazione valida per entrambe le eparine EBPM ed ENF.

Il principio su cui si basano questi metodi è stato descritto da Teien et al. nel 1977: l'EBPM si lega all'AT formando complessi eparina-AT. Questi inibiscono il fattore Xa che viene aggiunto in eccesso. L'attività residua del fattore Xa è misurata attraverso la sua azione su un substrato altamente specifico che determina il rilascio di paranitroanilina (pNA). La pNA rilasciata viene monitorata cinematicamente a 405 nm ed è inversamente proporzionale al livello di EBPM nel

campione (Figura 4) (44-47).

In sintesi:



Le differenze fra i metodi disponibili in commercio sono riferibili ai tempi di incubazione della reazione, al tampone usato per diluire il plasma, al substrato e all'aggiunta di AT esogena. La presenza di destransolfato nel tampone riduce l'influenza degli antagonisti dell'eparina come il fattore piastrinico 4 (PF4) (44).

I metodi "one-stage" non prevedono l'aggiunta di AT esogena e sono stati sviluppati per semplificare il metodo e ridurre il tempo di risposta. Questo metodo si basa sul principio competitivo di inibizione. Il fattore Xa viene aggiunto alla miscela plasma-substrato portando a due reazioni simultanee: l'idrolisi del substrato da parte del fattore Xa e l'inibizione del fattore Xa dal complesso EBPM-AT endogena. Una volta che la reazione raggiunge l'equilibrio, la quantità di pNA rilasciata dal substrato è inversamente proporzionale alla concentrazione di EBPM nel plasma.

In sintesi:



L'aggiunta di AT esogena corregge i valori ridotti di AT presenti nei neonati, nei pazienti con carenza congenita di AT o nei pazienti cardiocirurgici. In tutti gli altri pazienti l'aggiunta di AT esogena può portare ad una sovrastima dell'attività anticoagulante *in vivo* (44).

Per la curva di calibrazione, i kit del commercio utilizzano standard secondari che si riferiscono allo standard primario internazionale WHO per l'EBPM (Second International Standard 2003, concentrazione EBPM 1097 IU/ampolla). Dati della letteratura recenti hanno dimostrato che non è necessario ottenere curve specifiche per il tipo di eparina del commercio utilizzata dal paziente. In due diverse pubblicazioni viene dimostrato che le pendenze e le intercette delle curve di calibrazione ottenute con plasma addizionato con le diverse EBPM utilizzate nei pazienti presentavano valori simili a quelli ottenuti con i calibratori del commercio e che le eventuali piccole differenze riscontrate non erano clinicamente significative (48,49).

Fase preanalitica: raccolta e processamento del campione

Per il prelievo è necessario utilizzare provette in vetro siliconato o polipropilene che contengono sodio citrato alla concentrazione 0,105 mmol/L come anticoagulante. Il prelievo deve essere effettuato mantenendo il laccio emostatico non più di un minuto in modo da evitare l'attivazione delle piastrine. L'attivazione delle piastrine, infatti, determina il rilascio di PF4 che si lega immediatamente all'eparina determinando una sottostima della concentrazione del farmaco presente nel plasma del paziente (50).

Così come per tutti gli altri esami di coagulazione sono accettabili solo i campioni contenenti almeno il 90% del volume previsto (50).

Le provette primarie devono pervenire in laboratorio ed essere processate entro 4 ore dalla raccolta (48). Devono essere trasportate senza subire traumi fisici e conservate a temperatura ambiente (15° - 25°C) fino al momento dell'esecuzione dell'esame. Il trasporto mediante posta pneumatica è consentito

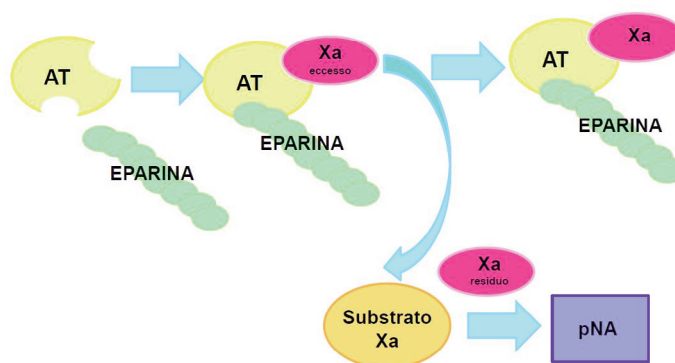


Figura 4

Principio del test cromogenico per il dosaggio dell'attività anti-Xa.

AT, antitrombina; Xa, fattore X attivato; pNA, paranitroanilina

purché non induca una eccessiva vibrazione (da verificare sperimentalmente) (50,51).

Allo scopo di assicurare l'eliminazione completa dal plasma delle piastrine e delle microparticelle (MP) è necessario operare una doppia centrifugazione a 1500 g per 15 minuti con decantazione tra una centrifugazione e l'altra (50,52).

Qualora il campione non possa essere analizzato immediatamente dopo la doppia centrifugazione, il plasma deve essere separato e frazionato in aliquote in contenitori di polipropilene e congelato il più velocemente possibile a -70°C; il congelamento e la conservazione a -20°C non sono altrettanto efficaci e si associano a stabilità significativamente inferiore (50-52).

Tempistica di monitoraggio e valori di riferimento

Grazie al suo effetto anticoagulante altamente predittivo ed alla sua efficacia e sicurezza in migliaia di pazienti trattati, l'EBPM è un farmaco che non richiede un monitoraggio routinario della sua attività. Vi sono tuttavia delle situazioni cliniche particolari in cui è necessario effettuare un controllo della sua attività mediante la valutazione dell'attività anti-Xa:

- pazienti obesi
- pazienti sottopeso
- pazienti con insufficienza renale
- donne nel terzo trimestre di gravidanza
- pazienti pediatrici.

La frequenza e la tempistica dei controlli sono suggerite dalle condizioni cliniche di questi pazienti. Nel monitoraggio dell'attività anti-Xa dell'EBPM si è osservato che le misurazioni e gli aggiustamenti effettuati al picco correlano meglio del nadir con l'efficacia e la sicurezza del farmaco (55).

Per ottenere la misurazione al picco dell'attività anti-Xa dell'EBPM, il prelievo deve essere effettuato 4 ore dopo la somministrazione dell'eparina.

I valori attesi dell'attività anti-Xa devono essere compresi tra 0,2 e 0,4 unità/mL in caso di dose profilattica, e tra 0,6 e 1,0 unità/mL in caso di dose terapeutica (56).

CONCLUSIONI

L'altissima incidenza cumulativa di complicanze trombotiche nei pazienti COVID-19 positivi con sintomatologia grave suggerisce l'applicazione rigorosa di un trattamento anticoagulante con EBPM per le numerose proprietà non solo anticoagulanti ma anche anti-infiammatorie utili a contrastare la "tempesta citochinica" che si verifica nel corso dell'infezione nei pazienti con sintomatologia grave. La terapia con EBPM viene suggerita dalle principali Società Scientifiche nazionali ed internazionali. Il farmaco non richiede usualmente un monitoraggio di laboratorio ma, in alcune occasioni (alterazione della funzionalità renale, pazienti con estremi di peso) e in

alcuni protocolli è prevista la sua determinazione ad intervalli regolari. E' quindi importante che il Laboratorio di Coagulazione implementi il metodo cromogenico per la determinazione dell'attività anti-Xa, seguendo scrupolosamente tutti i suggerimenti inerenti alla tempistica del prelievo, al rispetto delle condizioni preanalitiche e alla corretta esecuzione dell'esame.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 2020;135:2033-40.
2. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implication for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2950-73.
3. Zanolla M, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico del COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi 10.19186/BC_2020.063
4. Klok FA, Kruip Klok MJHA, van der Meer NJM. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020;191:145-7.
5. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844-7.
6. Mc Gonagle D, Sharif K, O'Regan A, et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev* 2020 doi:10.1016/j.autrev.2020.102537.
7. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* 2020;80:607-13.
8. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020;507:67-73.
9. Henry BM, Vikse J, Benoit S et al. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. *Biochim Clin* 2020 doi 10.19186/BC_2020.067 (traduzione italiana da Clin Chim Acta 2020;507:67-73).
10. Frantzeskaki F, Armaganidis A, Orfanos SE. Immunothrombosis in acute respiratory distress syndrome: cross talks between inflammation and coagulation. *Respiration* 2017;93:212-25.
11. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:34-45.
12. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-35.
13. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in arterial and venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2019;45:86-93.
14. Moschonas IC, Tselepis AD. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis. *Atherosclerosis* 2019;288:9-16.

15. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 2020 doi:10.1172/jci.insight.138999.
16. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Intern J Biol Sci* 2013;9:1057-69.
17. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020;395(10234):1417-8.
18. Michels A, Albáñez S, Mewburn J, et al. Histones link inflammation and thrombosis through the induction of Weibel-Palade body exocytosis. *J Thromb Haemost* 2016;14:2274-86.
19. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps. *J Exp Med* 2020 doi:10.1084/jem.20200652.
20. Cao S, Wang Y, Wen D, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020;382:1787-99.
21. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1989-94.
22. Ding R, Whang Z, Lin Y, et al. Comparison of a new criteria for sepsis-induced coagulopathy and International Society on Thrombosis and Haemostasis Disseminated Intravascular Coagulation Score in Critically Ill Patients with Sepsis 3.0: a retrospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018;29:551-8.
23. Lippi G, Favaloro E. D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis. *Thromb Haemost* 2020;120:876-8.
24. Tachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy of Covid 19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1023-6.
25. Guan W, Ni ZH, Hu T, et al. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020;382:1708-20.
26. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844-7.
27. Ciavarella A, Peyvandi F, Martinelli I. Where do we stand with antithrombotic prophylaxis in patients with COVID-19? *Thromb Res* 2020 doi:10.1016/j.thromres.2020.04.023.
28. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
29. Eparine a basso peso molecolare nei pazienti adulti con COVID-19. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19_sperimentazioni_in_corso_27.03.2020.pdf (ultimo accesso: giugno 2020)
30. Profilassi del tromboembolismo venoso in pazienti con COVID-19. <http://www.fcsa.it/assets/files/FCSA%20COVID19%203.pdf> (ultimo accesso: giugno 2020).
31. De Candia E. COVID-19 ed Emostasi. http://www.siset.org/images/sisetonline/SISET_online_03-2020.pdf (ultimo accesso: giugno 2020)
32. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, et al. Parenteral anticoagulants: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141(2 Suppl):e24S-e43S.
33. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 2008;99:807-18.
34. Hunt B, Retter A, McClintock C. Practical guidance for the prevention of thrombosis and management of coagulopathy and disseminated intravascular coagulation of patients infected with COVID-19. <https://thrombosisuk.org/covid-19-thrombosis.php> (ultimo accesso: giugno 2020).
35. Marietta M, Ageno W, Artoni A, et al. COVID-19 and haemostasis: a position paper from Italian Society on Thrombosis and Haemostasis (SISSET). *Blood Transfus* 2020;18:167-9.
36. Casini A, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, et al. Thromboprophylaxis and Laboratory Monitoring for in-Hospital Patients with COVID-19 - a Swiss Consensus Statement by the Working Party Hemostasis. *Swiss Med Wkly* 2020 doi:10.4414/smw.2020.20247.
37. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2950-73.
38. Thachil J The versatile heparin in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1020-2.
39. Mousavi S, Moradi M, Khorshidahmad T, et al. Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: a systematic review. *Adv Pharmacol Sci* 2015 doi:10.1155/2015/507151.
40. Ghezzi S, Cooper L, Rubio A, et al. Heparin prevents Zika virus induced-cytopathic effects in human neural progenitor cells. *Antiviral Res* 2017;140:13-7.
41. Mycroft-West C, Su D, Elli S, et al. The 2019 coronavirus (SARS- CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding. *bioRxiv* 2020 doi.org/10.1101/2020.02.29.971093.
42. Shastri MD, Stewart N, Horne J, et al. In-vitro suppression of IL-6 and IL-8 release from human pulmonary epithelial cells by non-anticoagulant fraction of enoxaparin. *PLoS One* 2015;10(5):e0126763.
43. Milewska A, Zarebski M, Nowak P, et al. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *J Virol* 2014;88:13221-30.
44. Babin JL, Traylor KL, Witt D.M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin and fondaparinux. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:261-9.
45. Teien AN, Lie M. Evaluation of an amidolytic heparin method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thromb Res* 1977;10:399-410.
46. Lyons SG, Lasser EC, Stein R. Modification of an amidolytic heparin assay to express protein-bound heparin and to correct for the effect of antithrombin III concentration. *Thromb Hemost* 1997;58:884-7.
47. Mith ML, Wheeler KE. Weight-based heparin protocol using anti-factor Xa monitoring. *Am J Health Syst Pharm* 2010;67:371-4.
48. Chan AKC, Black L, Ing C, et al. Do we need different standard curves for measuring different low molecular weight heparins? *J Thromb Hemost* 2007;5(Supplement 2):P-S-128.
49. McGrath J, Jhonston M, Angeloni F, et al. Does monitoring patients on low molecular weight heparin (LMWH) require specific reference lines for anti-factor Xa heparin assays. *J Thromb Hemost* 2001. Supplement, P-S-2239.
50. Morelli B, Montaruli B, Cabodi D, et al. per il GdS Emostasi SIBioC. La variabilità preanalitica in coagulazione. *Biochim Clin* 2019;43:313-26.
51. Toulon P, Appert-Flory A, Fischer F, et al. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hours stability of anti Xa activity in unspun citrated tubes. *Thromb Res* 2020;186:7-12.

52. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, et al. Clinical and laboratory standards institute. collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved Guideline. 5th ed. CLSI Document H21-A5. CLSI, Wayne, PA, 2008.
53. Laposata M, Green D, Van Cott EM, et al. College of American Pathologist Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: the clinical use and laboratory monitoring of low molecular weight heparin, danaparoid, hirudin and related compounds, and argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:799-807.
54. Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2002;87:163-4.
55. Harenberg J. Is laboratory monitoring of low molecular weight heparin therapy necessary? Yes. *J Thromb Haemost* 2004;2:547-50.
56. Drage S, West J, Phillips B. Venous thromboembolism (VTE) prophylaxis and treatment in COVID-19 patients in critical care areas. <https://www.bsuh.nhs.uk/library/wp-content/uploads/sites/8/2020/04/BSUH-Crit-care-Anticoag-in-COVID-guidelinesv1.4-2170420.pdf> (ultimo accesso: giugno 2020).

Al “cuore” del quadro clinico di COVID-19

Luisa Zanolla¹, Maria Stella Graziani²

¹Università di Verona

²Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

ABSTRACT

To the “heart” of the clinical picture of COVID-19.

Several studies document cardiac involvement in COVID-19 patients, as evidenced by cardiac biomarkers elevation. Hospitalized patients with cardiac involvement have a poorer prognosis, in terms of need for intensive care unit, or mortality. This paper provides a review of the wealth of literature on heart involvement in COVID 19. The majority of the available papers reports data from the Chinese experience and it is not clear at the moment whether the observations are related to really different populations of patients. The mechanism of the cardiac injury is likely multifactorial. There could be direct myocardial damage by the virus, but the few heart histologic specimens available do not evidence the presence of virus RNA in myocytes. The infection in the lungs may produce a cytokine storm which in turn could damage myocytes. Coagulation system is also affected by COVID-19: D-dimer is increased, while platelets are reduced in most studies, and both parameters relate directly with the risk of death. These alterations are probably the cause of the many cases of pulmonary embolism, venous thromboembolisms, and arterial embolism reported. Hypertension and previous cardiovascular diseases are also likely involved in the severity of the observed cardiac injury. Although all these mechanisms may play a role in cardiac involvement, the severe lung infection alone could justify cardiac damage, due to the simultaneous reduced supply and increased demand of myocardial oxygen. We still know very little about this new viral disease, but as knowledge is accumulating, the medical community will pinpoint the mechanism of cardiac involvement and find the optimal strategy to prevent its severe consequences.

INTRODUZIONE

Nell'attuale situazione di pandemia da COVID-19 (Corona Virus Disease 2019), il clinico si ritrova disarmato e impreparato di fronte ad una nuova emergenza, sulla quale la letteratura medica non fornisce alcuna citazione fino ai primi giorni del 2020 (1).

Il quadro clinico è causato dal virus SARS CoV 2 (Sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2), inizialmente denominato 2019-nCoV (nuovo Coronavirus del 2019), individuato per la prima volta in Cina: le manifestazioni sono caratterizzate da una sindrome di tipo influenzale, di entità modesta nella larga maggioranza dei casi, ma che nel 15% dei casi si complica con una severa polmonite interstiziale e gradi variabili di insufficienza respiratoria. La sintomatologia tipica d'esordio di COVID 19 è costituita da febbre, tosse, dispnea e astenia (2).

Nella prima casistica cinese pubblicata da Huang et al. (3), apparsa il 30 gennaio 2020, il 29% dei pazienti

progrediva ad una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), con una mortalità del 15%. In un'altra casistica cinese pubblicata a pochi giorni di distanza da Wang et al. (4), il 61% dei casi progrediva ad ARDS; veniva anche segnalata comparsa di aritmie nel 44,3% dei casi, anche se non veniva precisato il tipo di aritmia. Nella casistica di un ospedale di Wuhan pubblicata successivamente da Chen et al. (5), i pazienti deceduti, pari al 14% della casistica, erano progrediti a ARDS nella totalità dei casi.

Già in queste prime segnalazioni (3,4,5) appariva evidente il ruolo della Medicina di Laboratorio, soprattutto nel discriminare i pazienti ad evoluzione più sfavorevole, che richiedevano il ricovero in terapia intensiva ed il supporto respiratorio, con elevata mortalità. I parametri predittori di esito sfavorevole erano identificati in: leucocitosi neutrofila con calo degli eosinofili, aumento del D-dimero, diminuzione dell'albumina, aumento delle transaminasi, della bilirubina e della lattato deidrogenasi (LDH), aumento

Corrispondenza a: Luisa Zanolla, Via Albere 73, 37138 Verona, E-mail luisa.zanolla@univr.it

Ricevuto: 27.05.2020

Revisionato: 29.05.2020

Accettato: 03.06.2020

Pubblicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.063

della procalcitonina, ma soprattutto aumento delle troponine cardiache (4,5) o aumento del numero di casi con troponine cardiache al di sopra del 99° percentile (3), come anche di NT-proBNP (5). Un recente studio italiano in un'area particolarmente coinvolta (6) conferma questi parametri aggiungendo l'aumento della concentrazione di urea, creatinina, proteina C reattiva e ferritina e la diminuzione di emoglobina.

Nonostante l'attenzione nei pazienti COVID-19 fosse ovviamente centrata sui sintomi respiratori, già in queste prime casistiche veniva segnalata la presenza di alterazioni biomorali indicative di un coinvolgimento cardiaco nei casi più gravi. Era tuttavia già ben noto (7) che nei casi di ARDS le troponine cardiache sono aumentate in un numero elevato di pazienti, e che la loro concentrazione costituisce un indicatore prognostico sfavorevole. Ma è comparsa precocemente una serie di segnalazioni che richiamavano l'attenzione su sintomi cardiaci non direttamente riconducibili al solo sovraccarico emodinamico dell'insufficienza respiratoria: miopericardite (8,9,10), tamponamento cardiaco (11,12), shock cardiogeno (13,14 15), embolia polmonare (16,17), blocco atrio-ventricolare completo (18). L'interesse della ricerca sugli effetti cardiaci della COVID-19 si è andata quindi accentuando, rilevando innanzitutto che una elevazione delle troponine cardiache costituisce un reperto non infrequente, associato a probabilità di ricovero in cure intensive e mortalità.

Scopo di questa rassegna è una revisione della letteratura pubblicata in questi primi mesi sull'interessamento cardiaco in corso di COVID-19, sulla sua frequenza, la sua rilevanza clinica, la sua genesi ed i fattori di rischio. Data la complessità e la frammentarietà del materiale pubblicato, diviene laborioso per il lettore formarsi un'idea organica ed organizzata. Da ciò la scelta di organizzare una rassegna che cerchi di fornire un inquadramento del problema.

METODOLOGIA SEGUITA

Ricerca bibliografica

Per valutare la letteratura sull'impatto di COVID-19 sul cuore, si è scelto di delimitare l'area di ricerca. Nell'attuale fase della pandemia vi è un'intensa attività di pubblicazione, con contrazione dei tempi di revisione, a rischio anche di limitarne la selettività. Conducendo una ricerca estremamente semplice su PubMed (al 5 maggio 2020) con "COVID 19 AND heart" come unici argomenti, limitando la lingua all'inglese e all'italiano, si ottenevano 359 risultati. Ancor più ampio il numero di lavori pre-pubblicati su siti come BioRxiv o MedRxiv. È alto il numero di lavori pubblicati su riviste cinesi, ma molte di queste riportano la traduzione in inglese solo dell'abstract, rendendone impossibile la valutazione.

Data la difficoltà di orientarsi in una offerta così ampia e non selezionata, in un arco temporale molto

ristretto, si è deciso di limitarsi ad utilizzare articoli di riviste "peer reviewed" già pubblicati a stampa o comparsi sul sito della rivista "ahead of print". In questa fase iniziale gli studi possono risentire anche di un bias di selezione: la pressoché totalità degli studi è stata condotta su pazienti ospedalizzati, ed i primi casi studiati erano costituiti da individui esposti precocemente e senza protezione alla fonte di contagio. Molti dei primi lavori indicano la percentuale di pazienti che avevano avuto contatto con il "Huanan seafood market" di Wuhan (2-4): è possibile che questi primi contagi abbiano avuto una diversa gravità ed andamento clinico, oltre a subire la penalizzazione derivante dalla totale inesperienza dei medici nella gestione della patologia generata dal nuovo virus.

Per i risultati degli esami di laboratorio e la prevalenza di comorbidità sono stati riportati i valori separatamente per livello di gravità della casistica; il criterio secondo il quale viene effettuata tale divisione nei diversi studi è estremamente variabile, considerando a volte la mortalità, a volte la necessità di ricovero in terapia intensiva, oppure l'interessamento cardiaco o il livello clinico/strumentale di gravità. Pur tenendo conto di tale eterogeneità, i dati sono presentati confrontando i valori in pazienti più o meno gravi, ma mantenendo l'indicazione dei criteri con cui sono classificati.

Per quanto riguarda le frequenze di comorbidità, la numerosità delle casistiche è estremamente eterogenea, per cui l'interpretazione delle frequenze non è immediata. Per ottenere una stima globale del fenomeno è stata utilizzata la tecnica della meta-analisi, generando una stima ponderata dell'effetto in forma di rischio relativo, a seconda dell'evoluzione sfavorevole o meno. È stata utilizzata la routine METAN di Stata 14 (19). Il calcolo non ha la pretesa di essere una meta-analisi, in quanto la ricerca bibliografica è stata effettuata con presupposti che precludono la copertura completa.

Per quanto concerne la prevalenza di patologia, una stima ponderata che include anche i lavori in cui i dati non sono disaggregati per livello di gravità è stata effettuata utilizzando la routine METAPROP di Stata (19).

Parametri di laboratorio

I valori dei parametri di laboratorio ricavati dalla bibliografia consultata, che si trovano raggruppati in tabelle specifiche, sono stati riportati come pubblicati nei lavori originali, con la sola modifica delle unità di misura che sono state tutte riportate al litro (L) per consentire gli opportuni confronti. Va peraltro segnalato come le informazioni sui parametri di laboratorio recuperabili nei lavori originali siano estremamente carenti: i metodi analitici non sono mai menzionati e molto raramente vengono riportati i rispettivi intervalli di riferimento. Queste mancanze rendono estremamente arduo il confronto fra i valori contenuti in lavori pubblicati da gruppi di Autori diversi. A titolo di esempio, si segnala che non è sempre chiaro se i valori di troponina I siano

stati ottenuti o meno con metodi ad elevata sensibilità (hs), anche quando l'analita viene così identificato; anche i risultati degli esami di coagulazione (tempo di protrombina e tempo di tromboplastina parziale attivato) espressi in secondi anziché come ratio, senza la rispettiva indicazione degli intervalli di riferimento, impediscono di fatto il confronto fra studi diversi; queste carenze rendono difficili e a rischio di scarsa accuratezza le rassegne sistematiche e le meta-analisi.

Come riportato da M. Plebani in questo stesso supplemento della rivista (20), l'analisi della bibliografia su COVID-19 ha evidenziato due aspetti particolarmente importanti per la Medicina di Laboratorio: da un lato la scarsa attenzione che riviste cliniche anche di notevole prestigio dedicano alla presentazione dei dati di laboratorio e in secondo luogo come sia assolutamente necessario che il processo di armonizzazione in Medicina di Laboratorio, già intrapreso da alcuni anni (21, 22) prosegua il più celermente possibile internazionalmente, con lo scopo ultimo di ottenere dati utili ad una corretta comprensione dei fenomeni descritti che è il solo modo che la comunità scientifica conosce per orientare una corretta gestione del paziente.

COVID-19 E BIOMARCATORI CARDIACI

Numerosi studi riportano i valori dei biomarcatori di interessamento miocardico nei pazienti con COVID-19, soprattutto in relazione alla gravità del quadro clinico.

In una coorte di 191 pazienti consecutivi con diagnosi confermata di COVID-19, pubblicata da Zhou et al. (23), veniva definito interessamento cardiaco la comparsa di innalzamento dei valori di hs troponina I al di sopra del 99° percentile o di nuove alterazioni elettrocardiografiche o ecocardiografiche. I criteri di interessamento cardiaco erano presenti nel 17% dei pazienti: i pazienti successivamente deceduti presentavano già al momento del ricovero valori più alti di hs-troponine cardiache (Tabella 1), e una proporzione più elevata di questi presentava interessamento cardiaco (59% *versus* 1% - $p < 0,0001$).

In uno studio di coorte di Shi et al. (24), condotto nell'ospedale universitario di Wuhan su 416 pazienti consecutivi con diagnosi confermata di COVID-19, il 19,7% dei pazienti presentava segni di interessamento cardiaco. Veniva definito interessamento cardiaco la presenza di concentrazioni di marcatori cardiaci superiori al 99° percentile, indipendentemente da nuove anomalie all'elettrocardiogramma (ECG) o all'ecocardiogramma. La valutazione al momento del

ricovero dei pazienti che successivamente avrebbero presentato interessamento miocardico, secondo la definizione utilizzata, segnalava già valori significativamente superiori a quelli della rimanente popolazione ovviamente per hs troponina I, ma anche per CK-MB^a e NT-proBNP; i valori sono riportati in Tabella 1. Nei pazienti con interessamento miocardico era significativamente più elevata la percentuale di quelli che si complicavano con ARDS (58,5% *versus* 14,7% - $p < 0,001$) e dei deceduti (51,2% *versus* 4,5% - $p < 0,001$). Questo andamento, tuttavia, non consente di discriminare se esista un interessamento cardiaco diretto nel quadro di COVID-19 o se i segni di interessamento cardiaco siano marcatori di quadri più gravi della patologia. A rendere più difficoltosa l'interpretazione di questi risultati, nel medesimo studio (24) solo una bassa percentuale dei pazienti con segni di interessamento cardiaco aveva effettuato un ECG, presentando alterazioni di tipo ischemico in tutti i 14 tracciati effettuati durante il periodo di elevazione dei biomarcatori cardiaci. Tuttavia, in una analisi multivariata che teneva conto di età, cardiopatia preesistente, diabete, ARDS, aumento della creatinina e NT-proBNP >900 ng/L, la mortalità risultava risentire significativamente dell'interessamento cardiaco, indipendentemente dalla ARDS, unica altra covariata significativa; questo riscontro orienta per un interessamento cardiaco diretto.

Osservazioni sostanzialmente simili sono riportate in un'altra coorte di 187 pazienti dell'area di Wuhan pubblicata da Guo et al. (25); i pazienti venivano analizzati secondo la presenza di valori di troponina T (TnT) al di sopra del 99° percentile^b, che coincide con la definizione di interessamento cardiaco nello studio di Shi et al. (24). I pazienti con TnT elevata, rispetto ai rimanenti, presentavano anche in questa casistica valori più elevati di CK-MB e di NT-proBNP (Tabella 1). Nei pazienti con interessamento cardiaco la mortalità era più alta (59,6% *versus* 8,9%; $p < 0,001$); interessante come analizzando la mortalità secondo la presenza sia di TnT elevata che di cardiopatia (Figura 1), l'effetto dell'interessamento cardiaco denotato dalla TnT elevata appare il più evidente, anche se non è riportato un confronto statistico. Pazienti con cardiopatia preesistente, ritenuti a rischio più alto di evoluzione sfavorevole di COVID-19, in presenza di TnT nella norma presentavano una mortalità che differiva scarsamente da pazienti con TnT nella norma pur in assenza di cardiopatia.

^a I valori di CK-MB non sono stati inseriti nelle tabelle: in Europa e in Italia questo è considerato un marcatore obsoleto di danno cardiaco del quale non si suggerisce l'utilizzo. Gli Autori hanno ritenuto che la trattazione di questi valori avrebbe potuto costituire un messaggio fuorviante per i lettori

^b Il lavoro di Guo et al. (24) non riporta i valori di Troponina T; i pazienti sono divisi in base a TnT sopra o sotto il 99° percentile.

Tabella 1*Biomarcatori cardiaci*

Autore (riferimento)	Biomarcatore (unità di misura)	Numerosità	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Huang et al. (3)	hs-troponina I (ng/L)	41	Ricovero in cure intensive	3,3 (3,0-163)	3,5 (0,7-5,4)	0,075 (NS)
Huang et al. (3)	hs-troponina I >99° percentile	41	Ricovero in cure intensive	31%	4%	0,017
Wang et al. (4)	hs-troponina I (ng/L)	138	Ricovero in cure intensive	11,0 (5,6-26,4)	5,1 (2,1-9,8)	0,004
Chen et al. (5)	hs-troponina I (ng/L)	274	Decesso	40,8 (14,7-157,8)	3,3 (1,9-7,0)	*
Zhou et al. (23)	hs-troponina I (ng/L)	191	Decesso	22,2 (5,6-83,1)	3,0 (1,1-5,5)	<0,0001
Shi et al. (24)	hs-troponina I (µg/L)	416	Interessamento cardiaco	0,19 (0,08-1,12)	<0,006 (<0,006-0,009)	<0,001
Deng et al. (31)	hs-troponina I (µg/L)	112	Severità quadro clinico	0,10 (0,01-0,77)	0,0 (0,0-0,01)	<0,01
Ruan et al. (37)	Troponina (ng/L)	150	Decesso	30,3 (151,0)	3,5 (6,2)	<0,001
Inciardi et al. (52)	hs-troponina I (ng/L)	99	Decesso	44 (19-65)	16 (8-28)	0,001
Zhou et al. (77)	hs-troponina I (ng/L)	34	Severità quadro clinico	46,8 (34,2-299,8)	4,8 (2,5-8,4)	<0,001
Wei et al. (94)	hs-troponina I (ng/L)	101	Interessamento cardiaco	42,0 (17,1-320,1)	6,0 (4,1-8,5)	<0,001
Liang et al. (97)	hs-troponina I (ng/L)	1590	Severità quadro clinico	288,1±1124,2	42,7±439,0	*
Chen et al. (5)	NT-proBNP (ng/L)	274	Decesso	800 (389,8-1817,5)	72 (20,0-185)	*
Shi et al. (24)	NT-proBNP (ng/L)	416	Interessamento cardiaco	1689 (698-3327)	139 (51-335)	<0,001
Guo et al. (25)	NT-proBNP ng/L)	187	Interessamento cardiaco	817,4 (336-1944)	141,4 (39,3-303,6)	<0,001
Deng et al. (31)	NT-proBNP (ng/L)	112	Severità quadro clinico	1142,0 (388,3-5956,5)	101,9 (34,0-363,8)	<0,01
Inciardi et al. (52)	NT-proBNP (ng/L)	99	Decesso	2196 (624-4546)	198 (87-608)	0,001
Wei et al. (94)	NT-proBNP (ng/L)	101	Interessamento cardiaco	6082 (142,7-7588)	62,9 (26,6-148,2)	<0,001

NS, non statisticamente significativo

* confronto statistico non riportato

I dati sono riportati come mediana (intervallo interquartile) o media ± 1 deviazione standard o frequenza assoluta (frequenza percentuale)

Il lavoro di Ruan et al. (37)) riporta l'ampiezza dell'intervallo interquartile, e non i suoi limiti.

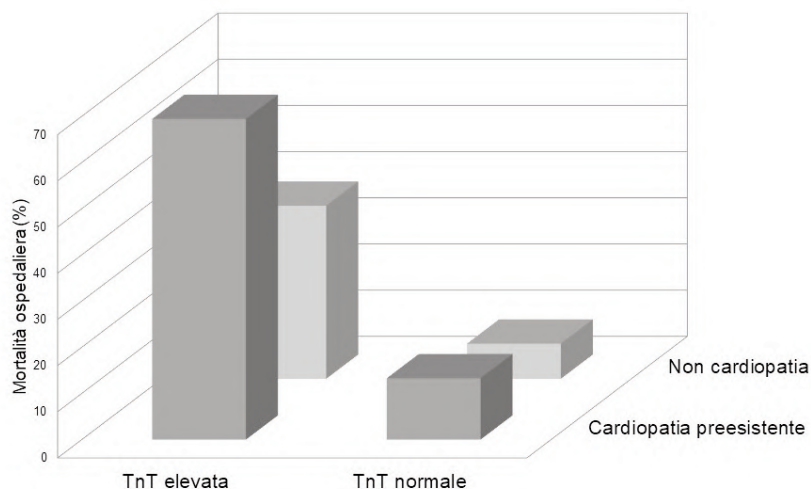


Figura 1

Mortalità ospedaliera percentuale nello studio di T Guo et al. (25) secondo la presenza di cardiopatia anamnestica (cardiopatia ischemica, ipertensione o cardiomiopatia) e rialzo della TnT oltre il 99° percentile al momento del ricovero

Le osservazioni sulla frequenza di rialzo delle troponine cardiache sono numerose: la presentazione numerica in Tabella 1 evidenzia come in tutti gli studi i valori delle troponine cardiache fossero più elevati nei pazienti con maggior criterio di gravità; la sola differenza non significativa è riportata nello studio di Huang et al. (3), che ha una bassa numerosità, ma comunque evidenzia una differenza significativa quando si confrontano le percentuali di pazienti con valori di troponine cardiache superiori al 99° percentile.

Un tentativo di sintesi quantitativa di questi risultati sui biomarcatori cardiaci è riportato nella meta-analisi di Li et al. (26). Le concentrazioni di tutti i biomarcatori cardiaci erano significativamente più elevate nei casi severi di COVID-19, sia troponine cardiache che CK-MB ($p < 0,0001$ per entrambi) che NT-proBNP ($p = 0,009$). Va tuttavia puntualizzato che la meta-analisi tratta nello stesso modo i dati di troponina T, troponina I, hs troponina T e hs-troponina I, rendendo di dubbio valore una sintesi quantitativa, pur in forma di differenza media standardizzata. Va inoltre considerato che la larga maggioranza dei dati di laboratorio è riportata negli articoli citati come mediana e intervallo interquartile, mentre la meta-analisi assumeva, per approssimazione, come stima della media il valore della mediana e come stima della deviazione standard la metà della differenza tra i due estremi dell'intervallo interquartile, benché esistano metodi statisticamente validati per estrapolare dati per la meta-analisi da lavori che presentano solo l'intervallo interquartile (27). Nei risultati della meta-analisi, il rischio relativo di danno cardiaco, definito come un rialzo delle troponine cardiache al di sopra della

norma, risultava aumentato a 5,99 nei casi severi [intervallo di confidenza al 95% (95%IC) – 3,04-11,80; $p < 0,001$]. Il rischio relativo di morte era aumentato a 3,85 nei pazienti con danno cardiaco (95%IC 2,13-6,96; $p < 0,001$). Globalmente il rischio relativo di morte dei casi severi era 13,90 (95%IC 7,32-26,40; $p < 0,001$).

Questi risultati segnalano che, in corso di COVID-19, esistono segni di interessamento cardiaco, ma lasciano aperto il dubbio sulla sua natura. Un rialzo delle troponine cardiache è indicativo di danno miocardico, ma non consente di distinguere una miocardite da danno diretto alle cellule cardiache ad opera del virus, da un danno ischemico miocardico. Nel contesto di una infezione acuta, poi, l'ischemia cardiaca può derivare non da classica rottura di placca o trombosi di lesioni delle arterie coronarie epicardiche, ma da uno sbilanciamento tra apporto e domanda di ossigeno (sindrome coronarica acuta tipo 2) (28).

INTERPRETAZIONI POSSIBILI

I meccanismi sottostanti il danno miocardico in corso di COVID-19, evidenziato da un rialzo delle troponine cardiache e di NT-proBNP rimangono da chiarire. Sono state formulate più ipotesi, non mutuamente esclusive, per l'interpretazione del fenomeno, che si associa comunque ad una prognosi più sfavorevole.

Danno diretto del virus

Esiste la possibilità che i fenomeni descritti a carico del cuore rappresentino un danno diretto al miocardio ad opera del virus. Nel caso della SARS CoV era stata dimostrata (29) la presenza del genoma virale nel miocardio nel 35% delle autopsie. Anche un'altra grave infezione da Coronavirus, la "Middle East respiratory syndrome" (MERS-CoV), può causare miocardite acuta (30) e scompenso cardiaco. Il virus SARS-CoV-2, responsabile dell'attuale pandemia, potrebbe condividere meccanismi analoghi, data la somiglianza del genoma virale. Sono però molto scarsi i dati che consentono di supportare o confutare questa ipotesi.

In una casistica di 112 pazienti con COVID-19 (31), nell'area di Wuhan, la presenza di coinvolgimento cardiaco veniva monitorata con maggiore attenzione, associando al controllo dei biomarcatori cardiaci l'esecuzione di ecocardiogramma. Nei casi più severi la frazione di eiezione (FE) risultava ridotta ($58,5 \pm 5,4\%$ versus $62,0 \pm 5,5\%$; $p < 0,01$) ma rimanendo in un ambito di normalità o "mid-range". Un versamento pericardico con spessore superiore ai 5 mm era presente nel 28,4% dei casi più severi, ma solo nel 6,7% dei rimanenti pazienti ($p < 0,01$). Per 14 pazienti (12,5%) erano presenti i criteri di una possibile miocardite, 13 dei quali con quadro severo; tutti questi pazienti presentavano aumento dei valori di CK-MB e NT-proBNP. A differenza delle altre casistiche riportate, nella maggior parte dei pazienti i valori delle troponine cardiache risultavano normali al momento del ricovero, ma successivamente aumentavano nel 37,5% dei casi, con aumenti molto marcati nella settimana che precedeva il decesso. Esclusi dai 14 casi sospetti per miocardite, quattro pazienti con cardiopatia preesistente ed uno con quadro di infarto acuto del miocardio, nessuno degli altri nove presentava all'ecocardiogramma riduzione della FE o anomalie della cinetica segmentaria o ispessimento parietale, reperti richiesti per confermare la diagnosi di miocardite (32). Vi era in alcuni casi versamento pericardico, ma di entità lieve, compatibile con il quadro sistemico. Non si evidenziano quindi, da questa serie, elementi sufficienti per ipotizzare un effetto diretto del virus sul cuore.

Nonostante il valore soltanto aneddótico di un caso clinico (33), di un uomo di 50 anni morto per arresto cardiaco in corso di COVID-19, all'autopsia furono reperiti all'esame autoptico del cuore scarsi infiltrati cardiaci di monociti, senza altri segni di danno miocardico.

Sono osservazioni, quindi, che non depongono per la presenza di una miocardite da Coronavirus. Vi sono casi invece più suggestivi per miocardite, quale quello riportato da Inciardi et al. (8): in presenza di alterazioni di laboratorio indicative di interessamento miocardico e di coronarie angiograficamente indenni, la risonanza magnetica nucleare (RMN) evidenziava una ipocinesia parietale diffusa, con aumento degli spessori parietali, aspetto da marcato edema interstiziale e riduzione della

funzione sistolica globale a FE del 35%.

Sono assai scarsi i dati anatomici ed istologici disponibili. Anche i dati morfologici forniti da ecocardiogramma e RMN sono disponibili solo in casi selezionati, data la difficoltà di eseguire tali esami con le misure di protezione del paziente e degli operatori sanitari.

Nel caso descritto da Kim et al. (9), in una giovane donna senza evidenza angiografica di coronaropatia, all'ecocardiogramma la funzione sistolica era severamente ridotta e la RMN presentava aspetti suggestivi per edema parietale, orientando per diagnosi di miocardite.

Un aspetto simile nella RMN, era documentato nel caso riportato da Sala et al. (34), in una donna di 43 anni, con coronarie indenni all'angio-TAC; ipocinesia infero-laterale con disfunzione globale moderata (FE 43%), diffuso edema miocardico, con aspetto di pseudo-ipertrofia. La biopsia endomiocardica evidenziava infiltrato di linfociti-T con importante edema interstiziale e limitati focolai di necrosi. Non era documentabile materiale genetico del virus SARS-CoV-2 nel miocardio.

Nel caso segnalato da Zeng et al (10) era disponibile solo l'ecocardiogramma, che evidenziava una riduzione della funzione sistolica con FE 32%, dilatazione ventricolare ed ipertensione polmonare (44 mmHg); dopo 11 giorni, il setto interventricolare si ispessiva a 14 mm, indicando la presenza di edema; dopo due settimane la FE recuperava al 68%, e volumetria e spessori ventricolari si erano normalizzati. Tra la 26a e la 29a giornata, la funzione del ventricolo destro peggiorava rapidamente, e in 33a giornata il paziente decedeva. Purtroppo, non sono disponibili dati autoptici ed istologia del miocardio, che aiutino ad interpretare il quadro.

Nel caso pubblicato da Doyen et al. (14), la diagnosi di miocardite era sostenuta, oltre che dall'aumento delle troponine cardiache, dall'assenza di coronaropatia e dall'aspetto alla RMN di "late enhancement" al gadolinio dell'apice ventricolare e della parete infero-laterale, ritenuto diagnostico dagli Autori, che decidevano di non effettuare biopsia endomiocardica per l'assenza di segni di scompenso o aritmie. Le alterazioni elettrocardiografiche erano del tutto aspecifiche.

Il caso di Tavazzi et al. (15) è tra i pochi a riportare in dettaglio una biopsia endomiocardica in un paziente di 68 anni, con severa disfunzione sistolica del ventricolo sinistro (FE 34%). Nelle cellule interstiziali venivano documentate particelle virali con le dimensioni e la forma del Coronavirus; non erano invece osservate particelle virali nei miociti e nell'endotelio. I miociti presentavano alterazioni aspecifiche, con lisi focale miofibrillare; non segni di vasculite o trombosi nei piccoli vasi intramurali.

L'assenza di particelle virali nei miociti è confermata da uno studio cinese di Yao et al. (35) che riportava l'esito di tre autopsie in pazienti deceduti per COVID-19: l'osservazione al microscopio elettronico, la colorazione immunoistochimica e l'analisi molecolare con Polymerase Chain Reaction (PCR) non hanno rilevato la

presenza del virus nel tessuto miocardico. Il miocardio era infiltrato di macrofagi e di un piccolo numero di cellule T.

A tutt'oggi, quindi, non disponiamo di evidenze conclusive sul ruolo di un danno diretto al miocardio ad opera del virus; nel limitato numero di dati diretti disponibile, il virus non sembra essere presente localmente nei miociti, per cui appare difficile pensare ad una sua azione diretta, mentre sono segnalate reazioni di tipo infiammatorio, che potrebbero derivare da un processo più sistemico che locale.

“Tempesta” di citochine

Uno dei meccanismi più interessanti proposti per interpretare il danno cardiaco nelle forme severe di COVID-19 chiama in causa la risposta infiammatoria sistemica. Come altri Coronavirus, il SARS-CoV-2 potrebbe infatti indurre un rilascio intensivo di citochine.

Nella casistica di Huang et al (3) risultavano aumentati, rispetto ai valori di riferimento, al momento del ricovero i valori di interleuchina-1B, interleuchina-1RA, interleuchina-7, interleuchina-8, interleuchina-9, interleuchina-10, “granulocyte colony-stimulating factor”, interferone- γ , “inducible protein 10”, “monocyte chemoattractant protein 1”, “macrophage inflammatory protein 1- α ”, e “tumour necrosis factor- α ” (TNF- α).

Nei 99 pazienti descritti da Chen et al. (36), il 52% presentava valori di interleuchina-6 al di sopra della norma. Anche nei pazienti di Zhou et al. (23) e di Ruan et al. (37) i valori di interleuchina-6 erano più elevati nei pazienti deceduti.

Nella casistica di Chen et al. (5), benché numericamente limitata, nei pazienti successivamente deceduti si rilevavano, rispetto ai sopravvissuti, valori più elevati di recettore dell'interleuchina-2, di interleuchina-6, di interleuchina-8, di interleuchina-10 e di TNF- α .

Le alterazioni dei parametri biochimici relativi al sistema immunitario nei pazienti con COVID 19, sono ben documentate nella casistica di Qin et al. (38), che valutava 452 pazienti consecutivi ricoverati nell'ospedale di Tongji. Il 63,3% dei pazienti manifestava una forma severa di malattia e, rispetto ai rimanenti pazienti, presentava valori più elevati di interleuchina-2R, interleuchina-6, interleuchina-8 e interleuchina-10, mentre i valori di TNF- α erano marginalmente aumentati. Il conteggio dei leucociti era aumentato, con valori più alti di neutrofili (Tabella 2) e più bassi di linfociti, con rapporto neutrofili/linfociti significativamente più alto. Questo profilo suggerisce una vulnerabilità dei linfociti all'infezione virale e alla distruzione (come del resto è tipico in ogni infezione virale). Il numero di linfociti T era significativamente ridotto (38); i linfociti T helper (CD3+CD4+) erano inferiori alla norma, in modo più pronunciato nei casi severi; i linfociti T suppressor (CD3+CD8+) erano inferiori alla norma, ma la differenza tra casi severi e non, non era statisticamente significativa. Gli Autori ipotizzano che, dati i livelli aumentati di citochine e chemochine (soprattutto nei casi più gravi), il consumo delle cellule T (CD3+CD4+) e il

calo delle cellule T regolatorie, possano determinare un peggioramento della risposta infiammatoria, con produzione di una tempesta di citochine e aggravamento del danno tissutale.

Gli organi del sistema immunitario sono quelli più manifestamente aggrediti dal SARS-CoV 2, dopo i polmoni. Le linee guida cinesi per la diagnosi ed il trattamento di COVID-19 (39) riportano che, nel limitato numero di autopsie condotte, la milza risultava atrofica, con necrosi ed emorragie ed un numero molto ridotto di linfociti e neutrofili. I linfociti erano ridotti anche nei linfonodi, con riduzione della quota di CD4+ e CD8+.

Oltre ai parametri più specifici, è rilievo frequente in numerosi studi la leucocitosi neutrofila, l'aumento della proteina C reattiva e l'aumento della procalcitonina, come riassunto in Tabella 2.

Interessante l'emergere di nuovi marcatori, che sembrano avere valore prognostico. La presepsina (PSP) è un marcatore emergente di sepsi; è la frazione solubile del cluster di differenziazione CD14, che appartiene alla famiglia dei “Toll-like receptor”, che riveste un ruolo importante nella identificazione dei ligandi di batteri (gram positivi e negativi) ed è un potente stimolatore della risposta infiammatoria (40, 41). In una casistica di 75 pazienti con diagnosi confermata di COVID-19 (42), i valori di PSP risultavano significativamente più elevati nei pazienti deceduti, e pazienti con valori superiori ai 250 ng/L andavano incontro ad una degenza in cure intensive significativamente più protratta.

Queste osservazioni suggeriscono un ruolo possibile per una risposta iperinfiammatoria nella evoluzione di COVID-19 verso le forme più severe. Il rilascio di citochine e chemochine, la cosiddetta “tempesta” di citochine, risposta immunitaria fuori controllo e disfunzionale, ha la potenzialità di determinare non solo infiammazione vascolare e instabilità di placca, ma anche infiammazione diretta del miocardio, con apoptosi o necrosi di miociti. Benché la risposta iperinfiammatoria si sviluppi verosimilmente nell'organo bersaglio iniziale, costituito dal polmone, la risposta infiammatoria amplificata può avere effetti deleteri su altri organi, incluso il cuore, che risulta indirettamente danneggiato (43). Questa interpretazione apre il cammino ad una serie di studi clinici attualmente in corso su diversi tipi di farmaci mirati a controllare tale risposta anomala.

Tabella 2
Parametri di infiammazione

Autore (riferimento)	Biomarcatore (unità di misura)	Numerosità	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Huang et al. (3)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	41	Ricovero in cure intensive	11,3 (5,8-12,1)	5,7 (3,1-7,6)	0,011
Wang et al. (4)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	138	Ricovero in cure intensive	6,6 (3,6-9,8)	4,3 (3,3-5,4)	0,003
Chen et al. (5)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	274	Decesso	10,2 (6,2-13,6)	5,0 (3,7-6,3)	*
Zhou et al. (23)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	191	Decesso	9,8 (6,9-13,9)	5,2 (4,3-7,7)	<0,0001
Shi et al. (24)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	416	Interessamento cardiaco	9,4 (6,9-13,8)	5,5 (4,2-7,4)	<0,001
Guo et al. (25)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	187	Interessamento cardiaco	7,4 (4,9-11,6)	4,6 (3,7-6,2)	<0,001
Ruan et al. (37)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	150	Decesso	10,62 (4,76)	6,76 (3,49)	<0,001
Qin et al. (38)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	452	Ricovero in cure intensive	5,6 (4,3-8,4)	4,9 (3,7-6,1)	<0,001
Inciardi et al. (52)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	99	Decesso	5,4 (4,5-6,6)	7,0 (5,0-8,9)	0,029
Zhou et al. (59)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	34	Severità del quadro clinico	9,32 (6,37-10,99)	5,93 (4,77-7,45)	NS
Wei et al. (94)	Leucociti (x10 ⁹ /L)	101	Interessamento cardiaco	5,9 (3,6-7,8)	5,4 (4,3-7,1)	0,83 (NS)
Wang et al. (98) Training cohort	Leucociti (x10 ⁹ /L)	296	Decesso	7,8 (4,7-11,9)	4,7 (3,4-6,4)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	Leucociti (x10 ⁹ /L)	44	Decesso	6,8 (5,9-9,1)	5,3 (3,2-7,3)	0,029
Huang et al. (3)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	41	Ricovero in cure intensive	10,6 (5-11,8)	4,4 (2,0-6,1)	0,00069
Wang et al. (4)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	138	Ricovero in cure intensive	4,6 (2,6-7,9)	2,7 (1,9-3,9)	<0,001
Chen et al. (5)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	274	Decesso	9,0 (5,4-12,7)	3,2 (2,4-4,5)	*
Guo et al. (25)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	187	Interessamento cardiaco	6,0 (3,5-10,1)	3,1 (2,4-4,9)	<0,001
Qin et al. (38)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	452	Ricovero in cure intensive	4,3 (2,9-7,0)	3,2 (2,1-4,4)	<0,001
Inciardi et al. (52)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	99	Decesso	3,0 (2,8-6,1)	5,2 (3,2-7,1)	0,035
Wei et al. (94)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	101	Interessamento cardiaco	3,9 (2,0-5,3)	3,6 (2,8-5,2)	0,61 (NS)
Liang et al. (97)	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	1590	Severità del quadro clinico	6,4±3,6	3,9±1,9	*
Wang et al. (98) Training cohort	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	296	Decesso	6,4 (3,2-10,0)	3,0 (2,0-4,4)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	Neutrofili (x10 ⁹ /L)	44	Decesso	5,8 (5,0-8,4)	3,4 (2,0-5,0)	<0,001
Huang et al. (3)	Procalcitonina (µg/L)	41	Ricovero in cure intensive	0,1 (0,1-0,4)	0,1 (0,1-0,1)	0,031

Tabella 2
Continua

Autore (riferimento)	Biomarcatore (unità di misura)	Numerosità	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Wang et al. (4)	Procalcitonina > 0,05 (µg/L)	138	Ricovero in cure intensive	27 (75%)	22 (21,6%)	<0,001
Chen et al. (5)	Procalcitonina (µg/L)	274	Decesso	0,33 (0,14-0,65)	0,05 (0,03-0,08)	*
Zhou et al. (23)	Procalcitonina (µg/L)	191	Decesso	0,1 (0,1-0,5)	0,1 (0,1-0,1)	<0,0001
Shi et al. (24)	Procalcitonina (µg/L)	191	Interessamento cardiaco	0,27 (0,10-1,22)	0,06 (0,03-0,10)	<0,001
Guo et al. (25)	Procalcitonina (µg/L)	187	Interessamento cardiaco	0,21 (0,11-0,45)	0,05 (0,04-0,11)	<0,001
Deng et al. (31)	Procalcitonina (µg/L)	112	Severità del quadro clinico	0,5 (0,1-0,7)	0,1 (0,0-0,3)	<0,01
Qin et al. (38)	Procalcitonina (µg/L)	452	Ricovero in cure intensive	0,1 (0,0-0,2)	0,05 (0,03-0,09)	<0,001
Inciardi et al. (52)	Procalcitonina (µg/L)	99	Decesso	0,8 (0,2-2,0)	0,1 (0,1-0,3)	0,005
Wei et al. (94)	Procalcitonina (ng/L)	101	Interessamento cardiaco	0,04 (0,02-0,13)	0,02 (0,02-0,04)	0,037
Liang et al. (97)	Procalcitonina (µg/L)	1590	Severità del quadro clinico	0,6±1,4	0,8±10,3	*
Chen et al. (5)	Ferritina (µg/L)	274	Decesso	1418,3 (915,4-2236,2)	481,2 (265,1-871,5)	*
Zhou et al. (23)	Ferritina (µg/L)	191	Decesso	1435,3 (728,9-2000)	503,2 (264-921,5)	<0,0001
Qin et al. (38)	Ferritina (µg/L)	452	Ricovero in cure intensive	800,4 (452,9-1451,6)	523,7 (299,1-840,4)	<0,001
Inciardi et al. (52)	Ferritina (µg/L)	99	Decesso	1683 (684,5-2988)	1371 (753-2359)	0,51 (NS)
Chen et al. (5)	hsPCR (mg/L)	274	Decesso	113,0 (69,1-168,4)	26,2 (8,7-55,8)	*
Shi et al. (24)	PCR (mg/L)	191	Interessamento cardiaco	102 (64-170)	37 (10-73)	<0,001
Guo et al. (25)	hsPCR (mg/L)	187	Interessamento cardiaco	85,5 (48,7-151,7)	31,3 (12,4-57,5)	<0,001
Deng et al. (31)	PCR (mg/L)	112	Severità del quadro clinico	132,6 (65,2-200)	15,1 (5,0-83,4)	<0,01
Ruan et al. (37)	PCR (mg/L)	150	Decesso	126,0 (106,3)	34,1 (54,5)	<0,001
Qin et al. (38)	PCR (mg/L)	452	Ricovero in cure intensive	57,9 (20,9-103,2)	33,2 (8,2-59,7)	<0,001
Inciardi et al. (52)	PCR (mg/L)	99	Decesso			
Wei et al. (94)	PCR (mg/L)	101	Interessamento cardiaco	23,7 (4,6-67,9)	9,3 (2,2-24,0)	0,05
Liang et al. (97)	PCR (mg/L)	1590	Severità del quadro clinico	84,5±76,3	30,6±43,8	*

NS, non statisticamente significativo

* confronto statistico non riportato

I dati sono riportati come mediana (intervallo interquartile) o media±1 deviazione standard o frequenza assoluta (frequenza percentuale)
 Il lavoro di Ruan et al. (37) riporta l'ampiezza dell'intervallo interquartile, e non i suoi limiti.

Attività protrombotica

L'infezione virale induce uno stato protrombotico, che trova riscontro nei dati di laboratorio di numerosi lavori. Non è chiaro l'esatto meccanismo che lo sostiene, anche se è noto che infezioni virali possono influenzare la coagulazione (44). In tutte le casistiche che riportano dati di parametri coagulativi al momento del ricovero (3, 5, 23, 25, 31, 40), i valori di D-dimero erano significativamente aumentati nei quadri clinici più severi, come sintetizzato in Tabella^c 3. Va sottolineato ancora una volta che la presentazione dei dati di laboratorio nella letteratura consultata contiene diverse inesattezze che generano difficoltà interpretative; quelle relative ai dati del D-dimero sono particolarmente rilevanti e riguardano specificamente le unità di misura per l'espressione dei risultati. L'importanza di questa disomogeneità è stata segnalata in un importante contributo (45), all'interno del quale viene fatto un pressante richiamo alla necessità di procedere rapidamente nel cammino di armonizzazione già intrapreso. Il rialzo del D-dimero nei casi più gravi costituisce peraltro un risultato di rilevanza clinica, se nello studio di Zhou et al. (23) ad una analisi logistica multivariata sul rischio di morte, un D dimero >1 mg/L rappresentava uno dei soli tre predittori, oltre ad età e punteggio di danno multiorgano (SOFA score).

I dati che riguardano altri parametri coagulativi sono meno omogenei. I valori del tempo di protrombina (PT) (espresso in secondi) erano più prolungati nella maggior parte degli studi nei pazienti più gravi (Tabella 3); l'entità della differenza, nonostante la significatività statistica, era modesta. Le Linee Guida dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (46) sostengono che differenze così modeste non si potrebbero cogliere usando l'International Normalized Ratio (INR) invece del tempo; anche nella forma non standardizzata, tuttavia, le variazioni sembrano troppo modeste per rivestire rilevanza clinica. I valori di tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) presentano una modesta e generalmente non significativa tendenza alla riduzione nei casi più gravi (Tabella 3). La conta piastrinica risulta significativamente ridotta nei casi più gravi nella maggior parte dei lavori, restando però sostanzialmente in un ambito di normalità. Due meta-analisi valutano la relazione tra variazioni della conta piastrinica ed andamento clinico in COVID-19 (47, 48); in entrambe la conta piastrinica risultava significativamente ridotta nei casi più gravi e nei pazienti deceduti. La meta-analisi più recente (48), considerando gli studi che riportavano la proporzione di pazienti con trombocitopenia, stimava un odds ratio di evoluzione in forma severa pari a 3,46

(95%IC 1,72-6,94) ed un odds ratio di mortalità pari a 11,75 (95%IC 3,51-39,31); non è tuttavia riportato il criterio utilizzato per definire la trombocitopenia. La relazione tra piastrinopenia e mortalità è analizzata in un lavoro di Yang et al. (49) su 1476 pazienti: la mortalità risultava del 4,7% nei pazienti con normale conta piastrinica, e si incrementava a 17,5% per diminuzione fino a $100 \times 10^9/L$, a 61,2% per diminuzione fino a $5 \times 10^9/L$ e a 92,1% per valori inferiori. La riduzione della conta piastrinica dimostra quindi di possedere un chiaro significato prognostico nel contesto di COVID-19.

Nel contesto del sovvertimento dei parametri della coagulazione in COVID-19, è stato segnalato in una casistica di 183 pazienti pubblicata da Tang et al. (50) che criteri per la diagnosi di coagulazione intravascolare disseminata (DIC) erano presenti nel 7,4% dei pazienti deceduti, rispetto allo 0,6% dei sopravvissuti. I pazienti che sarebbero poi deceduti presentavano già al momento del ricovero valori più alti di D-dimero e PT (Tabella 3); anche i prodotti di degradazione della fibrina risultavano significativamente più elevati (7,6 mg/L - IQR 4,0-23,4 *versus* 4,0 - IQR 4,0-4,3).

Dati i presupposti, sembrerebbe ragionevole attendersi una incidenza aumentata di trombosi arteriosa e venosa, ma le segnalazioni non sono numerose. In una casistica di 81 pazienti con manifestazioni gravi di COVID-19, l'incidenza di trombosi venose era del 25% (20/81) (51). I pazienti con trombosi venosa presentavano valori più elevati di D-dimero ($5,2 \pm 3,0$ *versus* $0,8 \pm 1,2$ mg/L; $p < 0,001$). Alcuni lavori segnalano casi documentati di embolia polmonare in pazienti con COVID-19 (16, 17,52,53). La paziente descritta da Ullah et al. (17) era già in terapia con enoxaparina a dose profilattica, quando sviluppò embolia polmonare a sella con scompenso destro. Nel lavoro di Inciardi et al. (52) sono riportati 12 casi di tromboembolia venosa (pari al 12% della casistica) e 3 casi di tromboembolia arteriosa, questi ultimi tutti in pazienti con cardiopatia preesistente. In una casistica olandese di 184 pazienti ricoverati in cure intensive per COVID-19 (53), nonostante terapia profilattica antitrombotica, venivano segnalati 25 casi di embolia polmonare, un caso di trombosi venosa profonda all'arto inferiore, due casi di trombosi del catetere e tre casi di ictus ischemico. Nella casistica italiana di Lodigiani et al. (54) su 388 pazienti con diagnosi di COVID-19 venivano segnalati 10 casi di embolia polmonare e 16 tromboembolie venose, 9 ictus ischemici (uno in un paziente con embolia polmonare), 4 casi di sindrome coronarica acuta. Otto pazienti (pari al 2,1%) rispondevano ai criteri diagnostici per DIC; in 4 pazienti coesisteva una patologia neoplastica.

^c In questa tabella non sono stati inclusi i risultati per il D dimero di Wang et al. (44), in quanto, nonostante venisse indicata la medesima unità di misura (mg/L), il lavoro riportava valori di oltre 100 volte superiori a studi simili, sia per i casi più gravi [414 mg/L - intervallo interquartile (IQR) 191-1324] che per i soggetti con minore gravità clinica (166 mg/L - IQR 101-285; $p < 0,001$); tale risultato, in assenza di riferimenti sul metodo usato per la determinazione, diviene non interpretabile, e per tale motivo è stato escluso.

Tabella 3
Parametri coagulativi

Autore (riferimento)	Biomarcatore (unità di misura)	Numerosità	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Huang et al. (3)	D-dimero (mg/L)	41	Ricovero in cure intensive	2,4 (0,6-14,4)	0,5 (0,3-0,8)	0,042
Chen et al. (5)	D-dimero (mg/L)	274	Decesso	4,6 (1,3-21,0)	0,6 (0,3-1,3)	*
Zhou et al. (23)	D-dimero (mg/L)	191	Decesso	5,2 (1,5- 21,1)	0,6 (0,3-1,0)	<0,0001
Guo et al. (25)	D-dimero (mg/L)	187	Interessamento cardiaco	3,85 (0,51-25,58)	0,29 (0,17-0,60)	<0,001
Deng et al. (31)	D-dimero (mg/L)	112	Severità del quadro clinico	11,9 (3,8-52,4)	0,7 (0,4-1,7)	<0,01
Tang et al. (50)	D-dimero (mg/L)	183	Decesso	2,12 (0,77-5,27)	0,61 (0,35-1,29)	<0,001
Inciardi et al. (52)	D-dimero (mg/L)	99	Decesso	0,8 (0,5-2,0)	0,5 (0,3-0,9)	0,15 (NS)
Liang et al. (97)	D-dimero (mg/L)	1590	Severità del quadro clinico	19,1±70,1	26,3±144,8	*
Wang et al. (98) Training cohort	D-dimero (mg/L)	296	Decesso	0,5 (0,4-1,4)	0,2 (0,1-0,3)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	D-dimero (mg/L)	44	Decesso	1,1 (0,9-1,6)	0,6 (0,3-1,1)	0,025
Huang et al. (3)	PT (secondi)	41	Ricovero in cure intensive	12,2 (11,2-13,4)	10,7 (9,8-12,1)	0,012
Wang et al. (4)	PT (secondi)	138	Ricovero in cure intensive	13,2 (12,3-14,5)	12,9 (12,3-13,4)	0,37 (NS)
Chen et al. (5)	PT (secondi)	274	Decesso	15,5 (14,4-17,3)	13,9 (13,2-14,4)	*
Guo et al. (25)	PT (secondi)	187	Interessamento cardiaco	13,3 (12,2-15,3)	12,4 (12,0-13,0)	0,005
Tang et al. (50)	PT (secondi)	183	Decesso	15,5 (14,4-16,3)	13,6 (13,0-14,3)	<0,001
Wei et al. (94)	PT (secondi)	101	Interessamento cardiaco	13 (12,6-13,6)	13 (12,6-13,7)	0,96 (NS)
Liang et al. (97)	PT (secondi)	1590	Severità del quadro clinico	15,9±24,1	17,6±50,5	*
Wang et al. (98) Training cohort	PT (secondi)	296	Interessamento cardiaco	13,7±1,9	13,3±1,9	0,37 (NS)
Wang et al. (98) Validation cohort	PT (secondi)	44	Interessamento cardiaco	14,1±1,2	13,2±0,8	0,007
Huang et al. (3)	aPTT (secondi)	41	Ricovero in cure intensive	26,6 (22,5-33,9)	27,7 (24,8-34,1)	0,57 (NS)
Wang et al. (4)	aPTT (secondi)	138	Ricovero in cure intensive	30,4 (28,0-34,5)	31,7 (29,6-33,5)	0,09 (NS)
Chen et al. (5)	aPTT (secondi)	274	Decesso	40,6 (35,6-46,9)	41,0 (36,9-44,0)	*
Guo et al. (25)	aPTT (secondi)	187	Interessamento cardiaco	31,2 (27,5-33,2)	32,7 (31,0-35,8)	0,003
Tang et al. (50)	aPTT (secondi)	183	Decesso	44,8 (40,2-51,0)	41,2 (36,9-44,0)	0,09 (NS)

Tabella 3
Continua

Autore (riferimento)	Biomarcatore (unità di misura)	Numerosità	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Wei et al. (94)	aPTT (secondi)	101	Interessamento cardiaco	29,6 (27,3-32,7)	28,4 (26,2-31,3)	0,46 (NS)
Liang et al. (97)	aPTT (secondi)	1590	Severità del quadro clinico	34,8±50,9	43,3±150,6	*
Wang et al. (98) Training cohort	aPTT (secondi)	296	Decesso	29,3±03,0	30,8±4,1	0,107 (NS)
Wang et al. (98) Validation cohort	aPTT (secondi)	44	Decesso	39,3±6,6	38,8±4,3	0,74 (NS)
Huang et al. (3)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	41	Ricovero in cure intensive	196 (165-263)	149 (131-263)	0,45 (NS)
Wang et al. (4)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	138	Ricovero in cure intensive	142 (119-202)	165 (125-188)	0,78 (NS)
Chen et al. (5)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	274	Decesso	156 (118,8-219,3)	198 (160,0-256,0)	*
Zhou et al. (23)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	191	Decesso	165,5 (107-229)	220,0 (168-271)	<0,0001
Shi et al. (24)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	416	Interessamento cardiaco	172 (111-215)	216 (165-273)	<0,001
Ruan et al. (37)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	150	Decesso	173,6 (67,7)	222,1 (78,0)	<0,001
Liang et al. (97)	Piastrine (x10 ⁹ /L)	1590	Severità del quadro clinico	173,4±73,7	180,1±70,4	*
Tang et al. (50)	Fibrinogeno (g/L)	183	Decesso	5,16 (3,74-5,69)	4,51 (3,65-5,09)	0,149 (NS)
Wang et al. (98) Training cohort	Fibrinogeno (g/L)	296	Decesso	4,2±1,5	3,9±1,0	0,099 (NS)

NS, non statisticamente significativo

* confronto statistico non riportato

I dati sono riportati come media±1 deviazione standard o mediana (intervallo interquartile)

Il lavoro di Ruan et al. (37) riporta l'ampiezza dell'intervallo range interquartile, e non i suoi limiti.

È possibile che il numero di eventi tromboembolici sia sottostimato in modo importante per la limitazione delle procedure diagnostiche imposte dalla fase iniziale dell'epidemia. Tuttavia, le segnalazioni sono già abbastanza frequenti da suggerire l'opportunità di una profilassi antitrombotica nei pazienti COVID-19; la terapia antitrombotica è suggerita (55) per pazienti con insufficienza respiratoria, con comorbidità, allettati o in cure intensive. Pur con scarsi supporti scientifici, una Consensus cinese ha raccomandato l'anticoagulazione parenterale a dosi terapeutiche come terapia routinaria in pazienti COVID-19 (56), nel presupposto che possa prevenire la trombosi microvascolare. In uno studio cinese su 449 pazienti con una forma severa di COVID-19, 99 pazienti venivano trattati, su base non randomizzata, con eparina a dosaggio terapeutico (57). La mortalità a 28 giorni non differiva tra trattati e non

trattati (30,3% versus 29,7%; p=0,91, NS). Quando però i pazienti venivano stratificati secondo il punteggio "sepsis induced coagulopathy" (SIC), proposto dalla ISTH (58), nei pazienti con punteggio SIC ≥4, la mortalità risultava significativamente più bassa nei non trattati (40% versus 64,2%; p=0,029). Il punteggio SIC è costituito da prolungamento del PT-INR, da riduzione della conta piastrinica, e da SOFA score. Sarebbe quindi che nei pazienti più gravi possa esserci un ruolo per la terapia anticoagulante, pur in presenza di parametri di laboratorio che potrebbero far temere il rischio emorragico, ma ovviamente servono studi mirati e randomizzati per stabilirlo.

Tuttavia, anche questi risultati possono confermare un ruolo della coagulopatia nel quadro clinico di COVID-19; rimane da chiarire se si tratti di una situazione comune a gravi infezioni virali, o se esista una specificità di azione del SARS-CoV-2.

Il ruolo dell'ACE2

Un'altra ipotesi che mira a spiegare l'interessamento miocardico in corso di COVID-19 chiama in causa l'ACE2. ACE2 è l'enzima che degrada l'angiotensina II in angiotensina 1-7; mentre l'angiotensina II è un vasocostrittore, ad attività proinfiammatoria e profibrotica, l'angiotensina 1-7 è un moderato vasodilatatore, con proprietà antiproliferative e antiapoptotiche. Inoltre l'angiotensina 1-7 limita nel soggetto sano la sintesi di citochine proinfiammatorie. La produzione di angiotensina 1-7 ad opera dell'ACE2 viene interpretata come un meccanismo di attenuazione dell'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). Nei modelli animali, l'ACE2 è un regolatore della funzione miocardica, ed i topi "knockout" per ACE2 presentano una severa disfunzione ventricolare (59). È stato dimostrato che il legame con il recettore dell'ACE2, ampiamente espresso a livello cardiaco e polmonare, viene utilizzato dai Coronavirus per entrare nelle cellule bersaglio (60). Il SARS-CoV-2 effettua una "downregulation" dell'ACE2, con conseguente riduzione dei livelli di angiotensina 1-7. Questa variazione può amplificare la "tempesta" di citochine, e la conseguente risposta infiammatoria (61). È stato anche segnalato che i livelli di angiotensina II sono significativamente aumentati nei pazienti COVID-19, con una relazione lineare con il carico virale (62). Anche la conseguente ulteriore attivazione del RAAS può causare disfunzione endoteliale e danno a carico di numerosi organi, innanzitutto cuore, rene e polmone.

L'ACE2 è scarsamente espresso nei miociti (63) mentre è intensamente espresso nei periciti, cellule murali perivascolari. I periciti sono localizzati prevalentemente all'esterno dell'endotelio dei capillari e di parte delle venule; per l'alta espressione di ACE2 potrebbero costituire un bersaglio del virus, contribuendo alla disfunzione microvascolare. Il gene per l'ACE2 è localizzato sul cromosoma X, e questa osservazione potrebbe rendere ragione della minor incidenza di COVID-19 nelle donne.

L'ACE2 può svolgere due ruoli contrapposti nei pazienti con COVID-19: da un lato protezione nei confronti di ipertensione arteriosa, ipertrofia miocardica, aterosclerosi, ritenzione idro-salina, dall'altra possibilità agire come porta d'ingresso dell'infezione, favorendo il manifestarsi delle forme più gravi della patologia. Il significato clinico di questi opposti meccanismi nei confronti delle complicanze di COVID-19 resta ancora ampiamente da chiarire.

Gli ACE-inibitori e gli inibitori recettoriali dell'angiotensina (ARB), farmaci estensivamente usati nella terapia dell'ipertensione arteriosa, dello scompenso cardiaco, del post-infarto, possono potenziare l'ACE2 (64,65), anche se con gli ACE-inibitori non risulta aumentata l'attività dell'ACE2 miocardica (64). Le osservazioni sul meccanismo dell'ACE2 hanno portato alcuni Autori a sollevare dubbi sulla sicurezza dell'uso di questi farmaci in corso di pandemia da COVID-19 (66).

Recenti studi hanno tuttavia smentito l'ipotesi di un peggior andamento nei pazienti in terapia con ACE-inibitori o ARB. Nella casistica di 362 pazienti con ipertensione arteriosa e diagnosi confermata di COVID-19 pubblicata da Li et al. (67), non si riscontravano differenze nella severità del quadro e nella mortalità tra pazienti trattati con ACE-inibitori o ARB e il rimanente della casistica. In una ampia casistica di pazienti ipertesi con diagnosi confermata di COVID 19, pubblicata da Zhang et al. (68), dopo aggiustamento della casistica con "propensity score", la mortalità risultava significativamente più bassa nei pazienti trattati con ACE-inibitori o ARB (3,7% *versus* 9,8%; $p=0,01$).

Anche nella casistica internazionale di 8910 pazienti pubblicata da Mehra et al. (69), il rischio di morte intraospedaliera non risultava aumentato con l'uso di ACE-inibitori (2,1% *versus* 6,1%; odds ratio 0,33; 95%IC 0,20-0,54) né con l'uso di ARB (6,8% *versus* 5,7%; odds ratio 1,23; 95%IC 0,87-1,74). Nella ampia casistica italiana di Mancina et al. (70) i pazienti in terapia con ACE-inibitori o ARB non presentavano incidenza aumentata di COVID-19 all'analisi multivariata, rispetto ai pazienti che non li assumevano (rispettivamente odds ratio 0,96; 95%IC 0,86-1,05 e odds ratio 0,96; 95%IC 0,87-1,07), né decorso severo o fatale della patologia (rispettivamente odds ratio 0,91; 95%IC 0,69-1,21 e odds ratio 0,83; 95%IC 0,63-1,10). In un'ampia casistica cinese di pazienti con COVID-19 ed ipertensione arteriosa (68) l'uso di ACE-inibitori o ARB risultava associato ad un rischio ridotto di morte (hazard ratio aggiustato per età, sesso e comorbidità 0,37; 95%IC 0,15-0,89; $p=0,03$). Gli studi sugli effetti di ACE-inibitori e ARB in COVID-19 sembrano quindi addirittura suggerire un potenziale meccanismo protettivo. Va tuttavia puntualizzato che si tratta di studi non randomizzati, ma su *clinicaltrials.gov*, il database americano degli studi clinici, risultano al momento attuale 31 studi in corso sull'argomento, e 4 su *clinicaltrialsregister.eu*, il database europeo. Al momento le informazioni disponibili appaiono sufficienti per confermare la prosecuzione della terapia per i pazienti che la stanno già assumendo, come già le Società Scientifiche avevano raccomandato (71), ma l'esito di questi studi potrebbe attribuire anche un ruolo più diretto a questi farmaci nel trattamento di COVID-19.

Effetto dell'infezione respiratoria sul cuore

Vi sono osservazioni che orientano all'interpretazione del coinvolgimento cardiaco in corso di COVID-19, non come un problema diretto, ma come secondario alla grave infezione respiratoria e alla ARDS: è possibile che i segni di interessamento cardiaco in una significativa percentuale di pazienti con COVID-19 siano prevalentemente la risultante di una infezione polmonare grave, con aumento della domanda miocardica di ossigeno e contemporanea riduzione della sua disponibilità. È stato infatti stimato che le infezioni virali possano aumentare il lavoro cardiaco da 4 a 8 volte (72). Il problema era noto anche prima della pandemia da

SARS-CoV-2: in un'ampia serie di pazienti con polmonite batterica acquisita in comunità ricoverati in cure intensive (73), di cui il 23,3% con cardiopatia preesistente, il 4,8% si complicava con infarto miocardico, il 7,8% con sindrome coronarica acuta, l'8,6% con scompenso congestizio e l'11,8% con arresto cardiaco. Nei pazienti con sindrome di tipo influenzale, per ogni aumento del 5% dell'incidenza mensile, il tasso di ospedalizzazione per scompenso cardiaco aumenta del 24% (74). Anche il rischio di morte per infarto del miocardio, confermato all'autopsia, aumenta con un odds ratio di 1,30 in presenza di malattia respiratoria in corso di epidemia influenzale (75).

Lo squilibrio tra domanda ed apporto di ossigeno può portare ad una sindrome coronarica di tipo 2 (76), una condizione che prevale nelle infezioni acute, specie quelle che interessano i polmoni, e che presenta una mortalità più elevata di quella dell'infarto classico (sindrome coronarica di tipo 1).

Nella maggior parte degli studi sulla COVID-19, la definizione di interessamento cardiaco è basata sul rilievo di innalzamento dei valori di troponine cardiache. Tuttavia, in uno studio (77) che focalizzava l'attenzione su pazienti con forma polmonare severa, individuando poi come molto severe le forme che richiedevano ventilazione meccanica o presentavano un quadro di shock o di deficit multiorgano, i casi molto gravi presentavano valori significativamente più elevati di troponina I (46,8 ng/L; IQR 34,2-299,8 *versus* 4,8; IQR 2,5-8,4; $p < 0,001$) e tendenzialmente più elevati di CK-MB (13 U/L; IQR 10-25 *versus* 10; IQR 17-13). Questa osservazione sembrerebbe collegare il movimento dei biomarcatori cardiaci più alla gravità del quadro respiratorio critico che ad un problema primitivamente cardiologico. È tuttavia difficile interpretarlo come unico meccanismo di danno cardiaco; è più probabile che l'interessamento cardiaco nel quadro di COVID-19 sia la risultante della somma e dell'interazione di diversi meccanismi di aggressione.

I meccanismi sono gli stessi in pazienti con cardiopatia preesistente?

La larga maggioranza delle casistiche di pazienti con COVID-19 considerate, segnala una frequenza significativamente più elevata di cardiopatia tra i pazienti ad evoluzione più grave o sfavorevole (Tabella 4). I dati relativi alle comorbidità pubblicati risentono però in genere del mancato aggiustamento per covariate importanti come età, sesso, obesità, diabete o abitudine al fumo.

Gli studi pubblicati sono poi tutti condotti su pazienti ospedalizzati, con una quota rilevante di pazienti in terapia intensiva, rappresentando un estremo dello spettro di COVID-19, che potrebbe non essere rappresentativo della distribuzione nei casi meno gravi, tali da non richiedere ricovero ospedaliero.

Inoltre, nei dati cinesi, che sono i più numerosi, il rischio di sottostima di patologie croniche (78) e del dato anamnestico è consistente. Si veda ad esempio il fumo:

nei dati di Chen et al (5) i fumatori sono il 7%, mentre la prevalenza nei cinesi di sesso maschile è documentata essere oltre il 60% (79).

Solo più di recente sono state pubblicate casistiche raccolte in altro ambito territoriale. Uno studio condotto in un ospedale del Midwest degli USA (80) definiva come variabile di risposta l'insieme di necessità di ventilazione meccanica o di supporto inotropo, ricovero in cure intensive o morte. Considerando la limitata numerosità della casistica, la maggior prevalenza, tra quelli ad evoluzione sfavorevole, di pazienti con cardiopatia ischemica (25% *versus* 13%) o scompenso congestizio (38% *versus* 13%) non raggiungeva la significatività statistica. Una casistica di 333 casi raccolti a Shanghai (81) confermavano l'influenza della cardiopatia preesistente (Tabella 4). I dati di Myers et al. (82) non confermano la prognosi peggiore nei pazienti con cardiopatia, ma presentano i dati relativi allo scompenso cardiaco come unica variabile di risposta. La stima ponderata del rischio relativo di evoluzione sfavorevole per i pazienti con cardiopatia preesistente, ottenuta con la routine METAN di Stata (19) è 2,833 ($p < 0,001$ - modello a effetti random per significativa eterogeneità - $I^2 = 87,3\%$). Nonostante la grande variabilità dei dati dei singoli studi, emerge un rischio quasi triplicato per i pazienti cardiopatici che contraggano una forma grave di COVID-19. Data l'alta incidenza di casi di COVID-19 paucisintomatici o asintomatici nella popolazione, che non consente di stimare in modo affidabile il numero dei contagiati, non è possibile stimare se la cardiopatia preesistente aumenti il rischio di infezione in generale, o se individui una popolazione a rischio di forme gravi della malattia.

La proporzione di pazienti con cardiopatia, stimata dagli studi precedentemente citati e da altri che riportano la frequenza a prescindere dalla gravità del quadro (70,83-86), usando la procedura METAPROP di Stata 14 (19), è 11%, stimata con modello ad effetti random, per la grande eterogeneità della casistica ($p < 0,01$ - $I^2 = 98,98\%$): le proporzioni variano infatti dal 2% al 44%. Le frequenze riportate devono essere interpretate con cautela; spesso sono relative ai pazienti con cardiopatia ischemica, ma non ai pazienti con altri tipi di cardiopatia, solo pochi studi riportano la frequenza di scompenso cardiaco, solo Mehra et al. (69) includono la frequenza di patologia aritmica. In ogni caso, la frequenza non è troppo diversa dai dati di popolazione cinesi (87) ed americani (88), il che orienterebbe a ritenere che la preesistenza di cardiopatia non condizioni la probabilità di una forma di COVID-19 tale da richiedere ricovero, ma possa poi influire sulla prognosi, almeno considerandola indipendentemente da altri potenziali fattori di rischio.

Tabella 4
Patologie concomitanti

Autore (riferimento)	Patologia	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Huang et al. (3)	Malattie cardiovascolari	Ricovero in cure intensive	3 (23%)	3 (11%)	0,32 (NS)
Wang et al. (4)	Malattie cardiovascolari	Ricovero in cure intensive	9 (25%)	11 (10,8%)	0,04
Chen et al. (5)	Malattie cardiovascolari	Decesso	16 (14%)	7 (4%)	*
Ruan et al. (37)	Malattie cardiovascolari	Decesso	13 (19%)	0 (0%)	<0,001
Qin et al. (38)	Malattie cardiovascolari	Ricovero in cure intensive	24 (8,4%)	3 (1,8%)	0,004
Yu et al. (81)	Malattie cardiovascolari	Severità del quadro clinico	8 (30,8)	16 (5,2%)	<0,001
Liang et al. (97)	Malattie cardiovascolari	Severità del quadro clinico	13 (9,9)	46 (3,2)	*
Zhou et al. (23)	Coronaropatia	Decesso	13 (24%)	2 (1,0%)	<0,0001
Shi et al. (24)	Coronaropatia	Interessamento cardiaco	24 (29,3%)	20 (6,0%)	<0,001
Guo et al. (25)	Coronaropatia	Interessamento cardiaco	17 (32,7%)	4 (3,0)	<0,001
Deng et al. (31)	Coronaropatia	Severità del quadro clinico	11 (16,4%)	4 (8,9%)	0,25 (NS)
Mehra et al. (69)	Coronaropatia	Decesso	103 (20%)	907 (10,8%)	*
Aggarwal et al. (80)	Coronaropatia	Ricovero in cure intensive o decesso	2 (25%)	1 (13%)	1,0 (NS)
Wei et al. (94)	Coronaropatia	Interessamento cardiaco	3 (18,8%)	2 (2,4%)	0,006
Wang et al. (98) Training cohort	Coronaropatia	Decesso	5 (26,3%)	5 (1,8%)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	Coronaropatia	Decesso	3 (21,4%)	0	0,009
Guan et al. (99)	Coronaropatia	Severità del quadro clinico	10 (5,8%)	17 (1,8%)	*
Chen et al. (5)	Scopenso cardiaco	Decesso	1 (1%)	0 (0%)	*
Shi et al. (24)	Scopenso cardiaco	Interessamento cardiaco	12 (14,6%)	5 (1,5%)	<0,001
Mehra et al. (69)	Scopenso cardiaco	Decesso	29 (5,6%)	160 (1,9%)	*
Aggarwal et al. (80)	Scopenso cardiaco	Ricovero in cure intensive o decesso	3 (38%)	1 (13%)	0,56 (NS)
Myers et al. (82)	Scopenso cardiaco	Ricovero in cure intensive	4 (3,5%)	18 (6,8%)	*
Mehra et al. (69)	Aritmie	Decesso	35 (6,8%)	269 (3,2)	*
Wang et al. (4)	Malattie cerebrovascolari	Ricovero in cure intensive	6 (16,7%)	1 (1,0%)	0,001
Chen et al. (5)	Malattie cerebrovascolari	Decesso	4 (4%)	0 (0%)	*
Qin et al. (8)	Malattie cerebrovascolari	Ricovero in cure intensive	8 (2,8%)	3 (1,8%)	0,753 (NS)
Aggarwal et al. (80)	Malattie cerebrovascolari	Ricovero in cure intensive o decesso	1 (13%)	1 (13%)	1,0 (NS)
Wei et al. (94)	Malattie cerebrovascolari	Interessamento cardiaco	3 (18,8%)	3 (3,5%)	0,018
Liang et al. (97)	Malattie cerebrovascolari	Severità del quadro clinico	10 (7,6%)	20 (1,4%)	*
Wang et al. (98) Training cohort	Malattie cerebrovascolari	Decesso	3 (15,8%)	4 (1,4%)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	Malattie cerebrovascolari	Decesso	1 (7,1%)	1 (3,3%)	0,57 (NS)
Guan et al. (99)	Malattie cerebrovascolari	Severità del quadro clinico	11 (1,2%)	15 (1,4%)	*

NS, non statisticamente significativo

* confronto statistico non riportato

I dati sono riportati come frequenza assoluta (frequenza percentuale)

Un elemento meritevole di attenzione è il rilievo nello studio di Guo et al. (25) che la mortalità intraospedaliera nei pazienti con cardiopatia preesistente e rialzo dei valori di TnT sopra il 99° percentile era pari al 69,4%, ma quando la cardiopatia non era accompagnata da un aumento di TnT, la mortalità era del 13,3%, di poco superiore a quella dei pazienti senza anamnesi di cardiopatia e senza incremento di TnT (7,6%). Se ne può dedurre che l'interessamento cardiaco in corso di COVID-19 influenzi la prognosi più della presenza anamnestica di cardiopatia.

Il rischio significativamente aumentato di maggiore gravità del COVID-19 nei pazienti con cardiopatia preesistente, potrebbe essere semplicemente interpretato come una destabilizzazione della cardiopatia esistente ad opera di una grave infezione che determina uno sbilanciamento tra l'aumento della domanda metabolica indotta dall'infezione e la ridotta riserva cardiaca. Pazienti con cardiopatia ischemica e scompenso cardiaco possono risultare particolarmente a rischio per la possibilità di rottura di placca per la flogosi sistemica (89,90). La reazione infiammatoria nella sede primaria di infezione, il polmone, produce citochine (interleuchine-1 e -6, e TNF), mediatori che entrano in circolo, e possono stimolare i macrofagi nella placca aterosclerotica a produrre a loro volta citochine localmente, rendendo la lesione più trombogena (91).

L'esperienza con altre forme virali, con il virus dell'influenza ed altri Coronavirus, ha dimostrato che le infezioni virali possono scatenare sindromi coronariche (92). Gli effetti procoagulanti dell'infiammazione possono poi contribuire al rischio di trombosi di stent. Nella casistica di Guo et al. (25), inoltre, la frequenza di aritmie maggiori (tachicardia ventricolare e fibrillazione ventricolare) era significativamente più elevata nei pazienti con interessamento miocardico [9 (17,3%) *versus* 2 (1,5%); $p < 0,001$], un altro elemento clinico che potrebbe contribuire all'aumentata mortalità.

In sintesi, quello che è possibile dedurre da queste eterogenee casistiche è che la presenza di cardiopatia anamnestica si associa ad una peggiore evoluzione prognostica di COVID-19, e tale tendenza non appare essere giustificata soltanto dall'età più avanzata dei pazienti con cardiopatia, anche se sono pochi gli studi che supportano tale interpretazione.

Le implicazioni pratiche di questa osservazione sono una cautela estrema nella prevenzione del rischio di infezione nei cardiopatici, soprattutto quando si associ l'età avanzata, fattore di rischio comune a tutte le casistiche.

Il ruolo dell'ipertensione arteriosa

In numerosi studi emergeva con costanza un rilievo che riceverà molta attenzione da parte della stampa divulgativa: nei pazienti con quadri più gravi di COVID 19, la mortalità più alta, e l'interessamento miocardico, erano più frequenti nei pazienti con ipertensione arteriosa (Tabella 5). Le casistiche con più alta frequenza di ipertensione sono caratterizzate anche da

una età significativamente più elevata, da una frequenza più elevata di cardiopatia preesistente e diabete, per cui resta da chiarire se l'ipertensione arteriosa sia un fattore di rischio per sé, o non costituisca un fattore di confondimento.

Analizzando gli studi che riportano la prevalenza di ipertensione arteriosa in relazione all'evoluzione prognostica (Tabella 5), il rischio relativo stimato di evoluzione sfavorevole per i pazienti con ipertensione arteriosa è risultato 1,957 ($p < 0,001$ – modello a effetti random per significativa eterogeneità - $I^2 = 86,1\%$). Il valore risulta molto più alto nella popolazione cinese, pari a 2,27, valore ottenuto escludendo gli ultimi studi, che includono popolazioni di altre etnie (80, 82, 83).

La prevalenza di ipertesi tra i pazienti degli studi considerati è stimata con METAPROP pari al 28% ($p < 0,001$ – $I^2 = 98,93$) con valori individuali che variano dal 9% al 56%. Considerando solo gli studi condotti in Cina, eliminando dal conteggio gli altri (69,80, 82,83) si ottiene una prevalenza di pazienti ipertesi del 24%, non molto dissimile da quella riportata dal Center for Disease Control cinese, pari al 23,2% (93). Non è chiara la motivazione di una apparente maggior rilevanza dell'ipertensione come comorbidità favorente un'evoluzione più grave nei pazienti cinesi; una differenza che colpisce è il riscontro che in uno studio (62) solo 16,7% dei pazienti ipertesi risultava in terapia con ACE-inibitori o ARB. Un trattamento meno cardioprotettivo potrebbe aver aumentato la vulnerabilità di questi pazienti.

Nella casistica di Wei et al. (94) la presenza di ipertensione arteriosa rappresentava uno dei predittori indipendenti, all'analisi logistica univariata, della progressione a forma severa, insieme all'età, alla disfunzione renale e ai marcatori di interessamento miocardico. L'assenza di una analisi multivariata non consente però di affermare con certezza l'indipendenza dell'ipertensione arteriosa da altre covariate, quali ad esempio età e diabete. Lo studio di Grasselli et al (95) riporta la prevalenza di ipertensione arteriosa secondo le classi di età in 1591 pazienti con COVID-19 ricoverati in reparti di cure intensive; l'età mediana dei pazienti ipertesi era significativamente più alta di quella dei pazienti normotesi (66 anni; – IQR 60-72 *versus* 62; IQR 54-68; $p < 0,001$). La Figura 2 evidenzia come vi sia una progressione marcata della frequenza di ipertensione arteriosa al crescere dell'età. In effetti, nei dati dell'Istituto Superiore di Sanità (96) l'età mediana dei pazienti italiani deceduti per COVID-19 (81 anni; IQR 74-87) era notevolmente più alta che nelle casistiche cinesi. Occorre quindi distinguere il ruolo relativo di età ed ipertensione nell'influenzare l'andamento clinico. Nella recente casistica di Inciardi et al. (52) vi era una differenza significativa nella prevalenza di ipertensione tra pazienti cardiopatici e non, a significare come non sia semplice discriminare l'effetto della singola variabile.

Tabella 5
Ipertensione arteriosa

Autore (riferimento)	Casistica totale	Criterio gravità	Casi gravi	Casi meno gravi	P
Huang et al. (3)	6 (15%)	Ricovero in cure intensive	2 (15%)	4 (14%)	0,93 (NS)
Wang et al. (4)	43 (31,2%)	Ricovero in cure intensive	21 (58,3%)	22 (21,6%)	<0,001
Chen et al. (5)	93 (34%)	Decesso	54 (48%)	39 (24%)	*
Zhou et al. (23)	58 (30%)	Decesso	26 (48%)	32 (23%)	0,0008
Shi et al. (24)	127 (30,5%)	Interessamento cardiaco	49 (59,8%)	78 (23,4%)	<0,001
Guo et al. (25)	61 (32,6%)	Interessamento cardiaco	33 (63,5%)	28 (20,7%)	<0,001
Deng et al. (31)	36 (32,1%)	Severità del quadro clinico	24 (35,8%)	12 (26,7%)	0,31 (NS)
Ruan et al. (37)	52 (34,7%)	Decesso	29 (43%)	23 (28%)	0,07 (NS)
Qin et al. (38)	135 (29,5%)	Ricovero in cure intensive	105 (36,7%)	30 (18,1%)	<0,001
Mehra et al. (69)	2346 (26,3%)	Decesso	130 (25,2%)	2216 (26,4%)	*
Aggarwal et al. (80)	9 (57%)	Ricovero in cure intensive o decesso	3 (38%)	6 (75%)	0,31 (NS)
Yu et al. (81)	64 (19,2%)	Severità del quadro clinico	9 (34,6%)	55 (17,9%)	0,069 (NS)
Myers et al. (82)	164 (43,5%)	Ricovero in cure intensive	58 (51,3%)	106 (40,2)	*
Wei et al. (94)	21 (21%)	Interessamento cardiaco	9 (56,3%)	12 (14,3%)	<0,001
Liang et al. (97)	269 (16,9%)	Severità quadro clinico	53 (40,5%)	216 (14,8%)	*
Wang et al. (98) Training cohort	42 (14,2%)	Decesso	9 (47,4%)	33 (11,9%)	<0,001
Wang et al. (98) Validation cohort	11 (25%)	Decesso	4 (28,6%)	7 (23,3%)	0,71 (NS)
Guan et al. (99)	165 (15%)	Severità del quadro clinico	41 (23,7%)	124 (13,4%)	*

NS, non statisticamente significativo

* confronto statistico non riportato

I dati sono riportati come frequenza assoluta (frequenza percentuale)

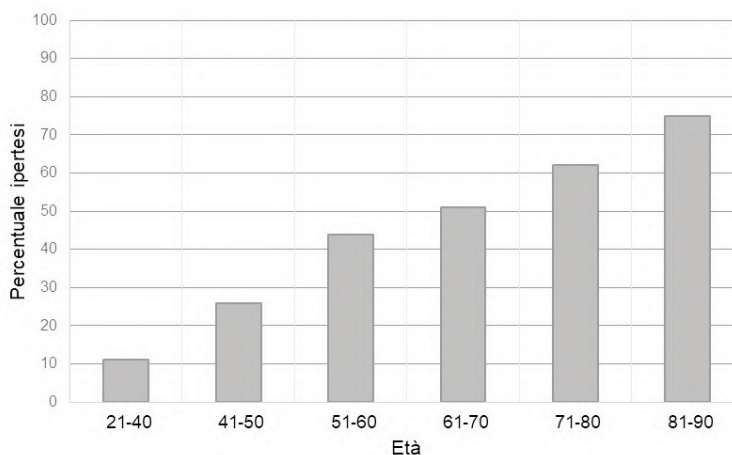


Figura 2

Prevalenza di ipertensione all'aumentare dell'età (da rif 95)

La non indipendenza delle variabili è confermata dall'analisi multivariata del rischio di gravità nello studio di Yu et al. (81): benché ad un confronto diretto i casi ad evoluzione più grave presentassero una prevalenza tendenzialmente superiore di ipertensione (34,6% versus 17,9%; $p=0,069$, NS), considerando simultaneamente i regressori, la classe di età ed il sesso risultavano i principali determinanti, mentre l'anamnesi di ipertensione non risultava significativa.

Anche nel recente lavoro di Liang et al. (97), nella analisi logistica multivariata sui dati di 1590 pazienti, utilizzata per costruire un punteggio di rischio per la progressione di COVID 19 verso una condizione di gravità, la presenza di ipertensione non risultava un predittore indipendente, mentre l'età rimaneva tra le variabili del modello. Ma anche in questa casistica il confronto delle frequenze di ipertensione arteriosa tra casi critici e casi non critici (40,5% versus 14,8%; $p<0,0001$) era statisticamente significativo, ad indicare che il confronto che non tenga conto della relazione con le altre covariate può risultare fuorviante.

L'impressione che questi dati forniscono è che l'ipertensione arteriosa possa essere un fattore di confondimento che sottende l'effetto di covariate più rilevanti, in primo luogo l'età.

CONCLUSIONI

Questa prima fase della pandemia da COVID-19 lascia la classe medica disarmata rispetto alla totale novità del quadro clinico. La problematica cardiologica è emersa come un dato frequente e clinicamente rilevante, ma occorrerà ricerca ed esperienza per chiarirne i meccanismi, le implicazioni prognostiche e le possibilità terapeutiche. I dati di questa rassegna sono aggiornati ai primi giorni del maggio 2020, ma la ricerca è in continua e tumultuosa evoluzione, con la necessità di aggiornare in continuo le proprie conoscenze.

Non è facile tenere il passo con l'evoluzione rapidissima della letteratura medica. Un numero rilevante di studi proviene direttamente dalla Cina, primo focolaio di COVID-19, e molti sono condotti nella città di Wuhan (2,3,4,5,23-25,36,38,77,84): non è chiaro se vi siano sovrapposizioni tra le casistiche riportate dai singoli lavori o se effettivamente si tratti di osservazioni indipendenti.

Siamo di fronte ad una pandemia i cui numeri sono difficili da valutare: abbiamo grandi incertezze sui numeratori, visto che la quasi totalità dei dati disponibili sono stati raccolti solo su pazienti ricoverati, ma i denominatori a livello della popolazione sono non noti e, presumibilmente, non conoscibili. I numeri, i tassi, le prevalenze su cui ragioniamo sono quindi asimmetrici, perché la popolazione su cui sono generati non è ben rappresentativa, e vanno interpretati con prudenza ed umiltà.

Sulla base di queste considerazioni, il messaggio di questa rassegna è quindi che al momento non è possibile né chiarire appieno il ruolo del coinvolgimento cardiaco nella evoluzione clinica di COVID-19, né

comprendere quali meccanismi siano più coinvolti nel determinare il danno. La questione si presenta alquanto complessa e probabilmente sarà necessario attendere la pubblicazione di una maggiore quantità di dati, auspicabilmente meglio strutturati di quelli prodotti nella fase acuta della pandemia, per una comprensione più solida.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Liu SL. New virus in China requires international control effort. *Nature* 2020;577:472.
2. Yang J, Zheng Y, Gou X, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020;94:91-5.
3. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506.
4. 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;323:1061-9.
5. Chen T, Wu D, Chen H, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BrMed J* 2020;368:m1091.
6. Bonetti G, Manelli F, Patroni A, et al. Laboratory predictors of deaths from coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the area of Valcamonica (Italy). *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-202-0459.
7. Metkus TS, Guallar E, Sokoll L, et al. Prevalence and prognostic association of circulating troponin in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 2017; 45:1709-17.
8. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac involvement in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* doi:10.1001/jamacardio.2020.1096.
9. Kim IC, Kim JY, Kim HA, et al. COVID-19-related myocarditis in a 21-year-old female patient. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa288.
10. Zeng JH, Liu YX, Yuan J, et al. First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis: a case report and insights. *Infection* 2020 doi:10.1007/s15010-020-01424-5.
11. Hua A, O'Gallagher K, Sado D, et al. Life-threatening cardiac tamponade complicating myo-pericarditis in COVID-19. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa253.
12. Dabbagh MF, Aurora L, D'Souza P, et al. Cardiac tamponade secondary to COVID-19. *JACC Case Rep* 2020 doi:10.1016/j.jaccas.2020.04.009.
13. Dong N, Cai J, Zhou Y, et al. End-stage Heart Failure with COVID-19: Strong Evidence of Myocardial Injury by 2019-nCoV. *JACC Heart Fail* 2020 doi:10.1016/j.jchf.2020.04.001.
14. Doyen D, Mocerri P, Ducreux D, et al. Myocarditis in a patient with COVID-19: a cause of raised troponin and ECG changes. *Lancet* 2020 doi:10.1016/S0140-6736(20)30912-0.
15. Tavazzi G, Pellegrini C, Maurelli M, et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2020 doi:10.1002/ejhf.1828.
16. Danzi GB, Loffi M, Galeazzi G, et al. Acute pulmonary embolism and COVID-19 pneumonia: a random

- association? *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa254.
17. Ullah W, Saeed R, Sarwar U, et al. COVID-19 complicated by acute pulmonary embolism and right-sided heart failure. *JACC Case Rep* doi:10.1016/j.jaccas.2020.04.008.
 18. Azarkish M, Laleh Far V, Eslami M, et al. Transient complete heart block in a patient with critical COVID-19. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa307.
 19. Stata/IC 14.0 – StataCorp LP – 4905 Lakeway Drive – College Station, TX 77845.
 20. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.053.
 21. Ceriotti F, Panteghini M. Armonizzazione in medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:546-7.
 22. Sciacovelli L, Aita A, Padoan A et al. Gli indicatori di qualità nel processo di armonizzazione in medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:601-8.
 23. 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; 395:1054–62.
 24. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol* 2020 doi:10.1001/jamacardio.2020.0950.
 25. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 2020 doi:10.1001/jamacardio.2020.1017.
 26. Li JW, Han TW, Woodward M, et al. The impact of 2019 novel coronavirus on heart injury: A systemic review and Meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2020 doi:10.1016/j.pcad.2020.04.008.
 27. Wan X, Wang W, Liu J et al. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. *BMC Med Res Methodol* 2014;14:135.
 28. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS et al. fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
 29. Oudit GY, Kassiri Z, Jiang C, et al. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur J Clin Invest* 2009; 39:618–25.
 30. Alhagbani T. Acute myocarditis associated with novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Ann Saudi Med* 2016;36:78–80.
 31. Deng Q, Hu B, Zhang Y, et al. Suspected myocardial injury in patients with COVID-19: Evidence from front-line clinical observation in Wuhan, China. *Int J Cardiol* 2020 doi://10.1016/j.ijcard.2020.03.087.
 32. Kociol RD, Cooper LT, Fang JC, et al. American Heart Association Heart, C. Transplantation committee of the council on clinical, recognition and initial management of fulminant myocarditis: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2020;141: e69-e92.
 33. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020;8:420-2.
 34. Sala S, Peretto G, Gramegna M, et al. Acute myocarditis presenting as a reverse Tako-Tsubo syndrome in a patient with SARS-CoV-2 respiratory infection. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa286.
 35. Yao XH, Li TY, He ZC, et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2020 doi:10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193.
 36. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395:507-13.
 37. Ruan Q, Yang K, Wang W et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020;46:846–8.
 38. 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.
 39. National Health Commission of the People's Republic of China. Chinese Clinical Guidance for COVID-19 Pneumonia Diagnosis and Treatment (7th edition). <http://kjfy.meetingchina.org/msite/news/show/cn/3337.htm> (ultimo accesso giugno 2020).
 40. Galliera E, Massacesi L, de Vecchi E, et al. Applicazioni cliniche della presepsina come biomarcatore diagnostico di infezione: rassegna e aggiornamenti. Traduzione italiana a cura di Onorato D di *Clin Chem Lab Med* 2020;58;11-7. *Biochim Clin* 2020;44:21-7.
 41. Bragato G, Mion MM, Padoan A, et al. Determinazione della presepsina: non solo diagnosi di sepsi. *Biochim Clin* 2020;44:68-72.
 42. Zaninotto M, Mion MM, Cosma C, et al. Presepsin in risk stratification of SARS-CoV-2 patients. *Clin Chim Acta* 2020 doi: 10.1016/j.cca.2020.04.020.
 43. Akhmerov A, Marban E. COVID-19 and the Heart. *Circ Res* 2020 doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317055.
 44. Subramaniam S, Scharrer I. Procoagulant activity during viral infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:1060-81.
 45. Favaloro EJ, Thachil J. Reporting of D-dimer data in COVID-19: some confusion and potential for misinformation. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0573.
 46. Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18:1023-6.
 47. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;506:145-8.
 48. Jiang SQ, Huang QF, Xie WM, et al. The association between severe COVID-19 and low platelet count: evidence from 31 observational studies involving 7613 participants. *Br J Haematol* 2020 doi:10.1111/bjh.16817.
 49. Yang X, Yang Q, Wang Y, et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020 doi:10.1111/jth.14848.
 50. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844-7.
 51. Cui S, Chen S, Li X, et al. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020 doi:10.1111/jth.14830.
 52. Inciardi RM, Adamo M, Lupi L, et al. Characteristics and outcomes of patients hospitalized for COVID-19 and cardiac disease in Northern Italy. *Eur Heart J* 2020 doi:10.1093/eurheartj/ehaa388.
 53. Klok FA, Kruij MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020 doi:10.1016/j.thromres.2020.04.013.

54. Lodigiani C, Iapichino G, Carenzo L, et al. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res* 2020 doi:10.1016/j.thromres.2020.04.024.
55. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2020 doi:10.1016/j.jacc.2020.04.031.
56. Shanghai Clinical Treatment Expert Group for COVID-19. Comprehensive treatment and management of coronavirus disease 2019: expert consensus statement from Shanghai (in cinese). *Chin J Infect Dis* 2020 doi.org/10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2020.0016.
57. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020;18:1094-9.
58. Iba T, Nisio MD, Levy JH, et al. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of a nationwide survey. *BMJ Open* 2017;7:e017046.
59. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-8.
60. Hoffmann M, Kleine-Wever H, Kruger N, et al. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry in target cells. *Cell* 2020;181:1-10.
61. Tersalvi G, Vicenzi M, Calabretta D, et al. Elevated troponin in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): possible mechanisms. *J Card Fail* 2020 doi:10.1016/j.cardfail.2020.04.009.
62. Liu Y, Yang Y, Zhang C, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* 2020;63:364-34.
63. Chen L, Li X, Chen M, et al. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res* 2020;116:1097-100.
64. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* 2005;111:2605-10.
65. Furuhashi M, Moniwa N, Mita T, et al. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in hypertensive patients may be increased by olmesartan, an angiotensin II receptor blocker. *Am J Hypertens* 2015;28:15-21.
66. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med*. 2020 doi:10.1016/S2213 2600(20)30116-8.
67. Li J, Wang X, Chen J, et al. Association of renin-angiotensin system inhibitors with severity or risk of death in patients with hypertension hospitalized for coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection in Wuhan, China. *JAMA Cardiol* 2020 doi:10.1001/jamacardio.2020.
68. Zhang P, Zhu L, Cai J, et al. Association of inpatient use of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19. *Circ Res* 2020 doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317134.
69. Mehra MR, Desai SS, Kuy S, et al. Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in Covid-19. *N Engl J Med* 2020 doi:10.1056/NEJMoa2007621.
70. Mancia G, Rea F, Ludergrani M, et al. Renin-Angiotensin-Aldosterone system blockers and the risk of Covid-19. *N Engl J Med* 2020 doi:10.1056/NEJMoa2006923.
71. [https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-\(CHT\)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang](https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-(CHT)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang)
72. Adão R, Guzik TJ. Inside the heart of COVID-19. *Cardiovasc Res* 2020;116(6):e59-e61.
73. Marrie TJ, Shariatzadeh MR. Community-acquired pneumonia requiring admission to an intensive care unit: a descriptive study. *Medicine (Baltimore)* 2007; 86:103-11.
74. Kytömaa S, Hegde S, Claggett B, et al. Association of influenza-like illness activity with hospitalizations for heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA Cardiol* 2019; 4:363-9.
75. Madjid M, Miller CC, Zarubaev VV, et al. Influenza epidemics and acute respiratory disease activity are associated with a surge in autopsy-confirmed coronary heart disease death: results from 8 years of autopsies in 34,892 subjects. *Eur Heart J* 2007; 28:1205-10.
76. Chapman AR, Shah ASV, Lee KK et al. Long-term outcomes in patients with type 2 myocardial infarction and myocardial injury. *Circulation* 2018;137:1236-45.
77. Zhou B, She J, Wang Y, Ma X. The clinical characteristics of myocardial injury in severe and very severe patients with 2019 novel coronavirus. *J Infect* 2020 doi:10.1016/j.jinf.2020.03.021.
78. Li D, Lv J, Liu F, et al. Hypertension burden and control in mainland China: Analysis of nationwide data 2003-2012. *Int J Cardiol* 2015;184:637-44.
79. Liu S, Zhang M, Yang L, et al. Prevalence and patterns of tobacco smoking among Chinese adult men and women: findings of the 2010 national smoking survey. *J Epidemiol Community Health* 2017;71:154-61.
80. Aggarwal S, Garcia-Telles N, Aggarwal G, et al. Clinical features, laboratory characteristics, and outcomes of patients hospitalized with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Early report from the United States. *Diagnosis (Berl)* 2020;7:91-6.
81. Yu X, Sun X, Cui P, et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 333 Confirmed Cases with Coronavirus Disease 2019 in Shanghai, China. *Transbound Emerg Dis* 2020 doi:10.1111/tbed.13604.
82. Myers LC, Parodi SM, Escobar GJ, et al. Characteristics of hospitalized adults with COVID-19 in an Integrated Health Care System in California. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.7202.
83. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.6775.
84. Liu K, Fang YY, Deng Y, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl)* 2020;133:1025-31.
85. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* 2020 doi:10.1111/all.14238.
86. Arentz M, Yim E, Klaff L, et al. Characteristics and outcomes of 21 critically ill patients with COVID-19 in Washington State. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.4326.
87. Shen C, Ge J. Epidemic of cardiovascular disease in China: current perspective and prospects for the future. *Circulation* 2018;138:342-4.
88. National Center for Health Statistics: Summary Health Statistics Tables for U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2018 <https://www.cdc.gov/nchs/nhis/shs/tables.htm> (ultimo accesso: giugno 2020).
89. Madjid M, Vela D, Khalili-Tabrizi H, et al. Systemic infections cause exaggerated local inflammation in atherosclerotic coronary arteries: clues to the triggering effect of acute infections on acute coronary syndromes.

- Tex Heart Inst J 2007;34:11-8.
90. Corrales-Medina VF, Madjid M, Musher DM. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect Dis* 2010;10:83-92.
 91. Libby P. The heart in COVID19: primary target or secondary bystander? *JACC Basic Transl Sci*. 2020 doi:10.1016/j.jacbts.2020.04.001.
 92. Madjid M, Miller CC, Zarubaev VV, et al. Influenza epidemics and acute respiratory disease activity are associated with a surge in autopsy-confirmed coronary heart disease death: results from 8 years of autopsies in 34,892 subjects. *Eur Heart J* 2007;28:1205-10.
 93. Kang Y, Chen T, Mui D, et al. Cardiovascular manifestations and treatment considerations in COVID-19. *Heart* 2020 doi:10.1136/heartjnl-2020-317056.
 94. Wei JF, Huang FY, Xiong TY, et al. Acute myocardial injury is common in patients with COVID-19 and impairs their prognosis. *Heart* 2020 doi:10.1136/heartjnl-2020-317007.
 95. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.5394.
 96. <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-decessi-italia#1> (aggiornamento del 7 maggio 2020).
 97. Liang W, Liang H, Ou L, et al. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern Med* 2020 doi:10.1001/jamainternmed.2020.2033.
 98. Wang K, Zuo P, Liu Y, et al. Clinical and laboratory predictors of in-hospital mortality in patients with COVID-19: a cohort study in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020 doi:10.1093/cid/ciaa538.
 99. Guan WJ, Liang WH, Zhao Y, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J* 2020 doi:10.1183/13993003.00547-2020.

Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists

Massimiliano Ammirabile¹, Ada Aita², Andrea Bartolini³, Federica Spolaore⁴, Margherita Scapaticci³, Cristina Pellegrini⁵, Marco Perrone^{6,7}, Giulia Sancesario^{8,9}

¹Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

²Dipartimento di Medicina-DIMED e Università degli Studi di Padova

³Laboratorio Unico Metropolitano, AUSL Bologna

⁴Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale S. Chiara, APSS Trento

⁵Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, Università dell'Aquila, L'Aquila

⁶Dipartimento di Cardiologia,, Università di Roma Tor Vergata

⁷Dipartimento di Biochimica Clinica, Università di Roma Tor Vergata

⁸Centro Risorse Biologiche, Biobanca, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

⁹Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Roma

ABSTRACT

The impact of COVID-19 emergency in clinical laboratories: experiences and opinions of SIBioC Young Scientists.

The recent pandemic status declared worldwide for the spreading of the new coronavirus-SARS-CoV-2 has emphasized the key role of the Laboratory Medicine in the health care process. In this context, the clinical laboratories needed to rapidly reorganize the internal workflow to face the emergency and to continue ensuring rapid and accurate responses. This has been possible only thanks to the contribution of all the personal working in the laboratory, including administrative staff, nurses, technical staff, and clinical chemists. The competence and the commitment of the Young Scientists (YS), can be considered an essential contribution to the efficient and successful management of the pandemic in clinical laboratories.

This paper reports the experiences and the opinions of some of the members of the SIBioC YS Study Group, who have been involved in the clinical laboratory management of the COVID-19 pandemic. The paper is focused to present and discuss the use of the molecular and serological tests for the screening and diagnosis of COVID-19, the reorganization of laboratories, the development of panels of biochemical markers for organ damage and cardiovascular involvement diagnosis. Finally, issues are addressed regarding the importance of safety procedures for biohazard containment, and of future research and development perspectives, thanks to the availability of biological specimens from patients affected by COVID-19, safely and correctly stored in biobanks, together with the associated clinical data.

INTRODUZIONE

La pandemia provocata dal nuovo coronavirus SARS-CoV-2 (sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2) ha ulteriormente enfatizzato il valore fondamentale della Medicina di Laboratorio (MdL) nell'ambito del processo assistenziale. Sebbene il fornire una risposta tempestiva e corretta sia da sempre

l'obiettivo primario della MdL, nel contesto della pandemia i laboratori sono stati costretti ad una rapida riorganizzazione per fronteggiare la situazione emergenziale e continuare a garantire risposte rapide e accurate (1). Il numero elevato di pazienti con diagnosi di malattia da SARS-CoV-2 (COVID-19) e le politiche di screening attuate sulla popolazione da alcune Regioni Italiane per confinare i contagi, hanno fatto sì che

Corrispondenza a: Massimiliano Ammirabile, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico di natura pubblica, Via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano, Tel: +39 02 5503 2090 / +39 02 5503 2447, Email: massimiliano.ammirabile@policlinico.mi.it

Ricevuto: 07.07.2020

Revisionato: 08.07.2020

Accettato: 30.07.2020

Pubblicato on-line: 16.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.081

migliaia di campioni, in particolare tamponi respiratori e prelievi ematici per gli esami sierologici, pervenissero quotidianamente ai laboratori.

In questo contesto, si è reso necessario attivare misure di sicurezza per la protezione del personale in servizio, come l'approvvigionamento di dispositivi di protezione individuale (DPI), l'adozione di misure di biocontenimento, nonché la riorganizzazione delle aree e del personale per evitare assembramenti. Nella fase acuta della pandemia, l'adeguata conservazione del materiale biologico dei pazienti affetti da COVID-19 è stata poi cruciale per permettere la ricerca e lo sviluppo di nuove terapie e vaccini, e per la validazione di nuovi esami di laboratorio. Inoltre, negli ultimi anni, le politiche aziendali dirette alla riduzione dei costi e delle risorse umane, a seguito dell'elevata automazione introdotta nei laboratori di analisi e dell'accentramento di molte diagnostiche, hanno inciso notevolmente sulle capacità di reazione e di gestione dell'emergenza all'interno dei laboratori stessi. Per superare questa criticità, è stata fondamentale la competenza e il coinvolgimento sia del personale strutturato che dei precari e degli studenti (specializzandi, dottorandi, borsisti).

Il gruppo di studio Young Scientists di SIBioC (GdS SIBioC-YS) è composto da giovani professionisti che operano nelle diverse discipline della MdL, in una rete dinamica di scambio scientifico e culturale a livello nazionale e internazionale (2,3). Il confronto a distanza, spesso attraverso videoconferenze, è stato uno strumento prezioso per la condivisione delle esperienze tra YS operanti in diverse regioni italiane, soprattutto in considerazione del fatto che l'epidemia da SARS-CoV-2 ha colpito in modo eterogeneo le regioni italiane, con zone "rosse" che hanno avuto un contagio più elevato e anticipato rispetto al resto del Paese, dove le misure di contenimento adottate dal Governo hanno contribuito ad arginarne la diffusione.

Questo articolo raccoglie le esperienze e le opinioni di alcuni membri del GdS SIBioC-YS impegnati in laboratori e contesti assistenziali diversi durante l'emergenza COVID-19. In particolare, verranno discussi temi quali l'utilizzo degli esami molecolari e sierologici per l'identificazione della infezione da SARS-CoV-2, i problemi legati alla loro accuratezza diagnostica, l'introduzione di nuovi esami nel repertorio disponibile in urgenza per permettere la stratificazione dei pazienti rispetto alla gravità dei quadri clinici osservati, e la riorganizzazione del personale per affrontare l'emergenza. Infine, verranno discusse le procedure di sicurezza per il contenimento del rischio biologico, e le prospettive future di ricerca possibili grazie alla conservazione del materiale biologico nelle biobanche COVID-19.

INDAGINI MOLECOLARI E SIEROLOGICHE

Gli esami molecolari

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda la ricerca diretta di sequenze di RNA virale

del SARS-CoV-2 nei tamponi delle vie respiratorie (4) per la diagnosi di COVID-19, in presenza di specifici criteri clinici ed epidemiologici (5). Inoltre, è di fondamentale importanza individuare e isolare i pazienti asintomatici, rintracciando i loro potenziali contatti, garantire il distanziamento sociale e il cambiamento comportamentale della popolazione, per limitare l'ulteriore diffusione virale (6).

Il test molecolare con metodo rRT-PCR (retrotrascrittasi inversa e reazione polimerasica a catena) per SARS-CoV-2 consente di verificare la presenza del genoma virale in secrezioni respiratorie ottenute dalle alte e/o basse vie respiratorie (AVR e/o BVR), queste ultime più sensibili per una maggiore presenza del recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2), utilizzato dal virus per essere internalizzato nella cellula (4). Nonostante la maggiore invasività e la minor compliance da parte del paziente, il tampone delle BVR si è rivelato utile per limitare l'incidenza di un possibile risultato falso negativo (FN).

L'utilizzo delle tecniche di virologia molecolare per SARS-CoV-2 può presentare alcune peculiarità, tra cui la necessità di personale specializzato, lunghi tempi di refertazione (4-6 ore), possibile alterazione dei risultati dovuta a fattori biologici del virus. Infatti, risultati FN possono verificarsi se l'indagine è effettuata precocemente, in quanto il virus potrebbe non aver ancora iniziato la sua fase replicativa, oppure possono essere riscontrate differenze operatore-dipendenti nella fase di prelievo o nelle fasi pre- e analitica. I tempi di refertazione determinano una criticità sia per il paziente che per la sua struttura ospitante che deve attuare rapidamente misure di isolamento per contenere la trasmissione. Tuttavia, il tampone rimane il metodo di elezione per la diagnosi di COVID-19, sia nei pazienti sintomatici che asintomatici. L'analisi viene effettuata in modo centralizzato presso i principali ospedali e laboratori di riferimento regionali. Questo ha portato alla definizione di procedure che guidano il processo in tutte le fasi (pre-analitica, analitica e post-analitica): dall'esecuzione e trasporto del tampone, all'accettazione e analisi del campione fino alla trasmissione del referto (7-11) (Tabella1).

I kit di biologia molecolare attualmente usati nei laboratori italiani, si basano sull'identificazione contemporanea di tre geni: uno specifico per SARS-CoV-2 (RNA polimerasi RNA-dipendente - RdRP), e due comuni a tutti i betacoronavirus [nucleocapside (N) ed envelope (E)] (12, 13). La positività a tutti o solo parte di questi tre geni comporta una diversa refertazione (Tabella1). Solo da pochi mesi, in alcuni laboratori è possibile utilizzare una nuova tecnologia, GENEXPERT (CepheidTM, CA, USA), che pur basandosi sempre su un'amplificazione genica, è completamente automatizzata, permettendo di avere una diagnosi molecolare molto rapida, in circa 1 ora, consentendo così una gestione efficace dei casi urgenti.

La complessità delle procedure e il rischio di contagio hanno portato all'istituzione di unità COVID-19 all'interno

Tabella 1

Fasi del processo di laboratorio per l'analisi dei tamponi respiratori tramite retrotrascrittasi inversa e reazione polimerasica a catena (rRT-PCR) per la ricerca di SARS-CoV-2

Fase pre-analitica	Esecuzione tampone	- Basse vie (BVR): - Espettorato - Lavaggio bronco-alveolare (BAL) - Alte vie (AVR): - Naso-faringei - Oro-faringei
	Trasporto tampone con scheda allegata	Procedura per il contenimento del rischio biologico Scheda: - dati e sintomatologia del paziente - motivo della richiesta e nome medico richiedente
	Accettazione	- Centralizzata - Istituzione di un nuovo punto di accettazione con personale dedicato
	Inattivazione Virus	- Tampone con mezzo di trasporto contenente un inattivatore. - Tampone con mezzo di trasporto privo di inattivatore: * - Aggiunta di lisante - Uso del calore: - 56°C per 30' - 65°C per 10'
Fase analitica	Sistema classico	Estrazione RNA Automatica (con biglie magnetiche). Durata: 1-2 ore Amplificazione: rRT-PCR. Durata: 1,30-2 ore
	Sistema integrato	Nessuna estrazione, caricamento diretto. Durata: 1 ora
Fase post-analitica	Refertazione	- Positivo: positivo a tutti i target - Debole positivo: positività parziale ai target - Negativo: Nessun target rilevato
	Visualizzazione referti	- Pazienti ricoverati: visualizzazione immediata tramite proprio gestionale - Pazienti esterni: invio al curante del referto tramite l'utilizzo di: - Fax - Email - Creazione di piattaforme informatiche che fanno da tramite tra il laboratorio e l'ente esterno che deve visualizzare il referto.

***Inattivazione virus:** Una volta preso in consegna il tampone, il laboratorio adibito all'esecuzione procede all'inattivazione del virus nel caso in cui il tampone pervenisse in un mezzo di trasporto privo di inattivatore. Il trattamento con lisanti sotto cappe di biosicurezza di livello 2 (fase più rischiosa per gli operatori) e con l'utilizzo di appropriati dispositivi di protezione individuale (DPI), rientra tra i metodi più comunemente utilizzati. L'inattivazione al calore (56°C per la durata di 30' o 65°C per 10'), sebbene raccomandata da documenti di consenso internazionali e meno rischiosa per l'operatore, potrebbe determinare la degradazione del RNA generando potenziali falsi negativi (7).

dei laboratori, con personale dedicato esclusivamente alla diagnostica molecolare del virus.

Gli esami sierologici

Nell'attuale fase dell'emergenza sanitaria da COVID-19, la diagnostica sierologica, che consiste nella rilevazione di anticorpi diretti contro SARS-CoV-2, ha sicuramente un ruolo rilevante in ambito epidemiologico in quanto permette di stimare la diffusione dell'infezione e comprenderne la prevalenza in una determinata area (14). La drammatica diffusione della pandemia ha portato ad un rapido sviluppo, da parte di numerose aziende, di un elevato numero di kit diagnostici. Questi ultimi sono costituiti principalmente da test immunocromatografici, metodiche immunoenzimatiche

(enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) o in chemiluminescenza (CLIA) per la ricerca sia qualitativa che quantitativa di anticorpi di tipo IgG, IgA e IgM anti SARS-CoV-2 (Tabella 2) (15). Tuttavia, la situazione emergenziale ha comportato che l'immissione nel mercato dei nuovi kit diagnostici spesso non sia stata accompagnata da una sufficiente validazione, e ancora oggi i dati disponibili sull'affidabilità e accuratezza diagnostica di questi test sono pochi e incerti (Tabella 2) (14,16,17). La comparsa di anticorpi specifici nel sangue solitamente si verifica una-due settimane dopo l'insorgenza dei sintomi, ma si stima che la trasmissione virale possa avvenire anche durante il periodo di incubazione, di circa una o anche più settimane prima della manifestazione clinica (18). In particolare, la ricerca combinata di IgM-IgG può migliorare l'accuratezza

diagnostica (sensibilità: 89%; specificità: 91%) rispetto alla sola rilevazione di IgM o IgG (19).

Nell'ambito degli studi di prevalenza dell'infezione da SARS-CoV-2, diverse regioni hanno attivato un percorso di monitoraggio volto alla sorveglianza degli operatori sanitari e socio-sanitari asintomatici per verificarne lo stato sierologico, al fine di attuare adeguati interventi di sanità pubblica orientati al contenimento della pandemia. Inoltre, per i datori di lavoro, è stata attivata la possibilità di realizzare percorsi di screening in collaborazione con il medico competente effettuando

l'esame presso laboratori privati, autorizzati dalla Regione. Infine, l'accesso ai test sierologici è stato reso disponibile anche ai privati cittadini, previa indicazione da parte del medico di medicina generale.

Nonostante i numerosi mezzi a disposizione, permangono ancora molte criticità che rendono la ricerca epidemiologica sul SARS-CoV-2 ancora una sfida. Le basse percentuali di positività agli anticorpi riscontrate nelle varie regioni italiane, ad eccezione delle zone critiche maggiormente colpite, possono verosimilmente essere ascrivibili almeno in parte alla

Tabella 2

Principali caratteristiche di alcuni metodi immunometrici attualmente disponibili in commercio (adattato da <https://www.elasitalia.it/news/sars-cov-2-sierologia/>).

Nome commerciale	Isotipo anticorpale	Specificità anticorpale	Tecnologia	Metodica	Tipo di risultato	Specificità diagnostica dichiarata	Sensibilità diagnostica dichiarata	Produttore/distributore
SARS-CoV-2 IgG o COV-2 IgG	IgG	Anti-nucleocapside	Immunometrica a due fasi	CLIA	Qualitativo	100%	99,6%	Abbott
LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG	IgG	Anti-proteina spike (S1 e S2)	Immunometrica indiretta	CLIA	Quantitativo	97,4%	98,5%	DiaSorin
ENZY-WELL SARS-CoV-2	IgG, IgM, IgA	Anti-SARS-CoV-2	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	92,5%, 87,7%, 93,7%	95,8%, 97,0%, 96,3%	DIESE
Anti SARS-CoV-2 ELISA	IgG, IgA	Anti-proteina spike (S1)	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	93,8%, 100%	99,6%, 92,4%	EUROIMMUN
ERADIKIT™ COVID19 IgG	IgG	Anti-nucleocapside	ELISA su micropiastra	Enzimatica (perossidasi)	Semiquantitativo	95,6%	100%	IN3 Diagnostic
VITROS Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack	IgG + IgM + IgA	Anti-proteina spike	Immunometrica a due fasi	CLIA potenziata	Qualitativo	100%	100%	Ortho Clinical. Diagnostics
Elecsys Anti-SARS-CoV-2	Anticorpi totali incluso IgG	Anti-nucleocapside	Immunometrica sandwich	ECLIA	Qualitativo	100%	99,8%	Roche
MAGLUMI™ 2019-nCoV IgG/IgM	IgG, IgM	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike (S1 e S2)	Immunometrica indiretta / con Ab. a cattura	CLIA	Quantitativo	91,2%, 78,7%	97,3%, 97,5%	Snibe (Medical System)
COVID-19 VIRCLIA® MONOTEST	IgG, IgM+IgA	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike	Immunometrica indiretta	CLIA	Qualitativo	92%, 97%	99%, 99%	Vircell (Alifax)
iFlash-SARS-CoV-2	IgG, IgM	Anti-nucleocapside e anti-proteina spike	Immunometrica indiretta a due fasi	CLIA	Quantitativo	97,3%, 86,1%	96,3%, 99,2%	Yhlo (PANTEC)

CLIA: chemiluminescenza; ECLIA: elettro-chemiluminescenza

scarsa conoscenza attuale riguardo la dinamica anticorpale di SARS-CoV-2 (20). Ad oggi, gli esami sierologici, pur non potendo essere usati nell'attività diagnostica dello stato infettivo dell'individuo e quindi non potendo sostituire l'esame molecolare, possono essere rilevanti a fini epidemiologici per conoscere la suscettibilità della popolazione e i modelli di trasmissione del virus e, in prospettiva futura, per lo sviluppo di terapie sierologiche (ad esempio l'utilizzo di plasma di individui convalescenti con elevato titolo anticorpale) e nel monitoraggio della risposta vaccinale (13,21) oltre che, in casi specifici, essere di supporto alla diagnosi di infezione nel caso di risultati dubbi dell'analisi molecolare (20).

RIORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI BIOCHIMICA CLINICA

Nel contesto della emergenza da SARS-CoV-2, i laboratori hanno dovuto modificare la loro organizzazione non solo per far fronte ad una considerevole richiesta di esecuzione di indagini molecolari e sierologiche, ma anche per ampliare il proprio repertorio di esami da eseguire in regime di urgenza (ad esempio ferritina, interleuchina-6, trigliceridi,) per consentire la stratificazione e l'identificazione dei pazienti fragili. Inoltre, si è osservato un aumento considerevole di richieste di alcuni esami già eseguibili in urgenza, come ad esempio proteina C-reattiva (PCR), troponina (Tpn), creatina chinasi (CK), lattato deidrogenasi (LDH), D-dimero, procalcitonina. Al contempo sono diminuite le richieste di esami in routine e quelle relative ai pazienti ambulatoriali, per la sospensione di molte attività routinarie all'interno degli ospedali.

Il monitoraggio biochimico dei pazienti si è rivelato utile nell'accertare la gravità della malattia, nel predire il rischio di evoluzione verso la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), la coagulazione intravascolare disseminata (CID) e la sindrome da disfunzione multiorgano (22). In generale infatti, i pazienti affetti da COVID-19 mostrano caratteristiche ematochimiche comuni, quali linfopenia, aumento dei valori di PCR, LDH, velocità di eritrosedimentazione (VES) e D-dimero, ridotta concentrazione di albumina sierica (23). Leucocitosi, neutrofilia e linfopenia sono stati descritti come parametri di predizione di progressione verso forme gravi e critiche di COVID-19 (24). Inoltre, nei pazienti con polmonite associata a infezione da SARS-CoV-2 può spesso manifestarsi una "tempesta citochinica", nota anche come linfocitosi emofagocitica secondaria (sHLH) o un'iperinfiammazione sistemica designata sotto il termine generico di sindrome da attivazione dei macrofagi.

Nei pazienti con COVID-19 e ARDS, una prognosi

negativa è legata ad un aumento protratto di Interleuchina-1 e -6 (IL-1, IL-6), che solitamente si osserva durante reazioni infiammatorie acute associate a lesioni, traumi, stress, infezioni, neoplasie e altre gravi situazioni patologiche. Diversi studi hanno valutato l'efficacia dei farmaci anti-IL-6 (Tocilizumab, Sarilumab), inibitori della cascata citochinica, responsabile della sintomatologia severa dell'infezione da SARS-CoV-2 (22-27). Il dato emerso soprattutto sui pazienti non intubati, conferma l'importanza del trattamento con i farmaci anti-IL-6 nelle fasi precoci della cosiddetta "tempesta citochinica" che è alla base del meccanismo del distress respiratorio. L'analisi dei marcatori biomorali ha evidenziato una concentrazione basale sierica di IL-6, CRP, e un rapporto neutrofilii/linfociti molto più elevato nei pazienti non-responsivi al trattamento rispetto ai pazienti che lo sono (24-28). La determinazione di IL-6 nel siero di pazienti ricoverati in terapia intensiva si è dimostrata utile nella valutazione della sindrome da risposta infiammatoria sistemica, della sepsi e dello shock settico, e nel monitoraggio durante il trattamento con farmaci anti-IL-6 (29). Come conseguenza, in molti laboratori è stata introdotta la misura di IL-6.

I dati del recente report del "Chinese Center for Disease Control and Prevention" relativo a 72 314 casi di COVID-19, mostrano che a fronte di una mortalità complessiva del 2,3%, questa è risultata del 10,5% nei pazienti con pregresse malattie cardiovascolari (30). In questi pazienti l'infezione da SARS-CoV-2 e l'infiammazione sistemica possono portare ad infarto del miocardio, scompenso cardiaco e aritmie tramite numerosi meccanismi, quali l'instabilità di una pre-esistente placca aterosclerotica coronarica, tachicardia con aumentato stress di parete, il rilascio di citochine infiammatorie e uno stato di aumentata trombofilia (31-35). Dall'altra parte studi più recenti hanno dimostrato che anche pazienti che prima dell'infezione non avevano alcuna malattia cardiovascolare, potevano avere una complicanza cardiaca, potenzialmente fatale, come la miocardite (36). La diagnosi precoce delle complicanze cardiache nei pazienti positivi al COVID-19 è possibile attraverso la misura delle troponine cardiache I e T, che le più recenti linee guida internazionali raccomandano come biomarcatori di riferimento per il danno miocardico (37,38).

Diversi autori hanno dimostrato come una misura precoce delle troponine cardiache abbia permesso di fare diagnosi di miocardite, talvolta in pazienti paucisintomatici, e di impostare tempestivamente una terapia per il trattamento della cardiopatia (39). Pertanto la determinazione delle troponine cardiache dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con COVID-19, e in particolare in quelli a rischio più elevato o che mostrino sintomi specifici, per una diagnosi precoce e un trattamento tempestivo delle complicanze cardiache.

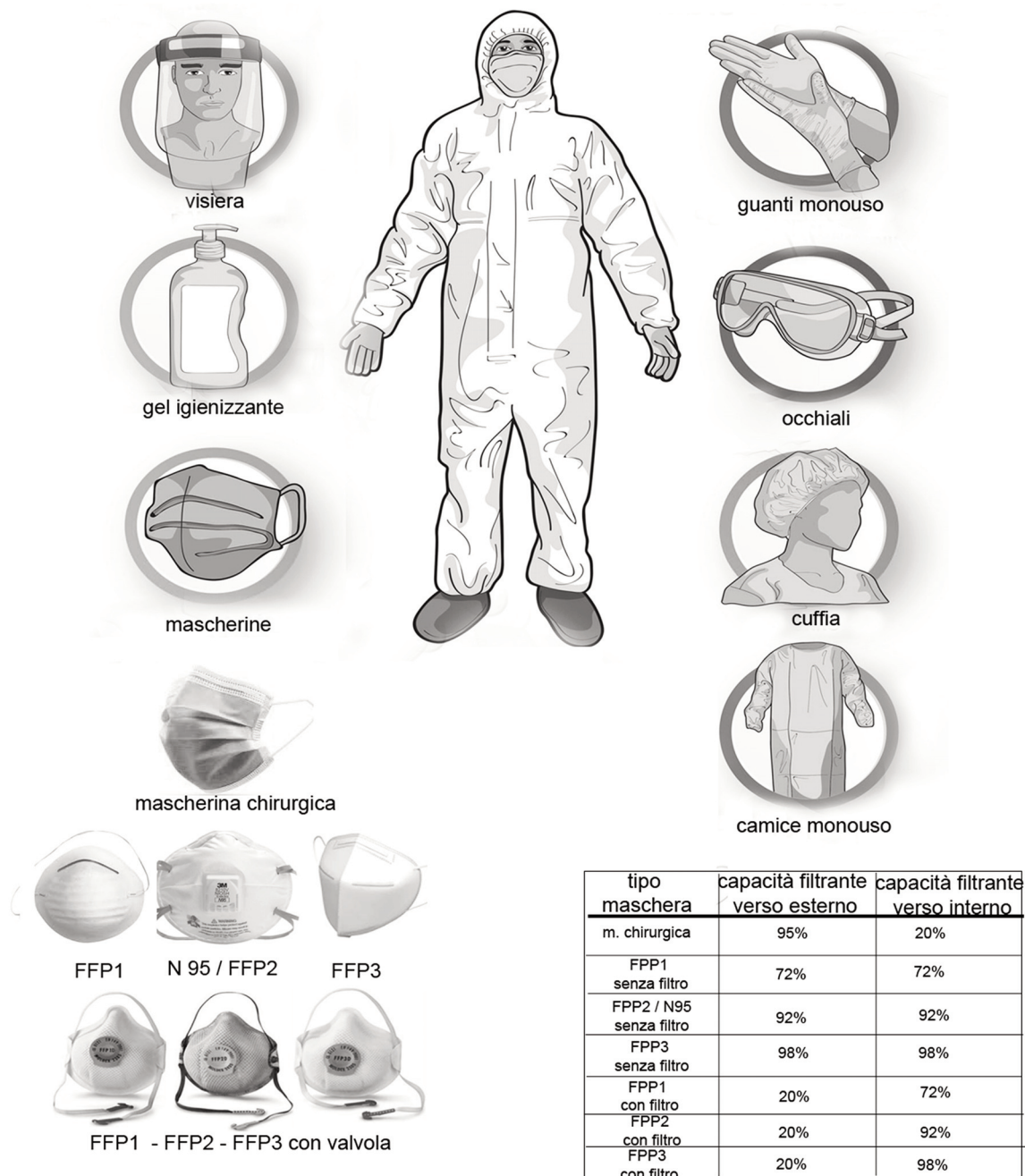


Figura 1. Diversi tipi di DPI utilizzati nella prevenzione dei contagi da SARS-CoV-2 e rispettiva capacità filtrante delle maschere facciali

GESTIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO E DELLA SICUREZZA IN LABORATORIO

Le misure di sicurezza in laboratorio previste nella gestione dell'emergenza per COVID-19 includono requisiti già adottati per il contenimento del rischio professionale di contrarre infezioni da agenti patogeni manipolati.

Il potenziale rischio dell'agente biologico è determinato sia dalla sua natura che dalle modalità di

manipolazione. Le procedure di processazione dei campioni (manipolazione, pipettaggio, centrifugazione) per loro stessa natura possono generare aerosol. Inoltre, l'amplificazione dell'organismo virale crea il potenziale per un'esposizione su larga scala in caso di rilascio accidentale (40). È necessario dunque fornire misure di sicurezza adeguate al tipo di rischio biologico (BR) e quindi prevedere l'uso di barriere primarie e secondarie. I livelli di biocontenimento e biosicurezza devono essere adeguati al BR, e stabiliti sulla base di infettività,

patogenicità e neutralizzazione dell'agente patogeno. Nei laboratori clinici, la natura infettiva dei materiali biologici che pervengono in laboratorio è per lo più sconosciuta e i campioni vengono spesso inviati con una richiesta di esame microbiologico per più agenti. Salvo circostanze particolari, il processo di ricerca sierologica dei patogeni e il suo trattamento possono essere eseguiti al livello di biosicurezza-2 (BSL-2), raccomandato per campioni potenzialmente infetti (ad esempio HBV/HIV), per i quali il rischio è correlato all'esposizione percutanea/mucosa accidentale, o a ingestione di materiale infetto. Tutte le procedure che potenzialmente incrementano il rischio di esposizione del personale devono essere eseguite con strumentazioni primarie contenute in dispositivi protetti (cabina di sicurezza biologica, o coppette di centrifugazione di sicurezza) (41). I DPI devono essere appropriati e devono inoltre essere disponibili barriere secondarie, istruzioni e materiali per il corretto lavaggio delle mani e la decontaminazione dei rifiuti per ridurre il potenziale contagio ambientale. La ricezione, lo smistamento, il trattamento e l'analisi dei campioni devono essere effettuati tenendo conto del rischio di livello 2 da parte di tutto il personale (42). I DPI anti COVID-19 sono quelli dedicati alla manipolazione sicura dei campioni a rischio di infezione per via respiratoria.

Le maschere facciali sono classificate in FFP1,2,3 in base al livello di protezione contro l'aerosol (Figura1). Le FFP2 o N95 mantengono la loro protezione se utilizzate correttamente, e sostituite ogni 4 ore (43). Le FFP3 sono utili per un uso prolungato e richiedono una maschera chirurgica aggiuntiva per evitare la diffusione dell'espiazione dell'operatore nell'ambiente.

L'utilizzo prolungato è preferibile al riutilizzo ma ha effetti collaterali, quali ad esempio lo sviluppo di condensa, per la formazione di una maggiore umidità all'interno della maschera, con cambiamenti nel microbiota cutaneo e comparsa di arrossamenti, dermatiti, prurito e/o acne nelle aree marginali di sfregamento e sulla pelle di naso/bocca; oppure la difficoltà di respirazione, con sensazione di affanno e fame d'aria per accumulo di CO₂. Per usi prolungati, oltre le 12 ore, possono verificarsi mal di testa, ipossiemia, ipercapnia, stordimento, nausea, difficoltà di comunicazione (44).

Tabella 3

Raccolta di dati clinici associati a COVID-19: richiesta dalle biobanche e lista consigliata per l'armonizzazione. Fonte: Istituto Superiore di Sanità, Rapporto COVID-19 n. 13/2020, <http://iss.it> (ultimo accesso: aprile 2020).

Infezione da SARS-CoV-2	Test positivo, test negativo, risultato non conclusivo, test non effettuato
Motivazione della raccolta	Sospetta infezione, screening, conferma guarigione
Sintomi clinici e durata	Assenti, lievi o gravi Comorbilità, trattamento, monitoraggio.
Stato di malattia	Non affetto, affetto, guarito, deceduto.
Test diagnostici	Titolo anticorpale di IgM e IgG anti-virus, collegamento alla cartella clinica, risultati degli esami di laboratorio al ricovero, immagini TAC e/o di radiografia polmonare.

CONSERVAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO E DEI DATI CLINICI ASSOCIATI: LE BIOBANCHE COVID-19

Un notevole sforzo a livello internazionale è in atto nel campo della ricerca di base e preclinica per individuare terapie, vaccini o esami diagnostici per SARS-CoV-2. Per favorire la ricerca traslazionale futura e l'accesso ai campioni per finalità di ricerca, la conservazione del materiale biologico dei pazienti e dei guariti all'interno delle biobanche COVID-19 è fondamentale. Diverse raccomandazioni sono state definite per armonizzare la conservazione del materiale e dei dati associati secondo standard condivisi (45). In questo processo, diversi fattori devono essere presi in considerazione, come la manipolazione dei campioni secondo Procedure Operative Standard (SOPs), il BR, e soprattutto la tutela della privacy e degli aspetti etici, legali e sociali dei pazienti. All'interno delle biobanche possono essere conservati sangue e i suoi derivati, il tampone naso e oro-faringeo, il BAL, e altro materiale biologico, secondo procedure di buona pratica del laboratorio microbiologico (46). In particolare, le analisi molecolari (amplificazione genica, sequenziamento) e sierologiche devono essere condotte presso le strutture con livelli di contenimento del rischio biologico comparabile a BSL-2, mentre la coltura di virus, saggi di isolamento o di neutralizzazione vanno eseguiti in laboratorio BSL-3 (47). In modo analogo, i campioni provenienti da casi sospetti o confermati di COVID-19 rientrano nella categoria delle "Sostanze Biologiche Categoria B UN-3373", mentre le colture o gli isolati virali devono essere trasportati come "Sostanza infettiva categoria A, UN-2814", in modo conforme al Dangerous Goods Regulations (DGR) dell'International Air Transport Association (IATA).

Oltre al materiale biologico, di grande importanza è la raccolta dei dati associati, epidemiologici, clinici, anche attraverso il collegamento con la cartella elettronica, e informazioni riguardo al trattamento, al monitoraggio, allo stato della malattia (Tabella 3) (48). Tuttavia, è indispensabile ricevere dal paziente o tutore l'autorizzazione al trattamento dei dati e alla conservazione del materiale biologico per finalità di ricerca e per studi futuri. In casi emergenziali, a causa

dello stato clinico del paziente, la firma del Consenso Informato può essere ottenuta anche successivamente rispetto alla raccolta del materiale, ma è il fondamento di tutto il processo di conservazione, per evitare di dover ricorrere all'anonimizzazione e distruzione del materiale al termine dello svolgimento delle finalità per cui era stato raccolto. Il Regolamento Europeo Generale sulla Protezione dei Dati (GDPR 2016/679) definisce infatti il diritto alla protezione dei dati e la responsabilità del titolare o del responsabile del trattamento, per cui in nessun caso è consentito il trattamento dei dati associati dei pazienti in assenza di un loro consenso specifico.

DISCUSSIONE

La pandemia da SARS-CoV-2 ha impattato in modo devastante sul servizio sanitario nazionale dei paesi colpiti, in particolar modo l'Italia. La MdL è stata coinvolta in prima linea, al fianco di medici clinici, infermieri e soprattutto pazienti. L'implementazione in tempi rapidi di metodiche di biologia molecolare per l'identificazione del SARS-CoV-2 e la valutazione di numerose piattaforme commerciali per le indagini sierologiche ha richiesto infatti l'impegno di numerose risorse umane adeguatamente formate. Gli esami sierologici, anche se non alternativi al RT-PCR su tampone per la diagnosi di infezioni virali acute, costituiscono un approccio complementare per la diagnosi e il monitoraggio della malattia oltre che per studi epidemiologici. Inoltre, il potenziamento della sezione del laboratorio dedicata agli esami da eseguire in regime di urgenza/emergenza, per far fronte alle necessità dei pazienti con quadri clinici complessi, è stata una misura eccezionale adottata nei laboratori che ha richiesto una ri-organizzazione impegnativa, insieme al dovere della conservazione del materiale biologico secondo SOPs e nel rispetto dei diritti dei donatori, per offrire un supporto al futuro della ricerca traslazionale su COVID-19.

I giovani professionisti della MdL hanno contribuito attivamente alla risposta all'emergenza. Da un sondaggio del 2019, la maggior parte dei giovani (meno di 40 anni) con una specializzazione inerente la MdL lavora in ambito sanitario, soprattutto in strutture pubbliche, ospedaliere territoriali o universitarie, e nei laboratori privati (49). Sebbene le tipologie di contratto siano varie, e sebbene solo una parte di questi professionisti abbia un contratto stabile, essi hanno fornito un importante contributo sul campo, sia in ambito diagnostico che di ricerca, per individuare gli obiettivi terapeutici, per la ricerca sui vaccini e sui farmaci efficaci. Inoltre, l'alto rischio biologico e la possibilità di contagio hanno ulteriormente messo a dura prova la condizione lavorativa di tutto il personale, che ha operato con grande sforzo e responsabilità.

L'emergenza causata dal SARS-CoV-2 ha mostrato diversi punti di debolezza del Sistema Sanitario, dovuti in parte al sotto-finanziamento e alla carenza di personale

e al consolidamento delle strutture sanitarie in atto da alcuni anni, ma dall'altro ha messo in luce le importanti eccellenze dei nostri sistemi di assistenza e ricerca. Grande risalto è stato giustamente dato a livello nazionale al lavoro di sequenziamento del virus da campioni umani svolto da un gruppo composto anche da giovani ricercatrici precarie presso l'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani di Roma (50). La nostra speranza e augurio è che si possa valorizzare l'impegno e la capacità di tanti YS che operano quotidianamente con professionalità e abnegazione nella MdL.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare i Direttori, i Colleghi del Laboratorio e i Clinici di riferimento delle rispettive strutture di appartenenza per il loro gentile e fattivo supporto.

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0240.
2. Sancesario G, Perrone MA, Pellegrini C, et al. La medicina di laboratorio: gli specialisti di domani. *Biochim Clin* 2019;43:424-34.
3. Sancesario G, Perrone MA, Aita A, et al. Education and training for young scientists: Two years' experience of the Italian Society of Clinical Chemistry Young Scientists Working Group (SIBIOC YS-WG). *Clin Chim Acta* 2019;493:S311-6.
4. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
5. World Health Organization (WHO). Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> (ultimo accesso: maggio 2020).
6. Leung K, Wu JT, Liu D, et al. First-wave COVID-19 transmissibility and severity in China outside Hubei after control measures, and second-wave scenario planning: a modelling impact assessment. *Lancet* 2020;395:1382-93.
7. Pan Y, Long L, Zhang D, et al. potential false-negative nucleic acid testing results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clin Chem* 2020;66:794-801.
8. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-92.
9. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;30:30251-8.
10. Chan JF, Yip CC, To KK, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2020;4:00310-20.

11. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. <https://www.fda.gov/media/134922/download>. (ultimo accesso: luglio 2020).
12. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2000045.
13. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 2 March 2020. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1271387/retrieve> (ultimo accesso: maggio 2020)
14. Kirkcaldy RD, King BA, Brooks JT. COVID-19 and Postinfection Immunity: Limited Evidence, Many Remaining Questions. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.7869
15. SARS-CoV-2 Diagnostic Pipeline. <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/> (ultimo accesso: maggio 2020).
16. ESCMID Emerging Infections Task Force (EITaF): outbreak news (10 May 2020). COVID-19 Serology—where are we? https://www.escmid.org/research_projects/emerging_infections_task_force (ultimo accesso: maggio 2020).
17. ELAS-Italia. SARS-CoV-2 diagnostica sierologica SCHEDE TECNICHE. <https://www.elasitalia.it/news/sars-cov-2-sierologia> (ultimo accesso: maggio 2020).
18. Zhai P, Ding Y, Wu X, et al. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020 doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105955.
19. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020 doi:10.1002/jmv.25727.
20. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.053.
21. Theel ES, Slev P, Wheeler S et al. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol* 2020 doi:10.1128/JCM.00797-20.
22. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020 doi:10.1111/jth.14768.
23. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0198
24. Frater JL, Zini G, d'Onofrio G, et al. COVID-19 and the clinical hematology laboratory. *Int J Lab Hematol*. 2020;42:Suppl1:11-8.
25. McGonagle D, Sharifa K, O'Regan A, et al. The Role of cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun Rev* 2020;19:102537.
26. Arnaldez FI, O'Day SJ, Drake CG et al. The Society for Immunotherapy of Cancer perspective on regulation of interleukin-6 signaling in COVID-19-related systemic inflammatory response. *J Immunother Cancer* 2020 doi:10.1136/jitc-2020-000930.
27. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:342-7.
28. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, et al. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med* 2011;26:73-87.
29. Liu B, Li M, Zhou Z et al. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J Autoimmun*. 2020;111:102452.
30. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020 doi:10.1001/jama.2020.2648
31. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2020 doi:10.1016/j.pcad.2020.03.001
32. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med* 2020;38:1504-7.
33. Morelli B, MSontaruli B, Bazzan M, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.056.
34. Montaruli B, Morelli B, Marchetti M, et al. Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19 *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.073.
35. Zanolla L, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico di COVID-19 *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.063.
36. Kim IC, Kim JY, Kim HA, et al. COVID-19-related myocarditis in a 21-year-old female patient. *Eur Heart J*. 2020;41:1859.
37. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
38. AAVV. Troponine cardiache: attualità e prospettive. *Biochim Clin* 2020;44 SS1.
39. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac involvement in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 2020;5:1-6.
40. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: coronaviruses and blood safety. *Transfus Med Rev* 2020;34:75-80.
41. Burnett LC, Lunn G, Coico R. Biosafety: guidelines for working with pathogenic and infectious microorganisms. *Current Protocols in Microbiology* 2009;Chapter 1:Unit 1A.1. doi:10.1002/9780471729259.mc01a01s13.
42. Stanziale S, Bianculli AG, Magaldi A et al. Società scientifica Italiana dei tecnici di laboratorio biomedico' DPI nelle linee guida ISPSP e raccomandazioni ISS e WHO per il contenimento della trasmissione di Covid 19 - Raccomandazioni dell'associazione Tecnico Scientifica S.I.T.L.a.B N.2/29i0 IT VER rev 1.0; 15 marzo 2020. <http://www.sitlab.it> (ultimo accesso: maggio 2020).
43. Brienen NC, Timen A, Wallinga J, et al. The effect of mask use on the spread of influenza during a pandemic. *Risk Anal* 2010;30:1210-8.
44. Rebmann T, Carrico R, Wang J. Physiologic and other effects and compliance with long-term respirator use among medical intensive care unit nurses. *Am J Infect Control* 2013;4:1218-23.
45. Directory COVID-19. <https://www.bbmri.it/biobanche-covid19/> (ultimo accesso: maggio 2020).
46. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331500> (ultimo accesso maggio 2020).
47. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138> (ultimo accesso maggio 2020).
48. Istituto Superiore di Sanità. Raccomandazioni per

raccolta, trasporto e conservazione di campioni biologici COVID-19. Versione del 15 aprile 2020. Gruppo di lavoro ISS Ricerca traslazionale COVID-19 2020, 19 p. Rapporti ISS COVID-19 n. 13/2020. <http://iss.it> (ultimo accesso: aprile 2020).

49. Bellini C, Nannini S, Berardi M et al. Il "Libro Bianco" dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020; DOI:10.19186/BC_2020.042
50. Capobianchi MR, Rueca M, Messina F, et al. Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2020 doi:10.1016/j.cmi.2020.03.025.

SARS-CoV-2: nuove prospettive della diagnostica di laboratorio

Bruna Lo Sasso^{1,2}, Rosaria Vincenza Giglio¹, Caterina Maria Gambino¹, Giulia Bivona¹, Marcello Ciaccio^{1,2}

¹Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Sezione di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Palermo, Italia.

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOUP "Paolo Giaccone" di Palermo, Palermo, Italia.

ABSTRACT

SARS-CoV-2: new perspectives for the clinical laboratory diagnostics. The new Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by the virus SARS-CoV-2, is characterized by a broad spectrum of clinical manifestations and different degrees of severity, ranging from asymptomatic/mild symptoms to Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Multiple Organ Failure (MOF), potentially life-threatening. The clinical course of COVID-19 includes usually three stages. The first stage, defined as "early infection", occurs at the time of virus infiltration in the lung parenchyma, via the interaction of SARS-CoV-2 with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in ciliated bronchial epithelial cells. The second step, the "pulmonary phase", is characterized by viral pneumonia with localized inflammation within the lung. The third stage, the "hyperinflammation phase", is the most severe because of the development of a systemic inflammation and cytokine overproduction leading to ARDS and MOF.

In this complex contest, the laboratory can provide a strong support for the appropriate clinical management of COVID-19 for diagnosis, prognosis, and monitoring of the disease. Current research focuses on the potential role of immune and/or inflammatory biomarkers as useful tools in COVID-19 patients. In this narrative review, we will provide an overview about some of these biomarkers: procalcitonin, mid regional-pro adrenomedullin, presepsin, soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor, ACE2, interleukin-6 and vitamin D.

INTRODUZIONE

Nel dicembre del 2019, nella città di Wuhan, una provincia di Hubei situata nella Cina centro-orientale, si è diffuso un focolaio epidemico di polmonite atipica ad eziologia sconosciuta. Nella prima decade del mese di gennaio è stato reso noto che l'agente eziologico era riconducibile ad un nuovo ceppo di CoronaVirus (CoVs), denominato ufficialmente SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - CoronaVirus - 2) dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (1). Tale patogeno è responsabile, in più del 40% dei casi, dello sviluppo di una sindrome respiratoria acuta (Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS) dai risvolti prognostici non sempre favorevoli.

Le prime ipotesi, relative all'espansione di una infezione virale dalla città di Wuhan, hanno identificato il possibile focolaio nel mercato di pesce e di animali vivi venduti a scopo alimentare in quell'area geografica. L'11 marzo 2020 la rapida diffusione del virus a livello

mondiale, associata ad un elevato indice di mortalità, ha indotto l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a dichiarare lo stato di pandemia, conosciuta oggi con il termine generico COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Ad oggi sono stati confermati 23 673 902 casi in tutto il mondo di cui 261 174 in l'Italia, collocata al diciannovesimo posto per numero di contagiati rispetto a tutti i Paesi interessati (2).

Caratteristiche del SARS-CoV-2

I CoronaViruses sono virus a RNA in grado di contagiare sia gli esseri umani che un'ampia varietà di animali. Questi patogeni possono causare infezioni delle vie respiratorie, del tratto gastrointestinale, del sistema epatico e del sistema nervoso, con manifestazioni cliniche differenti che vanno dalla sindrome influenzale alla SARS ed alla sindrome respiratoria mediorientale (Middle East Respiratory Syndrome - MERS). Queste ultime sono state protagoniste di due epidemie causate

Corrispondenza a: Marcello Ciaccio, Dipartimento di Biomedicina, Università di Palermo, Via del Vespro, 129, 90127 Palermo. E-mail marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 16.07.2020

Revisionato: 12.08.2020

Accettato: 27.08.2020

Publicato on-line: 16.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.082

da coronavirus, la SARS che si è manifestata improvvisamente in Cina tra il 2002 e il 2003 e la MERS scoppiata nel 2012 in Arabia Saudita (3, 4).

Il nome "Coronavirus" deriva dalla presenza nei virioni della proteina S ("spike protein") del peplomero virale che genera, al microscopio elettronico, un'immagine che ricorda una corona reale. Attualmente, sono noti 7 CoVs, molto comuni in specie animali come cammelli e pipistrelli che, in taluni casi, possono subire delle modifiche nel patrimonio genetico diventando idonei per essere trasmessi all'uomo. Quattro dei 7 CoVs (HCoV-NL63, -229E, -OC43 e -HKU1) sono responsabili di infezioni lievi e autolimitanti delle vie respiratorie superiori; in taluni casi, possono peraltro causare gravi infezioni delle vie respiratorie inferiori, in categorie a rischio (neonati, anziani e individui immunocompromessi). SARS-CoV-2 appartiene al genere dei betaCoronaVirus (β -CoV), agenti virali rivestiti da un "Envelope", costituiti da una singola catena di RNA a singolo filamento a polarità positiva e con un diametro di 60-140 nm. Secondo recenti studi, il genoma del SARS-CoV-2 mostra una omologia genetica del 79% con il CoVs della SARS (SARS-CoV), del 52% con il virus della MERS (MERS-CoV) e dell'87% con il genoma di un CoVs SARS-like identificato nel 2015 nella città di Zhoushan (Repubblica Popolare Cinese) (5).

Trasmissione e manifestazioni cliniche del SARS-CoV-2

Diverse ipotesi suggeriscono una diffusione mediata da vettori quali i pipistrelli, serpenti e pangolini (6-8). Una volta trasmesso all'uomo, il contagio avviene attraverso le secrezioni, principalmente tramite goccioline d'aerosol provenienti dalle vie respiratorie di un soggetto infetto

e/o con il contatto di superfici contaminate. Il periodo di incubazione è stimato da 1 a 14 giorni dal primo incontro con il patogeno.

Il virus riesce a penetrare nella cellula tramite il legame della spike protein con alcuni recettori cellulari. Recenti studi individuano la proteina Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2), come possibile recettore di membrana per SARS-CoV e mediatore dell'ingresso del virus nella cellula (6, 9). Una volta penetrato all'interno della cellula, l'RNA genomico a polarità positiva viene tradotto con conseguente sintesi di una polimerasi virale necessaria per la formazione dell'RNA a polarità negativa, utilizzato a sua volta come stampo per ogni singolo mRNA monocistronico. Le singole proteine virali e l'RNA genomico vengono successivamente assemblati nell'apparato del Golgi ed i nuovi virus vengono trasportati alla superficie della cellula e rilasciati nell'ambiente extracellulare.

L'infezione determina alterazioni patologiche, più o meno gravi, in differenti organi (Figura 1).

È possibile osservare forme di congiuntivite, perdita dell'olfatto e disturbi gastrointestinali. Nei polmoni si osserva essudato fibromixoido con infiltrato di monociti e macrofagi a livello alveolare ed iperplasia degli pneumociti di tipo 2, alcuni dei quali presentano inclusioni virali visibili anche a livello macrofagico. Alterazioni analoghe sono evidenziabili anche a livello bronchiale, in cui oltre alla presenza di inclusioni virali a livello cellulare, è possibile identificare desquamazione delle cellule epiteliali e abbondante produzione di muco. Queste modificazioni a livello polmonare spiegano l'insufficienza respiratoria acuta. È possibile evidenziare, inoltre, un aumento degli indici sierici di danno epatocellulare e di danno renale. Contestualmente, a livello cerebrale è possibile identificare degenerazione

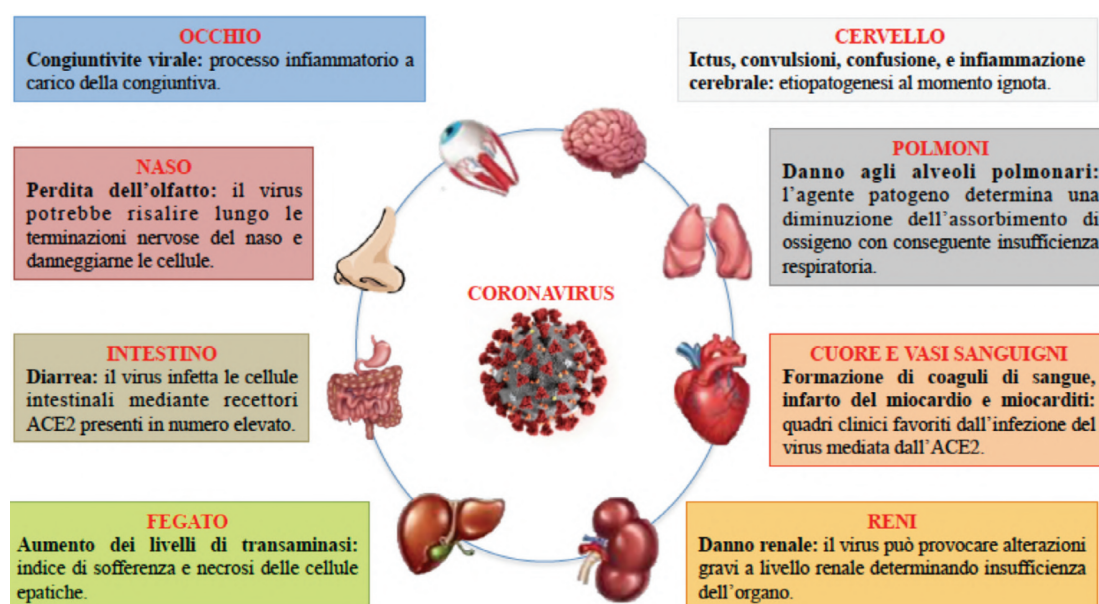


Figura 1. Principali organi coinvolti nell'infezione dall'agente virale SARS-CoV-2.

neuronal ad etiopatogenesi ignota (10, 5).

Altri organi possono subire la presenza dell'agente patogeno. La milza si presenta di ridotto volume con aree di necrosi, linfocitopenia e aumentato numero dei macrofagi. A livello linfonodale si osserva una riduzione del numero dei linfociti, uno stato di pancitopenia e un midollo osseo ipocellulare. Infiltrati monocitici e di neutrofili sono presenti a livello dell'interstizio miocardico ed epatico, in cui si possono osservare aree di degenerazione e necrosi (5). Recenti evidenze associano l'infezione da SARS-CoV-2 ad un quadro vasculitico virale in cui la replicazione virale è responsabile di una condizione infiammatoria sistemica che si associa ad uno stato di ipercoagulabilità con la formazione di microemboli polmonari, infarto acuto del miocardio e miocarditi (11).

Studi autoptici condotti su pazienti COVID-19 documentano la rilevanza di questi processi fisiopatologici sull'outcome dell'infezione (12). In tale contesto, l'identificazione di una fase precoce della Coagulopatia Intravascolare Disseminata (CID) indotta dallo stato settico covid-associato (Sepsis Induced Coagulopathy - SIC), proposta dalla International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH), potrebbe avvalersi della misura di biomarcatori di disfunzione d'organo in grado di identificare tale quadro clinico (13).

Il quadro clinico può essere accompagnato, inoltre, da uno stato di iperglicemia con alterata funzionalità dei neutrofili (14); in particolare, il sistema respiratorio di soggetti diabetici COVID-19 positivi sembrerebbe essere maggiormente predisposto a fenomeni microangiopatici con conseguente riduzione degli scambi gassosi e della compliance polmonare (9, 15).

Sintomatologia da infezione da SARS-CoV-2

I sintomi più comuni sono rappresentati da rialzo termico della temperatura corporea (88,5%), tosse secca (68,6%), astenia e mialgia (35,8%), congestione nasale (28,2%) e diarrea (4,8%). Nei casi più gravi si osserva dispnea (21,9%), ipossiemia fino all'insufficienza respiratoria acuta, shock settico, acidosi metabolica, insufficienza multiorgano (78,1%) (Figura 1) (16).

I quadri clinici possono presentare una elevata variabilità con forme asintomatiche o lievi che non vengono riconosciute dall'individuo che contrae l'infezione virale. Da ciò deriva un numero non prevedibile di soggetti portatori della malattia clinicamente silenti, ma epidemiologicamente pericolosi perché in grado di trasmettere la malattia.

Le forme clinicamente moderate sono caratterizzate da lieve ipertermia e da uno stato di astenia, solitamente a prognosi favorevole che, raramente, evolvono in una forma di polmonite atipica. Nelle fasce di età intermedia può essere osservata una sintomatologia lieve e spesso atipica con sintomi gastrointestinali come vomito, diarrea e astenia (17). Le malattie allergiche, l'asma e la Broncopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) non rappresentano fattori di rischio per l'infezione da SARS-

CoV-2; diversamente, un'età avanzata e la co-presenza di patologie croniche pre-esistenti (ipertensione, malattie cardiache, diabete mellito, neoplasie) sono state associate a quadri clinici più severi che ne aggravano la prognosi (17).

L'indagine diagnostica ritenuta il gold standard secondo l'OMS, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e il Center for Disease Control and Prevention di Atlanta (CDC) è rappresentato dalla individuazione, attraverso indagini di biologia molecolare, dell'RNA virale isolato da materiale biologico prelevato mediante tampone oro-faringeo e naso-faringeo.

Tale metodica è stata affiancata dall'indagine sierologica mediante metodi qualitativi e/o semi-quantitativi, per individuare la comparsa delle immunoglobuline sieriche di classe IgA, IgM ed IgG. Tale approccio presenta, ad oggi, diverse problematiche rappresentate da valori di specificità e sensibilità metodo-dipendenti e dalla comparsa più o meno tardiva delle differenti classi di immunoglobuline. Per tale motivo, l'indagine sierologica può essere considerata un valido aiuto nella sorveglianza epidemiologica, non utilizzabile per fini diagnostici, ma di supporto alle indagini molecolari.

Alla luce di quanto detto, nuovi studi volti a definire il tropismo virale, i meccanismi patogenetici ed i marcatori di infettività sono la premessa indispensabile per individuare il percorso diagnostico più idoneo e le terapie più efficaci al fine di bloccare la replicazione e la diffusione del virus. L'individuazione di biomarcatori, nuovi o già noti e proposti per altri contesti clinici, potranno essere strumenti utili nella stratificazione del rischio, nella prognosi e nel monitoraggio di terapie ad oggi ancora non ben definite aventi come obiettivo finale la cura del singolo paziente nonché la salvaguardia della salute pubblica (Tabella 1).

POTENZIALI BIOMARCATORI

Mid Regional-proADrenoMedullin

L'ADrenoMedullina (ADM), è un peptide sintetizzato, in condizioni di stress fisiologico, in differenti organi quali il cuore, la midollare del surrene, i polmoni, a livello renale e nell'endotelio vascolare. L'ADM, isolato e caratterizzato nel 1993 da tessuto di feocromocitoma, è stato inizialmente studiato per le sue proprietà vasodilatatorie. Successivi studi hanno messo in luce una possibile associazione tra l'ADM ed i meccanismi coinvolti nella risposta infiammatoria (18, 19). I lipopolisaccaridi e le citochine pro-infiammatorie, come il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF)- α e l'Interleuchina (IL)-1, promuovono rapidamente la produzione di ADM attraverso un aumento della sua espressione genica in diversi tessuti (20, 21).

Il rilascio di ADM nel flusso sanguigno regola il tono vascolare, garantendo un'adeguata perfusione d'organo. Inoltre, svolge un'attività antibatterica ed è implicato in meccanismi immunomodulatori inducendo processi apoptotici.

Tabella 1

Caratteristiche biochimico-cliniche note e possibile impiego di alcuni biomarcatori nella COVID-19.

Infezione da SARS-CoV-2			
Biomarcatore	Valenza clinica nota	Livelli circolanti	Possibile applicazione
Mid Regional-pro ADrenoMedullina (MR-proADM)	- Predittore precoce delle disfunzioni d'organo. - Utile nella valutazione della permeabilità endoteliale. - Utile nella stabilizzazione della microcircolazione durante i processi infiammatori.	↑	Possibile biomarcatore nella stratificazione del rischio nei pazienti affetti da polmonite per avviare il trattamento farmacologico più idoneo; nessuna conferma è presente in letteratura.
PreSePsina (PSP)	- Utile nella diagnosi e nella prognosi di sepsi, indica insufficienze d'organo. - Utile nel monitoraggio della sepsi e della risposta agli interventi terapeutici.	↑	Possibile biomarcatore per identificare quadri clinici severi e tempi di ricovero più lunghi (48).
Vitamina D (VIT D)	- Ruolo immunomodulatore ed anti-infiammatorio.	↓	Utile per ridurre il rischio di infezioni inducendo la sintesi di citochine anti-infiammatorie, inibendo le citochine pro-infiammatorie responsabili dell'infiammazione a livello polmonare e stimolando l'azione di catelicidine e defensine (50-59).
ProCalciTonina (PCT)	- Utile nella diagnosi differenziale delle patologie polmonari. - Utile nell'impiego della terapia antibiotica.	↑	Possibile biomarcatore per identificare quadri clinici più severi (66).
InterLeuchina 6 (IL-6)	- Fattore chiave nell'ambito dell'attivazione della risposta immunitaria.	↑	Possibile biomarcatore per identificare quadri clinici più severi (72, 73).
Enzima di Conversione dell'Angiotensina 2 (ACE2)	- Enzima chiave nella regolazione del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone mediando effetti di vasodilatazione, inibizione della fibrosi polmonare ed azione antinfiammatoria.	↓	Possibile fattore di infettività ed invasività mediando l'ingresso del virus nella cellula ospite (78-83).
Soluble Fms-Like Tyrosine kinase 1/ PLacental Growth Factor (sFLT1/PLGF)	- Utile punteggio nell'identificazione precoce di uno stato di preeclampsia.	↑	Possibile indice di disfunzione endoteliale conseguente ad alterato equilibrio di Angiotensina II e Angiotensina 1-7 (84).

Il gene ADM è localizzato nel braccio corto del cromosoma umano 11 (p11.1–3) ed è costituito da quattro esoni e tre introni. L'mRNA codifica le informazioni per la sintesi di un pre-pro-ormone di 185 aminoacidi, noto come pre-pro-adrenomedullina, che viene successivamente degradato in un peptide di 164 aminoacidi, chiamato pro-ADrenoMedullina (pro-ADM), attraverso la scissione del segnale peptide (21). Successivamente, per l'azione di una peptidasi endogena, il precursore proADM è scisso in quattro diversi peptidi: ADM, il Peptide AMinoterminale di Pro-adrenomedullina (PAMP), l' adrenotensina, e la Mid Regional-proADrenoMedullina (MR-proADM) (21). Le modifiche post-traduzionali determinano il rilascio di quantità equimolari di ADM e MR-proADM. Recentemente, è stato proposto un ruolo di marcatore di insufficienza d'organo al frammento MR-proADM, riconoscendo a quest'ultimo una stabilità maggiore rispetto all'ADM ed una più agevole determinazione della sua concentrazione in circolo (22, 23). I livelli sierici di ADM sono fisiologicamente bassi ma aumentano sotto stimolazione di vari fattori tra cui il rilascio di

catecolamine, presenza di ipossia, stress ossidativo, sintesi di mediatori infiammatori e citochine (24, 25). Tuttavia, la misurazione di ADM è tecnicamente impegnativa in quanto ha un'emivita plasmatica di 22 minuti, è rapidamente degradata dalle metalloproteasi presenti in circolo e si lega in maniera aspecifica alle superfici del tubo di raccolta, aumentando significativamente la sua adesività alle pareti; inoltre, circola legato alla proteina 1 di legame ADM (AdrenoMedullin binding Protein 1 - AMBP1) che lo rende inaccessibile a qualsiasi analisi immunometrica diretta (23, 24, 26-28). Il frammento MR-proADM è secreto in un rapporto 1:1 con ADM, presenta un'emivita più lunga di quest'ultima ed una stabilità maggiore in vitro. Per tali ragioni, la valutazione dell'MR-proADM è preferibile alla determinazione di ADM (22). Ricerche sull'MR-proADM hanno evidenziato delle buone prestazioni cliniche in termini di predittore di mortalità e prognostico in differenti condizioni, quali la polmonite acquisita in comunità (Community Acquired Pneumonia - CAP), la sepsi, l'insufficienza cardiaca e

l'infarto acuto del miocardio (29-37). Patologie croniche quali l'ipertensione, l'insufficienza renale, le patologie delle basse vie respiratorie e lo shock settico sono associate ad elevati livelli plasmatici di MR-proADM, la cui sintesi risulta up-regolata anche in relazione alla gravità del quadro clinico.

In considerazione dei dati presenti in letteratura, il frammento MR-proADM risulta essere un utile biomarcatore per la predizione precoce delle disfunzioni d'organo e per la valutazione della permeabilità endoteliale (38, 39). Inoltre, sembra svolgere azioni protettive in risposta allo shock causato da batteri e rivestire un ruolo chiave nella stabilizzazione della microcircolazione nei processi infiammatori attraverso il ripristino della stabilità endoteliale degli organi interessati (40-44). Un recente studio su 1 099 pazienti COVID-19 ha evidenziato una elevata frequenza di decessi (90% dei casi) riconducibili a sepsi e/o shock settico e Sindrome da Distress Respiratorio Acuto – ARDS (31). In tale coorte, la valutazione dei livelli plasmatici di MR-pro-ADM ha migliorato la stratificazione delle differenti condizioni cliniche, rivelandosi uno strumento utile per la predizione dell'outcome del paziente (31).

Per quanto differenti score clinici siano efficaci nella valutazione e stadiazione del quadro settico (CRB-65 e qSOFA, PSI, SOFA e APACHE), la misura di MR-proADM potrebbe essere un biomarcatore valido in termini di tempestivo trattamento di cura (45). In tale contesto, il suo utilizzo nella valutazione dei pazienti affetti dal SARS-CoV-2 potrebbe essere di elevato interesse speculativo in quanto, al momento attuale, non sono presenti dati di letteratura (Tabella 1).

Presepsina

La PreSePsina (PSP), nota anche come "Soluble Cluster of Differentiation 14-Sub Type"(sCD14-ST), è una glicoproteina di 55kDa espressa sulla superficie della membrana di monociti/macrofagi e neutrofili, generata dall'attività enzimatica delle proteasi e dal processo di fagocitosi in seguito al riconoscimento da parte del sistema immunitario di agenti patogeni per lo più di origine batterica e funginea. Dati di letteratura propongono la determinazione della PSP nei reparti di terapia intensiva ed in Pronto Soccorso, non solo per agevolare la diagnosi e la prognosi di sepsi, fornendo utili indicazioni su eventuali insufficienze d'organo, ma anche per il monitoraggio della malattia e della risposta agli interventi terapeutici (46, 47).

La PSP è caratterizzata da una cinetica molto rapida: il tempo di attivazione dall'insorgenza di un evento batterico e fungineo è di sole 2 ore, con un picco dei suoi livelli alla terza ora. Questa caratteristica la rende un biomarcatore precoce rispetto ad altri utilizzati nello stesso contesto clinico, come l'IL-6, il D-dimero, la Proteina C Reattiva (PCR) e la Procalcitonina (PCT) ed i suoi livelli possono essere correlati in maniera significativa con la gravità dell'infezione. Valori più elevati al primo giorno di monitoraggio sono strettamente

associati ad una più alta incidenza di danno d'organo ed una instabilità emodinamica nelle successive 24 ore. Inoltre, in relazione alla sua emivita (4-5 ore) risulta essere un indicatore più efficace e precoce per la gestione della terapia farmacologica rispetto ad altri marcatori (37, 48).

L'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe essere la causa diretta della disregolazione della risposta dell'ospite, responsabile della disfunzione d'organo. A tal proposito è stato condotto uno studio su 75 pazienti COVID-19 positivi, ricoverati in unità di terapia intensiva, in cui i primi dati sembrano supportare un ruolo prognostico della PSP nella casistica valutata, consentendo di identificare, per valori iniziali superiori a 250 ng/L, una severità maggiore e tempi di ricovero più lunghi ($p < 0,001$) (Tabella 1) (48).

Vitamina D

Vi sono diverse ipotesi a supporto di un'azione protettiva del colecalciferolo come ausilio nel trattamento dell'infezione da COVID-19 (49-51). Tali ipotesi nascono dal già noto ruolo immunomodulatore della vitamina D, da un suo potenziale effetto antivirale e da un'azione protettiva nei confronti delle infezioni respiratorie (52, 53). La vitamina D può ridurre, infatti, il rischio di infezioni up-regolando le concentrazioni di citochine anti-infiammatorie e inducendo l'azione di catelicidine e defensine, che possono ridurre i tassi di replicazione virale ed inibire le citochine responsabili dell'infiammazione a livello polmonare (54). Le prove a sostegno del ruolo della vitamina D nell'infezione da COVID-19 comprendono l'osservazione dell'evento epidemiologico nella stagione invernale, periodo in cui le concentrazioni di 25-idrossivitamina D (25(OH)D) sono più basse; l'evidenza che la carenza di vitamina D contribuisce alla sindrome da distress respiratorio acuto e i tassi di mortalità che aumentano con l'età e con la comorbidità delle malattie croniche, entrambe associate a una concentrazione più bassa di 25(OH)D (Tabella 1). In particolare, l'evidente maggiore gravità dell'infezione COVID-19 nelle zone del nord-Italia potrebbe essere correlata ad una maggiore carenza di vitamina D nel settentrione rispetto alle zone del meridione. In accordo con tali considerazioni, uno studio recente, ha raccolto i dati provenienti da 88 paesi, evidenziando una associazione significativa tra la latitudine delle regioni geografiche ed il tasso di mortalità per l'infezione da SARS-Cov2 nelle aree prese in esame (55).

Il diverso grado di mortalità potrebbe, dunque, dipendere da una esposizione differente alla luce solare, associata alla presenza di uno stato di ipovitaminosi D maggiore nei paesi a minor esposizione ai raggi UV (56, 57). Tuttavia, è bene ricordare che la presenza di eventuali polimorfismi genetici, associati ad intermediari chiave del metabolismo della vitamina D, potrebbe influenzare i suoi livelli indipendentemente dalla latitudine geografica (58-64).

Queste evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che una eventuale supplementazione con vitamina D

potrebbe influenzare positivamente il decorso di questa grave infezione virale (56). In tale contesto potrebbe essere di rilevante interesse scientifico valutare l'azione di una eventuale integrazione di vitamina D, in situazioni di carenza e/o di insufficienza dei suoi livelli, al fine di monitorare il rischio infettivo e/o di complicanze associate all'infezione da SARS-CoV-2.

Procalcitonina

E' noto che i livelli di PCT, il precursore dell'ormone calcitonina, aumentano in risposta all'infiammazione sistemica, in particolare di origine batterica e sono risolutivi nei casi di scompenso cardiaco, in assenza di sospette e contemporanee infezioni. In particolare, l'utilizzo della PCT è utile nella diagnosi differenziale delle differenti forme di polmonite ed in un eventuale avvio di terapia antibiotica (65). La PCT sembra avere, inoltre, un ruolo importante nelle infezioni virali, dimostrandosi un promettente biomarcatore nell'identificazione di quadri più severi dell'infezione da SARS-CoV-2. La produzione di PCT aumenta durante le infezioni batteriche, in quanto il suo rilascio è stimolato da elevate concentrazioni di IL-1B, TNF-alfa e IL-6, ed è invece inibita dall'Interferone gamma (IFN- γ), le cui concentrazioni aumentano durante le infezioni virali. I risultati di una metanalisi, che include 4 studi, suggeriscono che misurazioni seriali della PCT possano essere uno strumento utile per individuare quadri clinici più severi (66). La PCT sembra, infatti, rientrare nei valori di riferimento nei pazienti con forme SARS-CoV-2 lievi, ed aumentare in co-presenza di infezione batterica, identificando quadri generali clinici più severi (66) (Tabella1). Ulteriori studi dovranno supportare le poche evidenze presenti al momento in letteratura.

Interleuchina-6

Successivamente all'infezione da SARS-CoV-2, alcuni individui producono una quantità di citochine infiammatorie moderata ma, sufficiente ad attivare il sistema immunitario contro il virus, andando incontro a remissione dalla malattia (soggetti paucisintomatici). In altri casi (soggetti in cui spesso sono presenti patologie croniche pre-esistenti) le citochine infiammatorie vengono sintetizzate in quantità elevate, provocando in taluni casi "tempeste citochiniche". Le citochine pro-infiammatorie in eccesso sono in grado di danneggiare le cellule dell'epitelio polmonare provocando la formazione di "voragini" nelle pareti dei vasi che irrorano i polmoni determinando un forte accumulo di liquido nei polmoni stessi. Questi pazienti vanno, quindi, incontro a sindrome da distress respiratorio acuto, necessitando della terapia intensiva con ventilazione meccanica. In condizioni cliniche particolarmente critiche quantità elevate di citochine infiammatorie vengono riversate dai polmoni all'interno della circolazione raggiungendo altri organi e provocando una disfunzione multiorgano, che risulta essere la causa dell'elevata incidenza di mortalità in soggetti con problemi respiratori (67, 68).

In tale contesto svolge un ruolo di primaria importanza l'IL-6 che, in seguito all'infezione virale, viene sintetizzata e rilasciata da diversi tipi cellulari, tra cui le cellule dendritiche e i macrofagi del sistema immunitario innato. Una volta prodotta, l'IL-6 lega il suo recettore (IL-6R), presente sulla superficie di varie cellule, attivando numerose azioni pro-infiammatorie, tra cui la produzione da parte dei fibroblasti del fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) con conseguente aumento della permeabilità dei vasi endoteliali, la sintesi di ulteriori proteine pro-infiammatorie e pro-coagulanti nel fegato, la sintesi di anticorpi diretti contro il virus da parte dei linfociti B e l'attivazione dei linfociti T helper 17 (Th17), in grado di eliminare le cellule infettate dal virus. Un'azione moderata e transitoria dell'IL-6 è preziosa per attivare il sistema immunitario, ma un'azione spropositata e prolungata di questa citochina può provocare effetti devastanti. Infatti, oltre a causare un'eccessiva permeabilità dei vasi con conseguente accumulo di fluidi negli organi, l'IL-6 può, nel tempo, attivare il sistema immunitario in modo aberrante inducendo la produzione di anticorpi e linfociti T non soltanto a sfavore degli agenti infettivi, ma, anche, contro molecole "self". Da ciò deriva il ruolo chiave dell'IL-6 nell'ambito di diverse malattie autoimmuni, tra cui l'artrite reumatoide e la conseguente necessità, negli ultimi anni, di promuovere la ricerca di nuovi farmaci in grado di bloccare l'attività di questa citochina (69-71).

Il Tocilizumab è uno dei farmaci più efficaci in grado di regolare l'IL-6. Esso è un anticorpo monoclonale in grado di legare IL-6. Tale legame blocca il meccanismo di trasduzione del segnale mediato dalla citochina, inibendo la sua azione pro-infiammatoria. Il Tocilizumab viene comunemente utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide, in caso di inefficacia o di tossicità di altri farmaci anti-infiammatori, rallentando il decorso della malattia.

Nell'ambito dell'infezione da SARS-CoV-2, elevati livelli di IL-6 sono stati messi in correlazione alla presenza di quadri clinici particolarmente severi. In particolare, il processo infiammatorio innescato dall'agente patogeno è caratterizzato non solo dalla risposta immunitaria innata ma anche dall'attivazione dell'immunità mediata dalle cellule T helper. Infatti, la via di segnalazione Delta Like 4 (DLL4)/Notch rappresenta un importante induttore della polarizzazione dei macrofagi M1 (72). Nei macrofagi, Notch1 sembra legare in maniera diretta il promotore dell'IL-6 in risposta all'IFN- γ , regolando positivamente la produzione di IL-6 (73). Esperimenti in vitro e in vivo hanno dimostrato che l'inibizione di Notch1, mediata dagli Inibitori delle Gamma-Secretasi (GSI) o da anticorpi anti-DLL4, determina una attenuazione dei processi infiammatori. In questo scenario, la possibilità di associare inibitori di Notch1 e anti-IL-6 sembra poter costituire un approccio terapeutico innovativo (Tabella 1).

Ulteriori evidenze scientifiche hanno suggerito che l'inibizione della via di segnalazione dell'IL-6 in pazienti

positivi al COVID-19 potrebbe migliorare l'attività citotossica delle cellule Natural Killer (NK), componenti cellulari indispensabili nell'immunità innata e nella risposta a differenti infezioni virali (74). In tale contesto, alcuni autori hanno osservato che i livelli sierici di IL-6 sono inversamente correlati alla funzione delle cellule NK ed in particolare, il trattamento con Tocilizumab ne migliora la loro funzionalità in vitro (75, 76).

Le prime evidenze scientifiche sull'utilizzo del Tocilizumab in pazienti COVID-19 hanno messo in luce un significativo miglioramento del quadro clinico, per quanto gli studi siano attualmente in corso, e pur osservando risultati promettenti, un'analisi più lunga nel tempo e su un numero più ampio di pazienti sarà necessaria per trarre ulteriori conclusioni (77).

Enzima di Conversione dell'Angiotensina 2

Pazienti positivi al SARS-CoV-2 con insufficienza renale, dializzati o trapiantati di rene hanno un rischio più elevato di evolvere in forme cliniche più severe. È noto che l'infezione da SARS-CoV-2 sia associata al Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS) coinvolgendo l'azione dell'ACE2, che, fisiologicamente, contrasta l'attivazione del sistema RAAS e, in presenza del virus SARS-CoV-2 funge da recettore mediando l'ingresso del patogeno nella cellula ospite (78).

Il meccanismo attraverso il quale il virus danneggia l'apparato renale è probabilmente connesso alla presenza del virus in loco. Ciò è giustificato dal numero elevato di ACE2 a livello delle cellule tubulari e nelle cellule epiteliali del glomerulo, che mediano e permettono l'ingresso del virus nelle cellule, attivando un meccanismo di tossicità diretta del virus (79). Studi sperimentali hanno messo in evidenza che SARS-CoV-2 determina un decremento dell'attività mediata dall'ACE2, in particolare a livello polmonare e miocardico promuovendo, in tali distretti, processi infiammatori (80). La perdita funzionale di ACE2 è causata dall'endocitosi dell'enzima ACE e dell'agente virale permettendo l'ingresso del virus all'interno della cellula e determinando una riduzione delle molecole di ACE2 espresse sulla superficie cellulare (81, 82).

In tale contesto sembrerebbe plausibile ritenere che una down-regulation di ACE2, mediata da SARS-CoV-2, possa indurre una maggiore suscettibilità tissutale all'infiammazione (Tabella 1).

Citochine e mediatori dell'infiammazione possono danneggiare il parenchima renale sia direttamente (infiltrati infiammatori a livello del rene, segni di attivazione della cascata del complemento con danno endoteliale e lesioni riconducibili all'azione delle citochine pro-infiammatorie presenti in circolo) che indirettamente (danno mediato da ipossia, shock e rhabdmiolisi) determinando un aumento della microcoagulazione del sangue in diversi organi, tra cui il rene. Per tale motivo, il trattamento con enoxaparina potrebbe dimostrarsi un utile supporto per controllare il tromboembolismo consequenziale (83). Analogamente, l'utilizzo degli inibitori dell'ACE (ACE I) e gli antagonisti

del recettore dell'angiotensina II (ARB) necessitano di un approfondimento maggiore. Al momento, infatti, si ipotizza che l'impiego di questi farmaci possa determinare una sovraespressione di ACE2, inducendo un aumento nella produzione di Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (fattore anti-infiammatorio) e riducendo i livelli locali di angiotensina II (Ang II), (fattore pro-infiammatorio). D'altra parte sarà importante valutare se l'up-regulation di ACE2, indotta dai farmaci, possa favorire l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule.

In considerazione alle complesse interazioni tra SARS-CoV-2 e RAAS evidenziate dagli studi sperimentali finora disponibili, solo evidenze scientifiche ottenute con dati clinici ed epidemiologici potranno fare chiarezza in questo ambito ed eventualmente guidare specifiche strategie terapeutiche.

È, altresì, interessante evidenziare che l'alterazione a livello renale potrebbe scaturire da una tossicità derivata dai differenti trattamenti farmacologici a cui vengono sottoposti i pazienti affetti da COVID-19 (84).

Rapporto Soluble Fms-Like Tyrosine kinase 1/PLacental Growth Factor

La preeclampsia è una condizione caratterizzata da una alterazione nello sviluppo dell'angiogenesi placentare causato da uno squilibrio tra fattori pro-angiogenici, come il PLacental Growth Factor (PLGF) e fattori anti-angiogenici, come ad esempio il soluble Fms-Like Tyrosine kinase 1 (sFLT1). Entrambe queste proteine possono essere determinate nel siero materno per ottenere un punteggio (sFLT-1/PLGF) utile nell'identificazione precoce di uno stato di preeclampsia. Maggiore è il predominio dei fattori anti-angiogenici, più elevata è la probabilità di sviluppare esiti avversi.

In pazienti COVID-19 l'AngII media una secrezione anormale di sFLT-1 e un conseguente elevato rapporto sFLT-1/PLGF, causando uno squilibrio patologico tra fattori angiogenici e anti-angiogenici.

Uno studio su 19 pazienti COVID-19 ha mostrato un aumento dei valori di sFLT-1 nei pazienti COVID-19 rispetto ai pazienti con polmonite ma negativi per COVID-19 e controlli sani. I valori di PLGF non sono cambiati significativamente nei due gruppi ma il rapporto sFLT1/PLGF era aumentato significativamente ($p=0,00002$). Il danno endoteliale probabilmente dovuto a infezione diretta attraverso ACE2, si traduce in un aumento del rapporto s-FLT1/PLGF, a causa di uno squilibrio patologico tra AngII e Ang1-7 (Tabella 1) (85). Ulteriori studi sono necessari per supportare le poche evidenze oggi presenti in letteratura.

CONCLUSIONI

L'infezione da SARS-CoV-2 può manifestarsi sotto differenti forme cliniche, con soggetti asintomatici e soggetti in cui la comparsa di una tempesta citochinica si riflette in quadri clinici gravi che possono giungere ad esiti infausti. Per tale motivo e per la natura pandemica dell'infezione è possibile definirla una patologia infettiva

grave, complessa e multifattoriale che prevede un approccio multidisciplinare, dove le differenti competenze professionali sono chiamate a fornire il loro contributo nella risoluzione di un "puzzle" clinico eterogeneo. L'obiettivo principale, in tale contesto, è comprendere in maniera rapida la suscettibilità/ricettività/infettività soggettiva del patogeno virale, identificando biomarcatori che possano supportare la diagnosi eziologica dell'infezione e, contestualmente, la sorveglianza epidemiologica nel tempo attraverso la diagnostica sierologica (86, 87). Nonostante la ricerca in questo campo stia facendo passi da gigante, la strada da percorrere per il raggiungimento dell'obiettivo prevede ulteriori approfondimenti. A tal proposito, sarà utile considerare altri biomarcatori, oltre a quelli trattati nel presente manoscritto, utili nell'identificazione precoce di complicanze cardiovascolari e/o di eventuali comorbidità preesistenti (diabete, ipertensione, dislipidemia, danno d'organo, disordini della coagulazione e neurologici) per definire protocolli diagnostici e terapeutici efficaci volti al raggiungimento del più alto livello possibile di esiti positivi (87-100).

BIBLIOGRAFIA

- Rocklov J, Sjodin H, Wilder-Smith A. COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship: estimating the epidemic potential and effectiveness of public health countermeasures. *J Travel Med* 2020 taaa030. doi: 10.1093/jtm/taaa030.
- HealthMap COVID-19. Updated 2020-07-16. <https://www.healthmap.org/covid-19/> (ultimo accesso: agosto 2020)
- Zhong N, Zheng B, Li Y, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet* 2003;362:1353-8.
- Wang N, Shi X, Jiang L, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res* 2013;23:986-93.
- Shi-xin Wang, Yan Wang, Yu-bao Lu et al. Diagnosis and treatment of novel coronavirus pneumonia based on the theory of traditional Chinese medicine. *J Integr Med* 2020;S2095-4964:30037-46.
- Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;14:126-35.
- Ji W, Wang W, Zhao X, et al. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol* 2020;92:433-40.
- Liu Y, Yang Y, Zhang C, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* 2020;63:364-74.
- 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;12:8.
- Special Expert Group for Control of the Epidemic of Novel Coronavirus Pneumonia of the Chinese Preventive Medicine Association. An update on the epidemiological characteristics of novel coronavirus pneumonia (COVID-19). *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2020; 41:139-44.
- Jian-Wei W, Bin C, Chen W. Science in the fight against the novel coronavirus disease. *Chin Med J* 2020;133:1009-11.
- Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1989-94.
- Badawi A, Ryou SG. Prevalence of diabetes in the 2009 influenza A (H1N1) and the Middle East respiratory syndrome coronavirus: a systematic review and meta-analysis. *J Public Health Res* 2016;5:733.
- Ardigo D, Valtuena S, Zavaroni I, et al. Pulmonary complications in diabetes mellitus: the role of glycaemic control. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:455-8.
- Sriram K, Insel PA. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br J Pharmacol* 2020. doi: 10.1111/bph.15082.
- Long-Quan Li, Tian Huang, Yong-Qing Wang, et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol* 2020;92:577-83.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:553-60.
- Ishimitsu T, Minami J, Nishikimi T et al. Changes in plasma adrenomedullin in physiological and pathological conditions in human subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34:S47-51.
- Zudaire E, Portal-Núñez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Boil* 2006;80:237-44.
- Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez JF, et al. New role of biomarkers: Mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann Transl Med* 2016;4:329.
- Pilotto A, Dini S, Veronese N, et al. Multidimensional Prognostic Index (MPI) and proadrenomedullin plasma levels in predicting one-month mortality risk in older patients hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP): a prospective study. *Panminerva Med* 2018;60:80-5.
- Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, et al. Adrenomedullin-RAMP2 system in vascular endothelial cells. *Atheroscler Thromb* 2015;22:647-53.
- Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 2001;22:1693-711.
- Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem* 2001;276:12292-300.
- Lewis LK, Smith MW, Brennan SO, et al. Degradation of human adrenomedullin (1-52) by plasma membrane enzymes and identification of metabolites. *Peptides* 1997;18:733-9.
- Martínez A, Oh HR, Unsworth EJ, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 2004;383:413-8.
- Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005;51:1823-9.
- Self WH, Storrow AB, Hartmann O, et al. Plasma bioactive adrenomedullin as a prognostic biomarker in acute heart failure. *Am J Emerg Med* 2016;34:257-62.
- Nishikimi T. Adrenomedullin in the kidney-renal physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem* 2007;14:1689-99.
- Bernal-Morell E, García-Villalba E, Vera MD, et al.

- Usefulness of midregional pro-adrenomedullin as a marker of organ damage and predictor of mortality in patients with sepsis. *J Infect* 2018;76:249-57.
31. Legramante JM, Mastropasqua M, Susi B, et al. Prognostic performance of MR-proadrenomedullin in patients with community acquired pneumonia in the Emergency Department compared to clinical severity scores PSI and CURB. *PLoS One* 2017;12:e0187702.
 32. Tzikas S, Keller T, Ojeda FM, et al. MR- proANP and MR-proADM for risk stratification of patients with acute chest pain. *Heart* 2013;99:388-95.
 33. Khan SQ, O'Brien RJ, Struck J, et al. Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1525-32.
 34. Breslow MJ, Badawi O. Severity scoring in the critically ill: part 1 – interpretation and accuracy of outcome prediction scoring systems. *Chest* 2012; 141:245-52.
 35. Bellia C, Agnello L, Lo Sasso B, et al. Mid-regional Pro-Adrenomedullin predicts poor outcome in non-selected patients admitted to an intensive care unit. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57:549-55.
 36. Agnello L, Bivona G, Parisi E, et al. Presepsin and Midregional Proadrenomedullin in pediatric oncologic patients with febrile neutropenia. *Lab Med*. 2020 doi:10.1093/labmed/lmaa011.
 37. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, David I, et al. Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med*2007;33:703-10.
 38. Muller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, et al. Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care* 2014;18: R73.
 39. Vallet B. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med*. 2002;30:S229-34.
 40. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, et al. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol*. 2006;168:1921-30.
 41. Carrizo GJ, Wu R, Cui X, et al. Adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 downregulate inflammatory cytokines and attenuate tissue injury after gut ischemia-reperfusion. *Surgery*. 2007;141:245-53.
 42. Brell B, Hippenstiel S, David I, et al. Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-- an intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Crit Care Med*. 2005;33:2810-16.
 43. Pugin J. Adrenomedullin: a vasodilator to treat sepsis? *Crit Care*. 2014;18:152.
 44. Guan WG, Zhong NS. Clinical Characteristics of Covid-19 in China. Reply. *N Engl J Med* 2020;382(19):1861-2.
 45. Carpio R, Zapata J, Spanuth E, et al. Utility of Presepsin (sCD14-ST) as a Diagnostic and Prognostic Marker of Sepsis in the Emergency Department. *Clin Chim Acta* 2015;450:169-75.
 46. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-55.
 47. Memar MY, Baghi HB. Presepsin: A promising biomarker for the detection of bacterial infections. *Biomed Pharmacother* 2019;111:649-56.
 48. Zaninotto M, Mion MM, Cosma C, et al. Presepsin in risk stratification of SARS-CoV-2 Patients. *Clin Chim Acta* 2020;507:161-3.
 49. Bivona G, Agnello L, Pivetti A, et al. Association between hypovitaminosis D and systemic sclerosis: True or fake? *Clin Chim Acta* 2016;458:115-9.
 50. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and extraskeletal actions of vitamin D: current evidence and outstanding questions. *Endocr Rev* 2019;40:1109-51.
 51. Watkins J. Preventing a covid-19 pandemic. We need to think beyond containment. *BMJ* 2020;368:m810. doi: 10.1136/bmj.m810.
 52. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017;356:i6583. doi: 10.1136/bmj.i6583.
 53. Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, et al. Evidence that Vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients* 2020;12:988.
 54. Giustina A, Formenti AM. Preventing a covid-19 pandemic. Can high prevalence of severe hypovitaminosis D play a role in the high impact of Covid infection in Italy? *BMJ* 2020;368:m810.
 55. Whittemore Paul. COVID-19 fatalities, latitude, sunlight, and vitamin D. *Am J Infect Control* 2020;196:30574-5.
 56. Marik PE, Kory P, Varon J. Does vitamin D status impact mortality from SARS-CoV-2 infection? *Med Drug Discov* 2020;6:100041.
 57. Dittadi R, Corbetta S, Banfi G, et al. Documento congiunto di SIBIOC, della Società Italiana dell'osteoporosi, del metabolismo minerale e delle malattie dello scheletro (SIOMMS), della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS), e della Associazione medici endocrinologi (AME) relativo alla nota AIFA 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di Vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione. *Biochim Clin* 2020 doi:10.19186/BC_2020.075.
 58. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, et al. CYP27A1, CYP24A1, and RXR- α Polymorphisms, Vitamin D, and Multiple Sclerosis: a Pilot Study. *J Mol Neurosci* 2018;66:77-84.
 59. Bivona G, Agnello L, Lo Sasso B, et al. Vitamin D in malaria: more hypotheses than clues. *Heliyon* 2019;5:e01183.
 60. Scazzone C, Agnello L, Ragonese P, et al. Association of CYP2R1 rs10766197 with MS risk and disease progression. *J Neurosci Res* 2018;96:297-304.
 61. Bivona G, Agnello L, Bellia C, et al. Non-skeletal activities of vitamin D: from physiology to brain pathology. *Medicina* 2019;55:341.
 62. Bivona G, Lo Sasso B, Iacolino G, et al. Standardized measurement of circulating vitamin D (25(OH)D) and its putative role as a serum biomarker in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2019;497:82-7.
 63. Scazzone C, Agnello L, Lo Sasso B, et al. Klotho and vitamin D in multiple sclerosis: an Italian study. *Arch Med Sci* 2019;16:842-7.
 64. Di Liberto D, Scazzone C, La Rocca G, et al. Vitamin D increases the production of IL-10 by regulatory T cells in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2019;37:76-81.
 65. Bivona G, Agnello A, Scazzone C, et al. Procalcitonin and Community-Acquired Pneumonia (CAP) in children. *Clin Chim Acta* 2015;451:215-8.
 66. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;505:190-1.

67. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017;39:529-39.
68. Maeve Rea I, Gibson DS, McGilligan V. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol* 2018;9:586
69. Toshio T, Masashi N, Tadimitsu K. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a016295.
70. Novo G, Bellia C, Fiore M, et al. A risk score derived from the analysis of a cluster of 27 serum inflammatory cytokines to predict long term outcome in patients with acute myocardial infarction: a pilot study. *Ann Clin Lab Sci* 2015;45:382-90.
71. Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, et al. Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis. *Front Immunol* 2019;10:1130.
72. Wongchana W, Palaga T. Direct regulation of interleukin-6 expression by notch signaling in macrophages. *Cell Mol Immunol* 2012;9:155-62.
73. Zhang C, Wu Z, Li JW, et al. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55:105954.
74. Di Bona D, Accardi G, Aiello A, et al. Association between γ marker, human leucocyte antigens and killer immunoglobulin-like receptors and the natural course of human cytomegalovirus infection: a pilot study performed in a Sicilian population. *Immunology*. 2018;153:523-31.
75. Cifaldi L, Prencipe G, Caiello I, et al. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67:3037-46.
76. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest* 2020;28:138554.
77. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020;181:271-80.
78. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367:1260-3.
79. Li Y, Zhou W, Yang L, et al. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 Receptor. *Pharmacol Res* 2020;157:104833.
80. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.067.
81. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ Res* 2020;126:1456-74.
82. Cheng Y, Luo R, Wang K, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int* 2020;97:829-38.
83. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, et al. Renin-Angiotensin-Aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2020;382:1653-9.
84. Giardini V, Carrer A, Casati M, et al. Increased sFLT1/PIGF ratio in COVID-19: a novel link to angiotensin ii-mediated endothelial dysfunction. *Am J Hematol* 2020 doi: 10.1002/ajh.25882.
85. Ciaccio M, Agnello L. Biochemical Biomarkers Alterations in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Diagnosis* 2020 doi: 10.1515/dx-2020-0057.
86. Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.052.
87. Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, et al. Galectin-3 in acute coronary syndrome. *Clin Biochem*. 2017;50:797-803.
88. Bivona G, Agnello L, Bellia C, et al. Diagnostic and prognostic value of H-FABP in acute coronary syndrome: still evidence to bring. *Clin Biochem* 2018;58:1-4.
89. Scazzone C, Agnello L, Ragonese P, et al. Association of CYP2R1 rs10766197 with MS risk and disease progression. *J Neurosci Res* 2018;96:297-304.
90. Bellia C, Zaninotto M, Cosma C, et al. Clinical usefulness of glycated albumin in the diagnosis of diabetes: Results from an Italian study. *Clin Biochem* 2018;54:68-72.
91. Agnello L, Bellia C, Lo Sasso B, et al. Establishing the upper reference limit of Galectin-3 in healthy blood donors. *Biochem Med* 2017;27:030709.
92. Agnello L, Bellia C, Scazzone C, et al. Establishing the 99th percentile for high sensitivity cardiac troponin I in healthy blood donors from Southern Italy. *Biochem Med* 2019;29:020901.
93. Bivona G, Bellia C, Lo Sasso B, et al. Short-term changes in Gal 3 circulating levels after acute myocardial infarction. *Arch Med Res* 2016;47:521-5.
94. Bellia C, Zaninotto M, Cosma C, et al. Definition of the upper reference limit of glycated albumin in blood donors from Italy. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:120-5.
95. Caruso A, Bellia C, Pivetti A, et al. Effects of EPHX1 and CYP3A4 polymorphisms on carbamazepine metabolism in epileptic patients. *Pharmacogenomics Pers Med* 2014;7:117-20.
96. Agnello L, Bivona G, Novo G, et al. Heart-type fatty acid binding protein is a sensitive biomarker for early AMI detection in troponin negative patients: a pilot study. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77:428-32.
97. Agnello L, Bivona G, Vidali M, et al. Monocyte distribution width (MDW) as a screening tool for sepsis in the Emergency Department. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0417.
98. Montaruli B, Morelli B, Marchetti M, et al. Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamentoeparinico dei pazienti con COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.073.
99. Morelli B, Montaruli B, Bazzan M, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.056.
100. Zanolta L, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico di COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.063.

Valutazione di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 su Maglumi 800 (Snibe)

Ferruccio Ceriotti¹, Alessio Maregnani¹, Marta Strollo², Massimo Locatelli²

¹Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Analisi, Milano

²Ospedale San Raffaele, Servizio di Medicina di Laboratorio, Milano

ABSTRACT

Evaluation of Anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin G and M on Snibe Maglumi 800

Introduction: the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a due to new beta-coronavirus causing the pandemic called Coronavirus disease 2019 (COVID-19). The evaluation of the presence of immunoglobulin G and M anti-SARS-CoV-2 (IgG and IgM) is important to understand the epidemiology of the disease and to confirm the presence of the disease when clinical signs are present, but RNA is not detected.

Methods: leftover serum samples from different types of patients were used: sera from biobank collected in 2018 as negative controls; patients recovering from the disease as positive controls; patients presenting at the Emergency Room with a positive rhino-pharyngeal swab; patients in Intensive Care Units. Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM were measured with MAGLUMI 2019-nCoV IgM/IgG Kits on Maglumi 800.

Results: one out of 61 expected negative resulted positive, and 2 were borderline for IgG (95% specificity, 95%CI 89.6-100), 1 positive for IgM (98.4% specificity, 95%CI 95.2-100); one out of 41 expected IgG positive resulted negative (97.6% sensitivity, 95%CI 92.8-100). All the 13 Intensive Care patients were positive for IgG, 11 for IgM. IgG were negative in 50.9% of the 55 swab positive from Emergency Room patients, while IgM were negative in 87.3%.

Discussion: sensitivity and specificity of the test appear good for IgG, some false positive is expected and low antibody titles in subjects with no disease story should be rechecked with an alternative method. IgM show a good specificity, but the unexpected low percentage of positivity in Emergency Room patients compared to IgG, pose some relevant doubts on the sensitivity of the test.

INTRODUZIONE

A partire dalla fine del mese di dicembre 2019, una serie di casi di polmonite ad eziologia non nota è stata segnalata nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina, ed è stata collegata ad un mercato di prodotti animali (1). Successivamente, un nuovo beta-coronavirus definito *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) è stato identificato come l'agente etiologico dell'epidemia e la malattia correlata è stata chiamata *coronavirus disease 2019* (COVID-19) (2). La diagnosi della malattia si effettua mediante la ricerca dell'RNA virale con metodi basati sulla real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (3). Per motivi tecnici, è stato impossibile effettuare tamponi a tutti gli individui sospettati di aver contratto questa patologia che, inoltre, decorre in modo asintomatico o paucisintomatico in una elevata percentuale di soggetti

(4). Diventa quindi sempre più necessario identificare i soggetti che sono venuti a contatto con il virus anche quando la malattia non è più in atto, soprattutto per comprendere la reale diffusione della malattia. La verifica della presenza di anticorpi di classe IgG o IgM e la loro quantificazione sono strumenti essenziali per ottenere questa informazione. Già alcuni metodi sono stati descritti in letteratura (5,6) e sono disponibili diverse proposte commerciali. Il metodo utilizzato in questo lavoro (Snibe MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays) è già stato valutato nelle sue caratteristiche tecniche (7,8). Lo scopo di questo lavoro è di valutare la risposta anticorpale in diverse popolazioni di pazienti in modo da ottenere una stima della sua specificità e sensibilità.

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Analisi, Via Francesco Sforza 28, 20122 Milano, Tel 0255032876, E-mail ferruccio.ceriotti@policlinico.mi.it

Ricevuto: 23.04.2020

Revisionato: 27.04.2020

Accettato: 14.05.2020

Publicato on-line: 25.05.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.054

METODI

Pazienti

Sono stati selezionati sieri residui di 4 diverse tipologie di pazienti. 61 sieri da sieroteca risalenti al 2018, utilizzati come controlli negativi; 41 sieri di pazienti guariti o in corso di guarigione da COVID-19; sieri di 55 pazienti entrati in Pronto Soccorso per patologie respiratorie e positivi al tampone per la ricerca di RNA di SARS-CoV-2; sieri di 13 pazienti affetti da COVID-19 e ricoverati in Terapia Intensiva. Questi campioni sono stati raccolti parte in Policlinico e parte in Ospedale San Raffaele (Milano) e costituiscono sieri residui, prelevati per l'effettuazione di altre tipologie di esami correlati alla patologia COVID-19 e destinati all'eliminazione. Per l'esecuzione degli esami sierologici non è stato perciò richiesto il consenso informato al paziente; le procedure adottate sono state tutte aderenti alla Dichiarazione di Helsinki, come emendata nel 2013.

Metodo analitico

Si è utilizzato il metodo in chemiluminescenza Maglumi™ 2019-nCoV IgG e IgM, applicato su Maglumi 800 (Snibe Diagnostic, Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd, Shenzhen, Cina, commercializzato da Medical Systems, Genova). Il metodo per la misura delle IgG è basato su microsfere magnetiche rivestite di antigene ricombinante del virus SARS-CoV-2 (sia proteine spike che nucleocapside); dopo l'incubazione con il siero in esame le microsfere con l'immunocomplesso sono separate in campo magnetico e viene eseguito un ciclo di lavaggio. Viene quindi aggiunto un anticorpo anti-IgG umane marcato; dopo la necessaria incubazione ed il relativo ciclo di lavaggio viene aggiunto lo starter e gli anticorpi presenti sono quantificati in base all'intensità della luce emessa. Il segnale è espresso in unità arbitrarie sulla base di una curva di calibrazione. Nel caso delle IgM invece, le microsfere sono ricoperte di anticorpi anti IgM umane che catturano le IgM presenti nel campione; viene quindi aggiunto l'antigene virale ricombinante marcato. Dopo il necessario tempo di incubazione e lavaggio, viene aggiunto lo starter e letta l'intensità della luce emessa. Sia per IgG che per IgM il tempo necessario per completare la reazione è di 34 minuti.

Metodo per la rilevazione dell'RNA virale: metodo RT-PCR, Seegene Allplex™2019-nCoV Assay (Seegene, Seoul, South Korea). L'estrazione del RNA era effettuata con NIMBUS, la PCR real-time era effettuata su CFX96TMDx (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) ed interpretata con il software Seegene Viewer. Il metodo Seegene Allplex™2019-nCoV Assay identifica il virus attraverso la rilevazione della presenza di 3 geni virali (E, RdRP and N).

RISULTATI

Pazienti negativi

I risultati ottenuti sui 61 sieri ottenuti da biobanca del 2018 sono mostrati nella Tabella 1. Per le IgG, 1 campione presenta un risultato positivo (1,39 AU/mL) riconfermato da una seconda misura; due campioni rientrano nella zona grigia (risultato dubbio) (0,959 e 1,069 AU/mL) mentre gli altri 58 sono al di sotto delle 0,9 AU/mL. Per le IgM un solo campione ha dato un risultato appena oltre la soglia (1,078 AU/mL). Da questi dati si desume una specificità per le IgG del 95,1% [intervallo di confidenza al 95% (95%IC) 89,7-100] e per le IgM del 98,4 (95%IC 5,2-100).

Tabella 1

Sieri di soggetti prelevati nel 2018 per indagini sierologiche (ricerca anticorpi anti-citomegalovirus)

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Classificazione
IgG	<0,9	58	95,1	Negativo
IgG	>1,1	1	1,6	Positivo
IgG	0,9 - 1,1	2	3,3	Dubbio
Totale		61	100	
IgM	<1,0	60	98,4	Negativo
IgM	>1,0	1	1,6	Positivo
Totale		61	100	

Pazienti guariti o in corso di guarigione

Si tratta di 27 pazienti che, dopo 1 tampone positivo hanno superato la malattia ed hanno fatto un prelievo nel corso della visita di controllo, con la conferma del secondo tampone negativo e di 14 pazienti che alla visita di controllo sono risultati ancora con una carica virale al tampone naso-faringeo (6 per tutti e 3 i geni, 8 solo per il gene N). I risultati sono riassunti in Tabella 2. 1 soggetto ha dato risultati di IgG negativi, tutti gli altri hanno mostrato valori nettamente positivi (da 1,6 a 79 AU/mL). Nel caso delle IgM, solo poco più della metà dei pazienti (51%) mostrava valori positivi (da 1,002 a 12,3 AU/mL). Tutti i pazienti avevano avuto la diagnosi della malattia da 2 a 4 settimane prima del prelievo. Considerando che è atteso che tutti i soggetti che hanno avuto la malattia abbiano sviluppato un certo livello di anticorpi, possiamo calcolare per le IgG una sensibilità del 97,6% (95%IC 92,8-100). Nel caso delle IgM invece è possibile che, dato il tempo trascorso, siano già scomparse e quindi non è possibile definire la sensibilità da questo campione di soggetti.

Tabella 2

Campioni di pazienti con patologia COVID-19 confermata dalla presenza di RNA virale nel tampone rino-faringeo e che sono guariti clinicamente; 27 hanno avuto il doppio tampone negativo, 14 mostrano ancora presenza del virus (6 positivi e 8 debolmente positivi).

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Classificazione
IgG	<0,9	1	2,4	Negativo
IgG	>1,1	40	97,6	Positivo
IgG	0,9 - 1,1	0		Dubbio
Totale		41	100	
IgM	<1,0	20	49	Negativo
IgM	>1,0	21	51	Positivo
Totale		41	100	

Pazienti da pronto soccorso

La Tabella 3 mostra i risultati di questi pazienti. Per quanto riguarda le IgG, risultano presenti solo nel 45,5% dei soggetti al momento della diagnosi; uno dei 2 pazienti con risultato borderline ha avuto un secondo prelievo 5 giorni dopo ed è risultato nettamente positivo. 3 pazienti hanno continuato a risultare negativi 3 o 4 giorni dopo il tampone positivo. I valori di concentrazione delle IgG sono risultati molto variabili, da appena sopra la soglia (1,1 AU/mL) a 79 AU/mL, senza alcuna relazione con il tempo intercorso dall'inizio dei sintomi. Le IgM inaspettatamente risultano presenti solo in 7 soggetti su 55 (12,7%) ed uno soltanto presentava IgM positive in assenza di IgG che si sarebbero positivizzate solo 2 giorni dopo. Anche nei 19 pazienti seguiti nel tempo la positivizzazione delle IgM sembra apparentemente più lenta rispetto a quella delle IgG con 2 dei 10 pazienti seguiti per 15 giorni ancora negativi dopo 5 giorni e 5 fra gli altri 9 pazienti ancora negativi dopo 4 giorni.

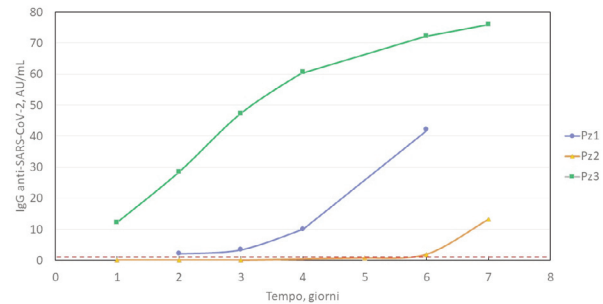
Tabella 3

Pazienti provenienti dal Pronto soccorso. Prelievo effettuato contestualmente all'esecuzione del tampone rino-faringeo risultato positivo per la presenza di RNA di SARS-CoV-2.

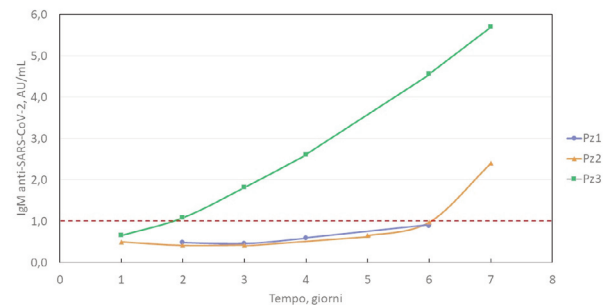
Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Classificazione
IgG	<0,9	28	50,9	Negativo
IgG	>1,1	25	45,5	Positivo
IgG	0,9 - 1,1	2	3,6	Dubbio
Totale		55	100	
IgM	<1,0	48	87,3	Negativo
IgM	>1,0	7	12,7	Positivo
Totale		55	100	

Tutti i pazienti sono arrivati in Pronto Soccorso almeno 2 giorni dopo l'inizio dei sintomi, alcuni anche 14 giorni dopo; 47 dei 55 pazienti sono stati ricoverati: Fra gli 8 dimessi, 4 avevano presenza di IgG anti-SARS-CoV-2 uno sia di IgG che di IgM, mentre 3 non presentavano anticorpi. La cinetica dello sviluppo degli

anticorpi appare molto differente da un paziente all'altro. Il caso dei 3 pazienti è illustrato nella Figura 1 per le IgG e nella Figura 2 per le IgM.

**Figura 1**

Cinetica dello sviluppo degli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 in tre pazienti. Il tempo zero è il momento di presentazione in Pronto Soccorso. Il paziente 1 dichiara un inizio dei sintomi da 4 giorni prima della presentazione in Pronto Soccorso, il paziente 2 da 10 giorni ed il paziente 3 solo dal giorno precedente. La linea tratteggiata indica il valore soglia per la positività.

**Figura 2**

Cinetica dello sviluppo degli anticorpi IgM anti-SARS-CoV-2 in tre pazienti. Il paziente 1 dichiara un inizio dei sintomi da 4 giorni prima della presentazione in Pronto Soccorso, il paziente 2 da 10 giorni ed il paziente 3 solo dal giorno precedente. La linea tratteggiata indica il valore soglia per la positività.

Pazienti in Terapia Intensiva

I risultati sono riportati in Tabella 4. Il 100% presenta valori di IgG nettamente positivi (da 8 a 81 AU/mL) che, nei 3 pazienti seguiti per 5 giorni consecutivi, si mantengono costanti nel tempo. Due pazienti su 13 presentano valori di IgM negativi; sono tra i soggetti con valori di IgG più elevati e ricoverati da tempo maggiore (23 e 18 giorni).

Tabella 3

Pazienti COVID-19 in Terapia Intensiva. Il prelievo è stato effettuato in un periodo che varia dai 2 ai 23 giorni dal primo tampone positivo

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Classificazione
IgG	<0,9	0	0,0	Negativo
IgG	>1,1	13	100,0	Positivo
IgG	0,9 - 1,1	0		Dubbio
Totale		13	100	
IgM	<1,0	2	15	Negativo
IgM	>1,0	11	85	Positivo
Totale		13	100	

DISCUSSIONE

Anticorpi anti-SARS-CoV-2 di classe IgG: il metodo appare dotato di buona specificità (95,1%, 95%IC 89,7 – 100%), anche se non mancano i falsi positivi, e valori di poco superiori a 1,1 AU/mL (valore soglia) dovrebbero essere ricontrollati con un metodo alternativo prima di catalogare il paziente come soggetto che ha incontrato il virus. Non siamo in grado al momento di ipotizzare il motivo per questi falsi positivi; potrebbe trattarsi di un segnale aspecifico oppure potrebbe trattarsi di anticorpi contro qualche altro tipo di coronavirus. Questo dato è parzialmente in contrasto con quanto riportato sul foglietto informativo del metodo che riporta una specificità del 100%, verificata su 370 soggetti. La sensibilità, dando per assodato che i soggetti guariti o in corso di guarigione debbano presentare anticorpi di tipo IgG, appare buona (97,6%, 95%IC 92,8 – 100%), ma la casistica è piuttosto ristretta ed un allargamento dei casi potrebbe portare a stime migliori. L'unico soggetto risultato negativo aveva avuto una patologia di lieve entità, con tampone risultato negativo dopo soli 16 giorni dal tampone positivo. Il nostro dato peraltro è migliore di quanto riportato nel foglietto informativo (91,21%).

Per quanto riguarda l'utilizzo dell'esame in contesti di Pronto Soccorso si conferma l'utilità molto limitata con una elevata percentuale (51%) di soggetti che, almeno nella nostra piccola casistica, risultano avere IgG negative, negatività che in alcuni soggetti permane anche oltre i 10 giorni dall'inizio della sintomatologia; peraltro i pochi dati di letteratura danno indicazioni di tempi lunghi per la siero conversione. La maggioranza dei soggetti da noi analizzati (47 su 55) ha richiesto ospedalizzazione, indicando quindi condizioni cliniche compromesse. Guo et al. (5) indicano 14 giorni per le IgG, Okba et al. che la sieroconversione avviene nell'arco di 2 settimane (9), come anche Padoan et al (7); una sintesi più completa dei risultati ad oggi disponibili è fornita da Infantino et al (10).

Difficile interpretare il risultato delle IgM; la specificità appare in linea con quanto riportato dal produttore (100%); per quanto riguarda la sensibilità i nostri dati non

consentono valutazioni precise, ma appare inferiore al 48,3% indicato dal produttore. La letteratura indica che le IgM sono più precoci (5) o circa contemporanee alle IgG (10) mentre i nostri risultati sembrano indicare una presentazione più tardiva (Figura 2). Si sarebbe portati a credere che il metodo non sia sufficientemente sensibile e quindi non in grado di rilevare la presenza di IgM anti-SARS-CoV-2 se non quando presenti in quantità molto elevata. Questo è in contrasto con quanto pubblicato da Padoan et al. (7) che, con lo stesso sistema analitico vedono comparire IgG ed IgM all'incirca nello stesso momento temporale. La nostra casistica è limitata e la differenza potrebbe essere legata alla diversa tipologia di pazienti.

In conclusione, il lavoro conferma le buone prestazioni del metodo, in particolare per lo scopo primario di indagini epidemiologiche, avendo dimostrato, pur su una casistica limitata, buone prestazioni nella identificazione dei soggetti immunizzati e limitato numero di segnali aspecifici.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Medical Systems per la fornitura dei reattivi utilizzati nel lavoro.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China Lancet 2020 doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. Chin Med J (Engl) 2020 doi: 10.1097/CM9.0000000000000722
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. Euro Surveill 2020 doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
- Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19) Clin Infect Dis 2020 doi: 10.1093/cid/ciaa310.
- Petherick A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. Lancet 2020;395:1101-2.
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. Clin Chem Lab Med. 2020. doi: 10.1515/cclm-2020-0443.
- Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. Clin Chem Lab Med 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0473.

9. Okba NMA, Müller MA, Li W, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease 2019 patients. *Emerg Infect Dis* 2020 doi: 10.3201/eid2607.200841.
10. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, et al. Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives. *Isr Med Assoc J.*2020;22:203-10.

Prevalenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 in una popolazione di operatori sanitari e amministrativi di un ospedale toscano

Fiamma Balboni¹, Andrea Baldini², Guglielmo Forgeschi³, Francesca Sequi⁴, Stefania Burbui¹, Giuseppe Lippi⁵

¹Laboratorio Analisi Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

²U.O. Ortopedia Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

³Direzione Aziendale Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

⁴Settore Qualità Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

⁵Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

ABSTRACT

Serum prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibody in a population of health care and administrative workers in a hospital in Tuscany (Italy).

Introduction: the challenges due to COVID-19 pandemic forced scientific community to focus their efforts to improve diagnosis and management of patients. The recognized gold standard for the diagnosis is the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on orofaringeal and nasal swabs. Recently, the antibody detection surge to attention with the aim of estimating the epidemiological impact of the pandemic.

Methods: the Screen Test COVID-19 2019-nCov IgG/IgM (Screen Italia, Perugia, Italy) an immunochromatographic lateral flow test has been used to assess the immunological status of 356 asymptomatic healthcare and administrative workers of our hospital.

Results: only 26 (7.3%) of the screened subjects was positive for IgM and/or IgG anti SARS-CoV-2 virus although the beginning of the epidemic in Tuscany can be dated two months before. The RT-PCR performed on these samples revealed that only 5 (19%) of them were positive for viral RNA on orofaringeal swab.

Conclusions: antibody detection will be of great value in the near future to assess global pandemic impact on population and to drive health policy for the lock down release.

INTRODUZIONE

Alla fine del 2019 a Wuhan, nel distretto di Hubei in Cina, sono stati segnalati i primi casi di una polmonite atipica il cui agente eziologico è stato poi riconosciuto appartenere alla categoria dei beta-coronavirus, definitivamente denominato severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (1). I coronavirus sono una famiglia di virus zoonotici a RNA a singolo filamento e sono ben noti causare varie patologie umane (2). Le patologie correlate possono essere lievi, come il comune raffreddore, o aggravarsi con interessamento esteso dell'albero respiratorio, generando polmoniti anche severe. Nello scorso ventennio sono state segnalate due epidemie di sindromi respiratorie acute da coronavirus, la SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) e la MERS

(Middle-East Respiratory Syndrome), negli anni 2002-2003 e 2012, che ebbero però diffusione limitata e causarono singolarmente meno di 1000 decessi (3,4).

La pandemia in atto, dovuta al virus SARS-CoV-2 e alla patologia correlata che è stata denominata "coronavirus disease 2019" (COVID-19) (5), sta mettendo a dura prova la capacità di risposta dei servizi sanitari dei singoli paesi di tutto il mondo, a causa dell'elevato numero di pazienti che richiedono gestione intensiva o sub-intensiva per l'interessamento polmonare o sistemico della patologia (6,7). La possibilità di ottenere diagnosi tempestiva e accurata è indubbiamente uno degli aspetti fondamentali nel controllo e nella gestione di qualsiasi pandemia, compresa quindi quella da COVID-19 (8). Dal momento della sua scoperta a Wuhan, numerosi sono stati gli sforzi dei ricercatori per trovare un test in grado di

Corrispondenza a: Fiamma Balboni, Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze, E-mail lab.ifca@giomi.com

Ricevuto: 04.05.2020

Revisionato: 05.05.2020

Accettato: 18.05.2020

Publicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.057

diagnosticare tempestivamente e con elevata efficienza SARS-CoV-2 (9). Il metodo di riferimento per la diagnosi eziologica rimane al momento l'identificazione di RNA virale mediante reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in campioni orofaringei e nasali, prelevati mediante tampone (10-12). Con il progredire della pandemia, e con un numero sempre maggiore di pazienti infetti, il poter disporre di metodiche che consentano di valutare la risposta immunologica specifica anti-SARS-CoV-2 sta assumendo una sostanziale rilevanza epidemiologica, non solo per identificare i soggetti asintomatici, ma anche per stabilire la quota di popolazione che potrebbe essere già immune o immunizzata, soprattutto nell'ottica del monitoraggio dell'immunità di gregge, conseguita con o senza un comunque auspicabile vaccino.

Nonostante non sia ancora possibile produrre informazioni certe sulla cinetica della risposta anticorpale, evidenze scientifiche preliminari suggeriscono che le IgM anti-SARS-CoV-2 tendano a comparire dal quinto al settimo giorno dopo la comparsa dei sintomi, mentre le IgG dal decimo al diciottesimo giorno (13). È importante poi sottolineare che, mentre la comparsa di IgG è pressoché costante in tutti i pazienti con COVID-19, la percentuale di pazienti che sviluppa IgM è compresa in genere tra 60-90%. Ciò conferma l'assunto generale che la determinazione della risposta immunitaria non debba essere usata per la diagnosi di COVID-19, a causa del rischio elevato di falsi negativi (14). Alla luce della cinetica descritta in precedenza, infatti, la risposta anticorpale potrebbe non essersi ancora sviluppata in un'ampia percentuale di pazienti portatori dell'infezione in fase pre-sintomatica, impedendone così il trattamento terapeutico e soprattutto l'isolamento, correndo così il serio rischio di propagare ulteriormente l'infezione. Nei pazienti anziani e immunocompromessi, inoltre, la comparsa degli anticorpi potrebbe essere ritardata o assente, complicando ancor più l'interpretazione del quadro sierologico alla luce del reale contagio.

Malgrado siano oggi disponibili metodi immunocromatografici per la determinazione rapida di IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 in campioni di sangue intero, siero o plasma (15), sono ancora numerose le perplessità sulle loro prestazioni diagnostiche (14). D'altronde, l'urgenza imposta dalla pandemia ha permesso alcune deroghe alle normali procedure che precedono la commercializzazione, consentendo quindi la commercializzazione di dispositivi con la sola marcatura CE attestante l'aderenza ai requisiti di sicurezza. E' peraltro da sottolineare che in questi tempi di emergenza, la necessità di avere presto disponibili le determinazioni anticorpali ha reso comunque "preziosi" questi strumenti (16). E' da ricordare comunque che l'industria del diagnostico si è rapidamente adeguata alle esigenze cliniche e numerosi saggi immunometrici sono in via di commercializzazione.

METODI

L'Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA) di Firenze è un ospedale privato convenzionato di 271 posti letto e numerose specialità mediche e chirurgiche. Durante la pandemia da COVID-19 l'ospedale, in stretta sinergia con il Sistema Sanitario Regionale Toscano, ha messo a disposizione la propria terapia intensiva post chirurgica per il ricovero di pazienti critici non affetti da COVID-19, ha mantenuto la propria attività chirurgica programmata e non differibile di ortopedia e neurochirurgia, ha potenziato l'erogazione congiunta di prestazioni con l'Azienda USL Toscana Centro e l'Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, ha incrementato la disponibilità di posti letto ordinari di medicina provenienti dai Dipartimenti Emergenza e Accettazione (DEA), ha mantenuto l'offerta di ricovero per la riabilitazione neurologica e cardiologica nonché il servizio essenziale di emodialisi.

L'Istituto, inquadrato dall'inizio dell'epidemia come Presidio no COVID, si è trovato a gestire alcuni casi di pazienti inviati dai DEA o dai reparti per acuti degli Ospedali Pubblici che si sono positivizzati dopo l'ammissione e che, quindi, sono stati opportunamente isolati in un piano di degenza dedicato e autonomo, in coerenza con le indicazioni Regionali e Nazionali.

In analogia con la curva epidemiologica del contagio in Toscana, i casi di COVID-19 sopra riportati sono stati diagnosticati, quindi con referto positivo al tampone oro naso faringeo, nel periodo compreso tra il 23 marzo ed il 25 aprile.

Dal 25 febbraio 2020 al momento in cui si scrive, nella nostra Regione, si è avuta una diffusione dell'infezione da SARS-CoV-2 pari a oltre 9000 casi.

Nell'Istituto, per motivi epidemiologici e di sorveglianza sanitaria attiva, si è deciso di valutare la risposta immunitaria contro SARS-CoV-2 del personale sanitario ed amministrativo non già sottoposto a tampone oro-naso-faringeo, al fine di ottenere un quadro generale della situazione all'interno della struttura, mappando il diverso livello di esposizione al rischio di entrare in contatto con il virus.

Metodo analitico

E' stato utilizzato il kit Screen Test COVID-19 2019-nCov IgG/IgM (Screen Italia, Perugia). Il saggio è basato sul principio immunocromatografico rapido a flusso laterale, in kit monouso, che utilizza esclusivamente sangue intero da dito puntura. Il kit, che rileva qualitativamente gli anticorpi IgG e IgM anti-SARS-CoV-2, è costituito da due componenti, uno per la rilevazione delle IgG e uno per la rilevazione delle IgM. Il campione reagisce nella zona iniziale della cassetta con particelle rivestite di antigeni del virus SARS-CoV-2 e successivamente migra per capillarità fino ad incontrare le zone di rilevazione. Se sono presenti anticorpi IgG e/o IgM contro gli antigeni del SARS-CoV-2, si formano degli immunocomplessi che migrano, assieme alla miscela di reazione, lungo la membrana cromatografica e, quando

incontrano le zone di rilevazione, reagiscono con gli anticorpi antiglobuline umane qui adesi, formando una banda colorata. E' presente un controllo interno che funge da verifica della corretta dispensazione, migrazione e reazione. Esso è costituito da anticorpi di topo rivolti verso un antigene del controllo che è situato nella zona iniziale della cartuccia. Questa zona si dovrà colorare sempre di rosa, segno della corretta procedura eseguita. In caso contrario il test deve essere considerato non valido e scartato.

Le prestazioni analitiche dichiarate dal produttore e che sono frutto del raffronto dei risultati del kit con quelli forniti da una RT-PCR commerciale su un campione costituito da 70 pazienti, di cui 20 positivi e 50 negativi per COVID-19, sono le seguenti: per le IgG la sensibilità è 100% intervallo di confidenza al 95% (95%CI): 86%-100%), la specificità 98% (95%CI: 89%-100%). Di fatto dei 50 campioni negativi 49 sono risultati tali e 1 positivo, mentre i 20 positivi sono stati tutti correttamente classificati. La precisione per le IgG è stata quindi del 99% (95%CI: 92%-100%), Per le IgM, sempre su 70 campioni di cui 20 positivi e 50 negativi alla RT-PCR, le analoghe prestazioni dichiarate sono sensibilità 85% (95%CI: 62%-97%), specificità 96% (95%CI: 86%-99%) e precisione 93% (95%CI: 84%-98%). In questo caso, dei 20 campioni positivi 3 sono risultati negativi con il kit Screen Test COVID-19 2019-nCov IgG/IgM e dei 50 negativi 2 sono risultati positivi. La valutazione di questo metodo in altre strutture, così come riportato dai dati cumulativi pubblicati nel sito FIND (<https://findx.shinyapps.io/COVID19DxDxData/>), riportano sensibilità e specificità cumulative comprese tra 56-100% e 92-100% (nello studio più ampio i corrispondenti valori di sensibilità e specificità sono 90% e 100%).

Dopo l'aggiunta di una goccia di sangue capillare del paziente, la comparsa di bande colorate indica la presenza di anticorpi IgG e/o IgM verso SARS-CoV-2. Il saggio è di tipo qualitativo, quindi non esiste nessuna correlazione fra l'intensità del colore sviluppato e la quantità di immunoglobuline presenti. Qualsiasi sia l'intensità del colore sviluppato nella banda, l'esame deve essere considerato positivo; la conferma è effettuata mediante esecuzione della ricerca dell'RNA virale in biologia molecolare su tampone orofaringeo e nasale.

Soggetti esaminati

La popolazione oggetto di questo nostro studio consiste di 356 soggetti asintomatici appartenenti alla categoria di personale dipendente e libero professionista di IFCA, cui l'esame è stato effettuato tra il 30 marzo ed il 26 aprile 2020. I soggetti si sono sottoposti volontariamente all'esame, sottoscrivendo apposito consenso informato riportante lo scopo dello stesso, le caratteristiche e limitazioni intrinseche del metodo, le possibili alternative e la necessità, qualora fosse rilevata la presenza di IgG o IgM anti-SARS-CoV-2, di sottoporsi al tampone oro-naso-faringeo per la ricerca del virus mediante RT-PCR. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a

“travel occupation contact cluster survey” (TOCC) dell'organizzazione mondiale della sanità (OMS). I test sono stati letti da un gruppo di medici appositamente addestrati sulle istruzioni previste di utilizzo del kit, e ogni medico ha letto in autonomia i risultati riferiti agli operatori a cui ha somministrato il questionario, fatto la storia clinica ed eseguito il prelievo.

L'esecuzione dello screening è stata approvata dalla Direzione Aziendale e Sanitaria e si è svolta nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki, come emendata nel 2013.

RISULTATI

Un numero totale di 330 esami dei 356 eseguiti sono risultati negativi (92,7%), mentre 26 hanno dato esito positivo (7,3%). Di questi, 12 hanno evidenziato positività per IgM (3,4%), 12 per IgG (3,4%) e 2 per entrambe le immunoglobuline (0,6%). Su tutti i soggetti risultati positivi è stata quindi eseguita la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR su tamponi oro- e naso-faringei, evidenziando una positività del 19,2% (5/26). Questi 5 tamponi positivi corrispondevano alle seguenti positività anticorpali rilevate: 1 per le IgM, 3 per le IgG e 1 per entrambe le immunoglobuline.

DISCUSSIONE

Dall'insorgenza della pandemia da COVID-19 sono stati compiuti degli sforzi estenuanti a livello globale per contenere gli effetti devastanti sulla salute e sull'economia. A tutt'oggi la diagnosi di malattia acuta si basa esclusivamente sull'identificazione dell'RNA virale nelle mucose della cavità nasale e nell'orofaringe mediante RT-PCR. Nondimeno, questa tecnica non è esente da limiti pratici e analitici (17). E', infatti, ben noto che un campione prelevato con procedure non idonee, conservato e trasportato senza seguire le norme di qualità preanalitica, e analizzato con metodica non validata può portare a errori nella diagnosi della malattia COVID-19. Assieme all'evidenza biologica che il virus può prematuramente scomparire in oro-faringe, pur persistendo in altri distretti organici (polmoni, apparato gastro-intestinale) a lungo, questo contribuisce a ridurre l'efficienza diagnostica della biologia molecolare sui tamponi oro- e naso-faringei (18). Nel tentativo legittimo di potenziare l'efficienza diagnostica di questo strumento, è stato ipotizzato che la sierologia potrebbe rappresentare un potenziale ausilio. La ricerca e/o titolazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2 si sono sviluppate in due differenti ambiti. Il primo riguarda i test rapidi, dei quali esiste una grande varietà in commercio (14). Il secondo ambito riguarda invece i test che utilizzano i principi dei metodi immunometrici/immunochemiluminescenti, e che sono quindi automatizzabili su strumentazioni già presenti in laboratorio. I primi ad essere rilasciati sono stati i test ELISA seguiti a breve distanza dai test in chemiluminescenza, il cui numero è in aumento

esponenziale (19-20).

La generazione di anticorpi contro il virus, per la caratteristica cinetica, è difficilmente di ausilio nel diagnosticare COVID-19 in fase attiva, ma può essere fondamentale per valutare l'epidemiologia della malattia e nei progetti di sorveglianza sanitaria, aiutando i governi e le istituzioni sanitarie nel pianificare le azioni di sanità pubblica che sono alla base di una ripartenza della economia e della vita sociale. La ricerca degli anticorpi può anche aiutare a porre diagnosi nei casi RT-PCR negativi nei quali il nesso causale con il virus SARS-CoV-2 e l'aspetto clinico pongono un forte sospetto di COVID-19. In queste evenienze, la ricerca degli anticorpi su campioni di siero prelevati nella seconda settimana di malattia potrebbero chiarire la diagnosi.

Nel caso di IFCA, pur con le limitazioni insite nel test POCT utilizzato, la ricerca di anticorpi nel personale ha dimostrato che solo una piccola percentuale dei soggetti testati dimostra una sieropositività al COVID-19 a distanza di quasi 2 mesi dalla comparsa in Toscana del primo caso di infezione da virus SARS-CoV-2. Per quanto riguarda la gestione delle positività, in una prima fase, il personale trovato positivo al test POCT è stato temporaneamente sospeso dal servizio ed è stato segnalato all'Azienda Sanitaria di riferimento che ha provveduto ad effettuare il tampone. In una seconda fase, in accordo l'Azienda Sanitaria di riferimento, il personale positivo al test rapido è stato immediatamente sottoposto a tampone presso IFCA e comunque sospeso dal servizio in attesa dell'esito.

In conclusione, la sorveglianza della sieropositività, se ripetuta nel tempo, potrà aiutare a comprendere l'andamento dell'epidemia e della presenza di anticorpi specifici nel personale sanitario ed amministrativo, permettendo nel futuro politiche sanitarie mirate. Difatti, quando sarà più chiara la cinetica anticorpale con la relativa certezza di una neutralizzazione virale e quindi di copertura in caso di nuovo contagio, la determinazione dello stato anticorpale degli operatori sanitari potrebbe gettare le basi per un utilizzo ragionato e sicuro delle risorse umane. A livello di popolazione generale, la determinazione dello stato anticorpale aiuterebbe a dimostrare l'entità dell'epidemia e potrebbe essere di ausilio nelle politiche di riapertura della vita economica e sociale permettendo la ripresa produttiva e sostenendo la popolazione nella ripresa di una normale quotidianità.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Li G, Fan Y, Lai Y et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* 2020;92:424-32.
- Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, et al. The 2019-new coronavirus epidemic: evidence for virus evolution. *J Med Virol* 2020;92:455-9.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382:727-33.
- Perlman S. Another decade, another coronavirus. *N Engl J Med* 2020;382:760-2.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506.
- World Health Organization. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200426-sitrep-97-covid-19.pdf?sfvrsn=d1c3e800_6 (ultimo accesso: aprile 2020).
- Axelrod J, CBS News, March 2, 2020: Coronavirus may infect up to 70% of world's population, expert warns. Accessed in <https://www.cbsnews.com/news/coronavirus-infectionoutbreak-worldwide-virus-expert-warning-today-2020-03-02/> (ultimo accesso: aprile 2020).
- Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0240.
- Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0198.
- Lippi G, Plebani M. The novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: think the unthinkable and be prepared to face the challenge. *Diagnosis (Berl)* 2020 doi: 10.1515/dx-2020-0015.
- Pang J, Wang MX, Ang IY, et al. Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): a systematic review. *J Clin Med* 2020;9: E623.
- Jin YH, Cai L, Cheng ZS, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res* 2020;7:4.
- Tan W, Lu Y, Zhang J, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *medRxiv* doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>.
- WHO. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 [<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>] (ultimo accesso: aprile 2020).
- Lin D, Liu L, Zhang M, et al. Evaluation of serological tests in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *medRxiv* 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045153>.
- Circolare Ministero della Salute 3 aprile 2020. <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsa.nPdf?anno=2020&codLeg=73799&parte=1%20&serie=n ull> (ultimo accesso: aprile 2020).
- Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0285.
- 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. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.11.20021493v2> (ultimo accesso: aprile 2020).
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for 2019-nCoV IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0443.
- Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi:10.1515/cclm-2020-0473.

Determinazione degli anticorpi IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 mediante piattaforma iFlash1800 CLIA in una casistica italiana

Iolanda Bottari¹, Margherita Resta¹, Pietro Gatti², Domenico Potenza³, Bruna Andriulo¹, Vito Cornacchiulo¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica Presidio Ospedaliero di Francavilla Fontana (ASL BR)

²Medicina Interna Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi (ASL BR)

³Malattie Infettive Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi (ASL BR)

ABSTRACT

Detection of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 by iFlash1800 CLIA analyser in an Italian population.

Introduction: World Health Organization guidance dated 17 January 2020 indicates the need to associate the detection of antibodies anti-SARS-CoV-2 to real time reverse transcriptase PCR test (rRT-PCR) for the diagnosis of the new coronavirus infection. Aim of this study is to acquire information about the prevalence of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 antibodies in a population of health workers (control group) and in patients affected by COVID-19.

Methods: the control group includes 190 asymptomatic health workers; the patient group includes 44 affected patients. Serum IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2 were measured by using iFlash1800, a fully automatic chemiluminescence immunoassay analyser. rRT-PCR was performed with CFX96 Touch™ system (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). **Results** 186 out of 190 asymptomatic health workers were negative for rRT-PCR. Among these, 3 were positive for IgG antibodies (98% specificity, 95%CI 96-99) and 5 for IgM antibodies (97,3% specificity, 95%CI 95-98). 40 out of 44 patients were positive for rRT-PCR. Among these, 39 were positive for IgG (97,5 sensibility, 95%CI 91-100); 30 were positive for IgM anti-SARS-CoV-2 (75%).

Discussion: rRT-PCR is a routine method for the diagnosis and confirmation of COVID-19 infection. However, false negative and positive results from rRT-PCR were found in a number of healthcare workers. They were possibly due to sample collection, storage conditions, difference of virus load in the infection site, RNA extraction methods and kit quality, contaminations and test performed in patients from areas with low prevalence of the infection. These rRT-PCR failures can determine an important negative impact on the diagnosis. The high sensitivity of IgG and IgM detection in the patient group indicates that serological tests are of great help in improving the clinical sensitivity of COVID-19 diagnosis. Our results show that anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM antibody detection is a very effective tool, in association with molecular test for diagnosis, and epidemiologic studies of this severe disease.

INTRODUZIONE

Il documento della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 17 gennaio 2020 (1) indicava la necessità di associare l'uso di test sierologici alla diagnosi molecolare per COVID-19 mediante Reverse Real-Time PCR (rRT-PCR) nelle polmoniti associate al nuovo coronavirus. Gli esami sierologici hanno infatti la finalità di evidenziare e valutare nel tempo la risposta immunologica a questo patogeno.

Abbiamo quindi acquisito, nel nostro laboratorio, uno strumento automatico, con metodo in

chemiluminescenza (CLIA), per la misura degli anticorpi IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 sia in soggetti asintomatici (operatori sanitari ad alto rischio di contagio) che in pazienti affetti da COVID-19 ricoverati nei reparti per acuti e post acuti della Azienda Ospedaliera di Brindisi.

Il primo obiettivo era quello di identificare nel gruppo di sanitari asintomatici e con tampone negativo, eventuali soggetti immunologicamente competenti. Il secondo obiettivo era valutare l'andamento della risposta immune in relazione al quadro clinico in pazienti ricoverati.

Corrispondenza a: Vito Cornacchiulo, Presidio Ospedaliero Dario Camberlingo, Piazza Madonna delle Grazie, Francavilla Fontana, 0831851251/2, E-mail vitocor@alice.it

Ricevuto: 27.05.2020

Revisionato: 09.06.2020

Accettato: 19.06.2020

Publicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.073

Inoltre, in accordo con la Direzione, la determinazione degli anticorpi è stata utilizzata per individuare negli operatori sanitari, sia gli individui ad elevato rischio di contagio (esame sierologico negativo), che i soggetti che avessero già contratto la malattia (esame sierologico positivo), vista l'impossibilità, in fase pandemica, di eseguire i test molecolari su tutti gli operatori.

METODI

Soggetti

Il gruppo di controllo è costituito da 190 soggetti, (85 maschi e 105 femmine), tutti operatori sanitari, asintomatici, sottoposti contestualmente a tampone naso-faringeo per la ricerca molecolare del virus e a prelievo di sangue periferico per la ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2.

Il gruppo di pazienti è costituito da 44 pazienti (34 maschi e 10 femmine), tutti sottoposti ad almeno un tampone naso-faringeo per la ricerca molecolare del SARS-CoV-2 così distinti:

- 28 pazienti, (23 maschi e 5 femmine) ricoverati presso i reparti per acuti del Presidio Ospedaliero "A. Perrino" di Brindisi
- 16 pazienti, (11 maschi e 5 femmine) ricoverati presso le strutture per post-acuti della Azienda Ospedaliera.

Tutti i campioni ematici e i tamponi naso-faringei sono stati raccolti nel periodo di tempo compreso tra il 28 marzo e il 4 maggio 2020.

Durante l'effettuazione dello studio è stata rispettata e applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 2013. È stato ottenuto un Consenso Informato da ciascuno dei soggetti del gruppo controllo. Data la gravità e la situazione d'urgenza non è stato ottenuto un consenso informato dai pazienti. Si sottolinea, che i campioni ematici dei pazienti sono stati prelevati per le necessarie indagini legate alla valutazione del loro stato di salute.

Metodi analitici

Esami sierologici

I prelievi ematici sono stati eseguiti mediante sistema Vacutainer, utilizzando provette RST (rapid serum tube) con trombina e gel separatore (Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano, Italia). Le provette, provviste di barcode identificativo, sono state sottoposte a centrifugazione per 8 minuti a 4000g, quindi, caricate, come provette primarie, sull'analizzatore iFlash1800, interfacciato al LIS di laboratorio Lab2000 (MCA, Taranto, Italia)

Per la determinazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 di isotipo IgG e IgM è stato utilizzato lo strumento iFlash1800, analizzatore multiparametrico in chemiluminescenza della ditta Shenzhen YHLO Biotech (Cina).

I kit 2019-nCoV IgG e IgM, adattati a questa piattaforma strumentale, sono ugualmente prodotti dalla

ditta Shenzhen YHLO Biotech (Cina). La determinazione, definita dai produttori di tipo qualitativo, vista l'assenza di standard internazionali, grazie all'algoritmo del software strumentale poteva essere considerata di tipo semi-quantitativo.

Il metodo, della durata di 30 minuti, prevede l'utilizzo di microparticelle magnetiche adsorbite con due antigeni del SARS-CoV-2, la proteina del nucleocapside virale (proteina N) e la glicoproteina S facente parte delle "spicole virali". Le microparticelle vengono poste in incubazione con il siero per 15 minuti; dopo opportuni lavaggi, alle cuvette di reazione viene aggiunto un anticorpo anti-IgG o IgM umane coniugato con acridinio. Dopo ulteriori lavaggi, l'aggiunta di "Pre-Trigger e Trigger" consente di misurare l'eventuale complesso immune presente nelle cuvette come unità di luce relativa (RLUs). Il sistema calcola automaticamente la concentrazione dell'analita nel campione, attribuendo un risultato in Unità Arbitrarie per mL (UA/mL).

Il valore soglia indicato dal produttore è di 10 UA/mL sia per per la determinazione di IgG che IgM.

Test molecolari

I tamponi naso-faringei sono stati eseguiti utilizzando i tamponi FLOQSwabs (COPAN Diagnostics Inc., California, USA), trasportati nei laboratori di riferimento con provetta UTM3ML (COPAN Diagnostics Inc., California, USA) entro due ore dal prelievo.

Gli esami sono stati eseguiti presso il Laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico di Foggia ed il Laboratorio di Microbiologia del Presidio Ospedaliero A. Perrino di Brindisi utilizzando le seguenti metodiche. Estrazione dell'RNA virale con sistema QIAcube HT (Qiagen, Hilden, Germania). rRT-PCR in accordo al protocollo WHO per la ricerca del SARS-CoV-2 (2) con il sistema CFX96 TouchTM (Bio Rad, Hercules, California, USA) e con LighCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania).

RISULTATI

Operatori sanitari

186 dei 190 (97,8%) operatori sanitari sono risultati negativi al test molecolare. Tre dei 186 operatori sanitari sono risultati positivi per IgG [specificità 98%, (intervallo di confidenza al 95% (95%CI) 96-99)] e 5 positivi per IgM (specificità 97,3%, 95%CI 95-98). I dati sono riportati in Tabella 1.

4 soggetti (A, B, C, D) sono risultati positivi al tampone naso-faringeo con rRT-PCR, ma negativi all'esame sierologico; posti in quarantena fiduciaria, sono stati sottoposti nuovamente a tampone naso-faringeo, risultato negativo e ad ulteriori due determinazioni sierologiche a distanza di 14 e 28 giorni dal primo prelievo, risultate ugualmente negative.

In 7 casi è stata evidenziata una positività di anticorpi anti-SARS-CoV-2. In 4 soggetti (E, F, G, H), era positiva la ricerca per IgM (16,7; 14,9; 24,8 e 28,1 UA/mL

rispettivamente); i test sono stati ripetuti nel tempo ed hanno mostrato risultati sovrapponibili. Un soggetto (L) è risultato positivo sia per IgG che per IgM in due diverse determinazioni (81,7 e 79,3 UA/mL per IgG; 24,3 e 22,2 UA/mL per IgM). 2 soggetti (M e I) sono risultati positivi a due determinazioni solo per la ricerca delle IgG (73,0 e 78,5; 84,2 e 86,7 UA/mL rispettivamente) e con valori inferiori al valore soglia per le IgM (9,5 e 8,2; 2,6 e 2,7 UA/mL). I dati di questi 11 soggetti sono riportati in Tabella 2.

Pazienti

40 dei 44 pazienti ricoverati presso i reparti per acuti e per post-acuti della Azienda Ospedaliera sono risultati positivi al test molecolare (90,9%). 39 dei 40 pazienti sono risultati positivi per IgG anti-SARS-CoV-2 (sensibilità 97,5; 95%CI 91-100). 30 pazienti sono risultati positivi per IgM (sensibilità 75%). Per questo dato non si è ritenuto di esprimere gli IC in quanto nei soggetti con quadro clinico in via di risoluzione è possibile assistere alla scomparsa delle IgM. I risultati sono illustrati in Tabella 3. 24 dei 28 pazienti ricoverati

presso i reparti per acuti erano risultati positivi ad almeno un tampone durante la malattia, in 4 non era mai stata evidenziata la positività per SARS-CoV-2 con rRT-PCR. In tutti i 28 pazienti abbiamo riscontrato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2 (con valori compresi tra 13,4 e 93 UA/mL). La ricerca di IgM è risultata positiva in 21 pazienti (con valori compresi tra 13,2 e 636 UA/mL) e negativa in 7 (con valori compresi tra 1,6 e 9,8 UA/mL). Questi risultati sono riportati in Tabella 4; viene riportato il dettaglio dei pazienti (P, R, S, T) risultati negativi al test molecolare.

I 16 pazienti del reparto post-acuti avevano nella loro storia clinica almeno una determinazione di positività per SARS-CoV-2 mediante rRT-PCR. In questi soggetti abbiamo evidenziato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2 in 15 pazienti con valori compresi tra 18 e 90,4 UA/mL. 11 pazienti erano positivi per le IgM (valori compresi tra 17,5 e 3626 UA/mL). In 4 pazienti le IgM erano negative (valori compresi tra 0,8 e 9,6 UA/mL). Un paziente (Paziente V) era negativo per IgG e IgM, con 1,3 e 0,6 UA/ml rispettivamente. I dati sono pure riportati in Tabella 4.

Tabella 1

Sieri di operatori sanitari negativi al tampone naso-faringeo

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Esito
IgG	<10	183	98	Negativo
IgG	>10	3	2	Positivo
Totale		186	100	
IgM	<10	181	97,3	Negativo
IgM	>10	5	2,7	Positivo
Totale		186	100	

Tabella 2

Valori di IgG e IgM anti-SARS-CoV2 e risultato del tampone naso-faringeo in 11 operatori sanitari asintomatici

	Esito Tampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
Soggetto A	Positivo → Negativo	0,6 → 0,5 → 0,4	0,2 → 0,4 → 0,3
Soggetto B	Positivo → Negativo	0,2 → 0,2 → 0,3	1,8 → 1,5 → 1,7
Soggetto C	Positivo → Negativo	1,5 → 1,3 → 1,8	1,1 → 0,9 → 1,0
Soggetto D	Positivo → Negativo	0,7 → 1,2 → 1,4	0,6 → 1,5 → 1,4
Soggetto E	Negativo → Negativo	0,5 → 0,3	16,7 → 16,9
Soggetto F	Negativo	2,7 → 2,8	14,9 → 13,7
Soggetto G	Negativo	0,2 → 0,5	24,8 → 23,9
Soggetto H	Negativo → Negativo	0,2 → 0,4	28,1 → 25,9
Soggetto I	Negativo	84,2 → 86,7	2,6 → 2,7
Soggetto L	Negativo	81,7 → 79,3	24,3 → 22,2
Soggetto M	Negativo	73,0 → 78,5	9,5 → 8,2

La freccia indica la progressione dei controlli eseguiti ogni due settimane. Il valore soglia per la positività dell'esame sierologico è 10 UA/mL.

Tabella 3*Sieri di pazienti positivi al tampone naso-faringeo*

Classe anticorpale	AU/mL	N	%	Esito
IgG	<10	1	2,5	Negativo
IgG	>10	39	97,5	Positivo
Totale		40	100	
IgM	<10	10	25	Negativo
IgM	>10	30	75	Positivo
Totale		40	100	

Tabella 4*Valori di IgG e IgM anti-SARS-CoV2 nei pazienti affetti da COVID-19*

Pazienti in Reparti per acuti (N=28)			
Pazienti	EsitoTampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
N=24	Positivo	Valori compresi tra 13,4 e 93,0	19 Positivi con valori compresi tra 13,2 e 636 5 Negativi con valori compresi tra 1,6 e 8,8
Paziente P	Negativo	46,1	9,8
Paziente R	Negativo	69,5	3,8
Paziente S	Negativo	55,3	21,0
Paziente T	Negativo	33,8	341,3
Pazienti in Reparti per post-acuti (N=16)			
Pazienti	EsitoTampone	IgG (UA/mL)	IgM (UA/mL)
N=15	Positivo	Valori compresi tra 18 e 90,4	11 Positivi con valori compresi tra 17,5 e 3626 4 Negativi con valori compresi tra 0,8 e 9,6
Paziente V	Positivo	1,3 → 1,5	0,6 → 1,1

La freccia indica la progressione dei controlli eseguiti ogni due settimane.

DISCUSSIONE

L'infezione da SARS-CoV-2, dovuta ad un coronavirus del genere beta appartenente alla sottofamiglia Orthocoronaviridae, virus a RNA a filamento positivo, caratterizzata da possibili gravi manifestazioni cliniche a carico delle vie respiratorie, è un'infezione virale altamente contagiosa, ad alta morbilità e mortalità.

La diagnosi si basa sui test molecolari (3), su criteri clinici e su quadri patognomici radiologici (4). La presenza di falsi negativi nei test rRT-PCR, possibile per inadeguata tecnica del prelievo, per limiti nella sensibilità dei kit utilizzati, per una oggettiva difficoltà operativa nelle fasi di estrazione manuale dell'RNA virale nei test semi-automatici, o ancora per la fugace e transitoria presenza del virus nelle prime vie aeree rispetto alla

comparsa dei sintomi clinici specifici, che può verificarsi anche dopo 14 giorni dall'avvenuto contagio, ha convinto molti esperti epidemiologi della necessità di affiancare alla diagnosi molecolare e alle evidenze cliniche le indagini immunologiche per la lotta a questa pandemia (5). Del resto, la OMS, fin dal gennaio 2020 (1) aveva considerato questo aspetto come fondamentale nel controllo dell'infezione da SARS-CoV-2.

Numerose osservazioni suggeriscono che la risposta immune dell'ospite gioca un ruolo fondamentale nel controllo di questa infezione virale (5, 6). Livelli circolanti di IgM anti-SARS-CoV-2 possono essere osservate dopo 3 settimane dal contagio, tendono a mantenersi per ulteriori 4 settimane, e forse più a lungo. Le IgG anti-SARS-CoV-2 si manifestano dopo 4 settimane dal contagio e raggiungono i valori più alti dopo 8 settimane (7).

Sulla scorta di queste considerazioni abbiamo acquisito nel mese di marzo 2020 uno strumento multiparametrico per l'esecuzione delle determinazioni sierologiche degli anticorpi anti-SARS-CoV-2. Abbiamo optato per uno strumento con metodo CLIA e non per i test rapidi qualitativi perché avevamo la necessità, per quanto nelle nostre competenze, di supportare i Clinici nella comprensione, dal punto di vista immunologico, della risposta dell'ospite a questa infezione virale. L'uso dei test rapidi, sicuramente utilissimo per progetti di screening di massa, soprattutto nelle regioni più colpite dalla pandemia, non poteva soddisfare questa esigenza.

La scelta della piattaforma strumentale iFlash 1800A si è basata sulle indicazioni di sensibilità e specificità dichiarate dal produttore (sensibilità 97,3 e specificità 96,3 per la misura di IgG; sensibilità 86,1 e specificità 99,2 per la misura delle IgM). I nostri risultati sembrano essere in linea con quanto dichiarato; non abbiamo verificato inaccuratezza e imprecisione, le curve di calibrazione sono risultate stabili e i controlli all'inizio e a termine di ogni seduta hanno testimoniato ottimi livelli di prestazioni analitiche. L'accuratezza diagnostica della strumentazione e dei kit utilizzati è stata ben illustrata da altri Autori (8).

Osservando i nostri risultati, emergono alcuni aspetti che meritano una discussione. Innanzitutto vale la pena di soffermarsi sul riscontro, nel gruppo di controllo, di 4 soggetti asintomatici, con test molecolare positivo e ricerca di anticorpi IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 negativa, sia al momento dell'arruolamento, che al prelievo di controllo eseguito dopo 4 settimane. Criticamente abbiamo attribuito a questo dato il significato di un possibile falso negativo. Tuttavia, pur essendo ben consci della rarità di test rRT-PCR falsamente positivi, non va esclusa la possibilità che una quota variabile di test molecolari risulti tale (9). Ciò è soprattutto possibile quando l'uso di questi test sia largamente diffuso in regioni a bassa prevalenza d'infezione (9). Va inoltre sottolineato che l'assoluta necessità di allargare la diagnostica molecolare a più laboratori, come si è verificato in questa pandemia, può aver determinato un utilizzo di questi metodi da parte di personale privo di adeguate esperienze e competenze. Purtroppo, a conclusione dell'analisi di questa incongruenza tra dato molecolare e sierologico, vorremmo sottolineare che non disponiamo al momento di informazioni sui test di conferma: se sono stati approntati, con quale metodo alternativo e con quale esito.

Fra le ipotesi plausibili, vale la pena di citare le seguenti possibilità:

- che una bassa carica virale, pur dimostrata con test molecolari, non sia in grado di determinare malattia e soprattutto una risposta anticorpale;
- che esistano soggetti non suscettibili all'infezione;
- che esistano altre specificità anticorpali, in risposta all'infezione, non dimostrabili con il metodo adottato;
- che nei soggetti con bassa carica virale si possa produrre una diversa risposta immune mediata da altri isotipi anticorpali (ad esempio anticorpi anti-SARS-

CoV-2 di tipo IgA).

Un caso che sembra confermare i dubbi ora espressi è il paziente del secondo sottogruppo, ricoverato in una struttura per post-acuti della nostra Azienda (Paziente V della Tabella 4). Si tratta di un dipendente dei Servizi Sociali che è stato sottoposto ad isolamento nella struttura per post-acuti insieme ad un altro paziente (contatto stretto). Entrambi asintomatici, sono risultati positivi al test molecolare, ma solo uno dei due è risultato positivo alla ricerca degli anticorpi (Tabella 4). L'impatto di un test rRT-PCR falsamente positivo o negativo può determinare oltre a seri problemi diagnostici, gravi ripercussioni sull'individuo per terapie inadeguate, limitazioni della propria libertà individuale e per ultimo il rischio aumentato di contrarre l'infezione se posto in quarantena insieme ad altri pazienti sicuramente affetti da infezione da COVID-19 (9).

Nel gruppo di controllo abbiamo evidenziato sicuramente 3 falsi positivi per la ricerca delle IgM anti-SARS-CoV-2 (soggetti F, G e H della Tabella 2). Questo dato è in linea con la sensibilità del test. Va sottolineato che i 3 soggetti oltre a mantenere una debole positività per IgM nei controlli seriali, non presentavano in anamnesi nessuna patologia degna di nota. Per quanto riguarda i 3 soggetti del gruppo di controllo (I, L e M della Tabella 2) in cui abbiamo riscontrato la positività per IgG anti-SARS-CoV-2, vorremmo sottolineare i seguenti dati. Per un soggetto (I) si poteva documentare una permanenza in Lombardia nel mese di febbraio 2020. Il secondo soggetto (L) riferiva nel mese di febbraio la comparsa di una sintomatologia simil-influenzale. Nel terzo caso (M) non si avevano informazioni che potessero giustificare l'infezione da COVID-19.

Una ulteriore conferma del ruolo cruciale della ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2 è la ridotta positività per la ricerca delle IgM rispetto a quella delle IgG nel gruppo dei pazienti. Questo dato sembra in accordo con la sierconversione. Nei soggetti in via di risoluzione clinica si assiste alla lenta perdita della risposta IgM-mediata a fronte del consolidamento di quella di tipo IgG (6, 8). Va sottolineato che in questa patologia non si assiste ad un vero picco di IgM specifiche come osservato nell'infezione da SARS (7). I nostri dati confermano tali acquisizioni, soprattutto osservando i risultati dei pazienti ricoverati presso le strutture aziendali per post-acuti (parte finale della Tabella 4) (8, 10).

Un ulteriore obiettivo del nostro studio era quello di individuare negli operatori sanitari, individui ad elevato rischio di contagio, i soggetti che potessero aver contratto questa patologia. I nostri risultati mostrano che solo 7 operatori su 190 (3,7%) erano positivi all'esame sierologico, di questi solo 3 (I, L e M, 1,6%) avevano sicuramente contratto l'infezione da SARS-CoV-2.

Una ultima considerazione riguarda l'utilizzo dei test rapidi qualitativi di screening nelle regioni a bassa prevalenza d'infezione. Per questa finalità epidemiologica è sicuramente auspicabile l'uso di questa tipologia di test più economici e facilmente

utilizzabili da personale non specialistico (11). Eventuali soggetti positivi andrebbero successivamente sottoposti a test molecolare e a ricerca quantitativa degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 con metodi immunometrici quantitativi.

E' indubbio che in questa grave infezione la diagnosi sia, come sempre, multidisciplinare, e debba basarsi sui dati clinici, e radiologici e nell'ambito della diagnostica di laboratorio, sull'uso combinato di test molecolari e sierologici.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare la Ditta Pantec S.r.l. (Torino, Italia) per il supporto tecnico e il Dott. Marcello Nisi per la supervisione statistica.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory testing of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330676> (ultimo accesso: giugno 2020).
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25:2000045.
3. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-2040.
4. Lin C, Ding Y, Xie B, et al. Asymptomatic novel coronavirus pneumonia patients outside Wuhan: The value of CT images in the course of disease. *Clin Imaging* 2020;63:7-9.
5. Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis* 2020;94:49-52.
6. Tan W, Lu Y, Zhang J, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv* 2020 <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382> (ultimo accesso giugno 2020).
7. Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). 2020 doi: 10.19186/BC_2020.052
8. Infantino M, Grossi V, Lari B, et al. Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an Italian experience. *J Med Virol* 2020 doi 10.1002/jmv.25932.
9. Cohen AN, Kessel B. False positive in reverse transcription PCR testing for SARS-CoV-2. *MedRxiv* 2020 <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911> (ultimo accesso: giugno 2020).
10. Phelan AL, Katz R, Gostin LO. The novel coronavirus originating in Wuhan, China: Challenges for global health governance. *JAMA* 2020 doi: 10.1001/jama.2020.1097.
11. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.25727.

The role of acute phase proteins for predicting SARS-CoV-2 positivity upon emergency department admission

Gian Luca Salvagno¹, Fabian Sanchis-Gomar², Giuliana Lo Cascio³, Simone Denitto¹, Brandon M. Henry⁴, Giuseppe Lippi¹

¹Section of Clinical Biochemistry, University of Verona, Verona, Italy

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia and INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

³Microbiology and Virology Unit, Department of Pathology, University Hospital of Verona, Verona, Italy

⁴Cardiac Intensive Care Unit, The Heart Institute, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, USA

ABSTRACT

Background: due to the important abnormalities observed in the concentration of many inflammation/infection biomarkers in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19), this study was aimed to evaluate whether the assessment of C-Reactive Protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and procalcitonin (PCT) could help predicting SARS-CoV-2 positivity at emergency department (ED) presentation in patients with suspected infection.

Methods: the study population consisted of patients consecutively admitted to the ED of the University Hospital of Verona, with clinical suspicion of SARS-CoV-2 infection over a 2-week period. Blood samples as well as oropharyngeal and nasopharyngeal swabs were collected upon ED admission.

Results: the final study population consisted of 92 patients, 48 with negative and 44 with positive SARS-CoV-2 swabs. No significant differences were observed in concentrations of CRP, IL-6, or PCT between patients with or without acute SARS-CoV-2 infection. A significant correlation was found between CRP and IL-6 in both negative ($r=0.77$) and positive ($r=0.74$) SARS-CoV-2 cases, between CRP and PCT in SARS-CoV-2 negative ($r=0.38$) and positive ($r=0.44$) cases, and between IL-6 and PCT in SARS-CoV-2 negative ($r=0.37$) and positive ($r=0.40$) cases. The area under the curve (AUC) of none of the biomarkers could efficiently discriminate patients with negative or positive swabs (CRP: 0.52; IL-6: 0.51; PCT: 0.53).

Conclusions: routine measurement of CRP and IL-6, together with PCT, does not seem a useful pre-test strategy in ED patients with clinical suspicion of COVID-19.

INTRODUCTION

The continuous spread of severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is responsible for the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic outbreak, is causing a devastating impact on healthcare services, society and economy across the world (1). With the number of COVID-19 cases exponentially growing, the volume of molecular tests, which are still considered the gold standard for diagnosing SARS-CoV-2 infection, has increased to such a large extent that most clinical laboratories are no longer capable of meeting testing needs. According to a

recent survey of the American Association of Clinical Chemistry (AACC) carried out in September 2020, more than half of respondent laboratories declared to be unable to obtain the materials needed to perform all the necessary tests (2). Specifically, over 60% of all laboratories which participated in the survey reported that they were unable to secure test kits and supplies, whilst more than half reported being plagued by a shortage of staff required to run the tests.

Overall, the data clearly demonstrates that the current testing strategy seems to have failed in many countries (3,4), and that different approaches are urgently need for counteracting the ongoing emergency

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry, University Hospital of Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona (Italy), Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 20.10.2020

Revisionato: 20.10.2020

Accettato: 25.10.2020

Pubblicato on-line: 04.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.095

of providing tests to all who will need them. Some strategies have been suggested for enhancing the efficacy and the likelihood of obtaining positive results of molecular testing, including pre-test probability calculation of nucleic acid amplification test (NAAT) positivity, the use of rapid molecular tests which would not require RNA extraction and purification, pooling together and then measuring a variable number of clinical samples, and rapid (antigen) testing (5,6). With respect to pre-test probability calculation, a number of models have been proposed and validated, with the aim of quickly and accurately assessing the individual risk of SARS-CoV-2 infection, especially during the triage in the emergency room (7-11). Although the cumulative diagnostic performance of these algorithms is rather heterogeneous, some of these - such as the so-called "corona-score" - display acceptable accuracy (i.e., between 70-90%) (7,8).

One essential and common element of all these pre-test scoring systems is the incorporation of laboratory tests within the algorithm, especially inflammatory biomarkers, such as C-Reactive Protein (CRP) and ferritin, as well as pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6). This is mostly due to the fact that the pathogenesis of COVID-19 is characterized by a systemic immune hyperactivation, which can be accompanied by a so called "cytokine storm syndrome" (frequently abbreviated to "cytokine storm"), especially in patients with severe and/or critical disease. This syndrome is typically characterized by considerable release of pro-inflammatory mediators, imbalance of the renin-angiotensin-aldosterone system, as well as by a paradigmatic form of vascular disease, called COVID-19-associated coagulopathy (CC) (12). Importantly, the adverse clinical progression of COVID-19 seems also influenced by development of secondary (especially bacterial) co-infections (13,14), so that the measurement of procalcitonin (PCT) seems an important variable in patient evaluation and monitoring (15).

Due to the important role played by inflammatory and infection biomarkers in COVID-19 (16), the aim of this article was to evaluate whether the assessment of some of these molecules could help predicting the positivity of SARS-CoV-2 molecular testing upon patient presentation to the emergency department (ED).

METHODS

The study population consisted of a series of patients consecutively admitted to the ED of the University Hospital of Verona, with clinical suspicion of SARS-CoV-2 infection (i.e., fever, dyspnea, cough, gastrointestinal and other pathognomonic symptoms) over a 2 weeks period. Blood samples were collected upon ED presentation along with oral- and nasopharyngeal swabs, according to standard procedures and in accordance with the World Health Organization (WHO) recommendations (17). Molecular analysis for detecting SARS-CoV-2 RNA was carried out using Seegene AllplexTM2019-nCoV Assay (Seegene, Seoul, South

Korea), in which viral RNA identification is based on multiplex Real time polymerase chain reaction (PCR) targeting three SARS-CoV-2 genes (*E*, *RdRP* and *M*), and thus fulfilling validated international testing protocols. The serum concentration of CRP, PCT and IL-6 was measured on MAGLUMI 800 (SNIBE, Shenzhen, China), according to manufacturer's instructions. All these immunoassays are based on chemiluminescent detection. The performance of the tests, as declared by the manufacturer, are as follows: CRP: functional sensitivity 0.00015 mg/L, linearity up to 100 mg/L, total imprecision $\leq 6\%$; IL-6: limit of detection 1.5 pg/mL, linearity up to 5000 pg/mL, and total imprecision $\leq 7\%$; PCT: limit of detection 0.04 ng/mL, linearity up to 10 000 ng/mL (with dilution) and total imprecision $\leq 10\%$.

Results were finally expressed as median with interquartile range (IQR). The comparison of biomarker values between SARS-CoV-2 negative and positive patients was carried out with Mann-Whitney U or Chi-Squared tests when appropriate, the potential associations were assessed with Spearman's correlation (and relative 95% confidence interval; 95% CI), whilst their diagnostic performance was assessed with receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The statistical analysis was carried out using Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK). The general study design has been cleared by the local Ethical Committee (University Hospital of Verona; SOPAV-2; protocol n. 35747).

RESULTS

The final study population included 92 patients, 48 with negative swab [mean (SD), 54 (20) years; 58% women] and 44 with positive swab for SARS-CoV-2 [57 (23) years; 50% women]. No additional information on the final diagnosis could be obtained for patients testing negative for SARS-CoV-2 infection. The concentration of none of the three biomarkers appeared significantly different between patients testing positive or negative for SARS-CoV-2. Specifically, the concentration of the three biomarkers was CRP: 20 mg/L (IQR, 3-75 mg/L) *versus* 17 mg/L (IQR, 5-66 mg/L; $p=0.198$); IL-6: 27 pg/mL (IQR, 12-65 pg/mL) *versus* 24 pg/mL (IQR, 12-59 pg/mL; $p=0.146$) and PCT: 0.06 ng/mL (IQR, 0.01-0.11 ng/mL) *versus* 0.05 ng/mL (IQR, 0.01-0.11 ng/mL; $p=0.279$) (Figure 1). Although a significant number of patients displayed biomarker values above the relative upper reference limit (URL), such percentages for CRP (URL, 0.7 mg/L; 86% *versus* 90%; $p=0.634$), IL-6 (URL, 7 pg/mL; 98% *versus* 98%; $p=0.950$) and PCT (URL, 0.05 ng/mL; 50% *versus* 52%; $p=0.842$) were not found to be significantly different in patients testing positive or negative for SARS-CoV-2 infection.

A significant correlation was found between CRP and IL-6 in both negative ($r=0.77$; 95% CI, 0.61-0.87; $p < 0.001$) and positive ($r=0.74$; 95% CI, 0.57-0.84; $p < 0.001$) SARS-CoV-2 cases, between CRP and PCT in SARS-CoV-2 negative ($r=0.38$; 95% CI, 0.10-0.61;

$p=0.010$) and positive ($r=0.44$; 95% CI, 0.18-0.65; $p=0.002$) cases, as well as between IL-6 and PCT in SARS-CoV-2 negative ($r=0.37$; 95% CI, 0.08-0.60; $p=0.013$) and positive ($r=0.40$; 95% CI, 0.13-0.61; $p=0.005$) cases.

The analysis of the area under the curve (AUC) revealed that none of these three biomarkers could efficiently discriminate patients with negative or positive swab for SARS-CoV-2 (Figure 2). More specifically, the serum concentration of neither CRP (AUC, 0.52; 95% CI, 0.40-0.64), IL-6 (AUC, 0.51; 95% CI, 0.39-0.63), or PCT (AUC, 0.53; 95% CI, 0.41-0.65) was found to have a statistically significant accuracy for predicting swab positivity for SARS-CoV-2.

DISCUSSION

Although a pro-inflammatory state seems commonplace in patients with SARS-CoV-2 infection, especially in those with unfavorable progression (18), our evidence on the values of CRP, IL-6 and PCT in a cohort of patients acutely presenting to the ED with clinical suspicion of SARS-CoV-2 infection clearly attests that these biomarkers are not predictive enough of swab positivity to be used as a valid pre-molecular test strategy.

These results are not really surprising according to recent literature data. Sinha et al. studied 39 patients with SARS-CoV-2 (19), and compared their clinical and laboratory data with those of 39 patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by

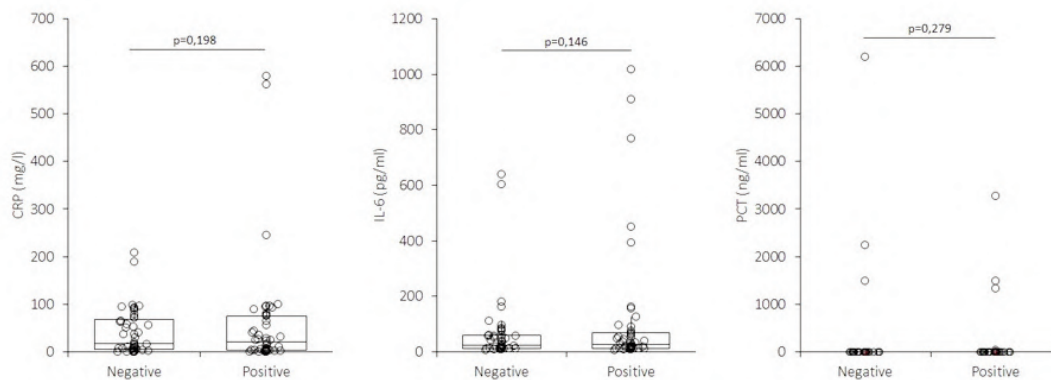


Figure 1

Serum concentration of C-Reactive Protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and procalcitonin (PCT) upon emergency department presentation in a cohort of patients who tested negative or positive for suspected severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection.

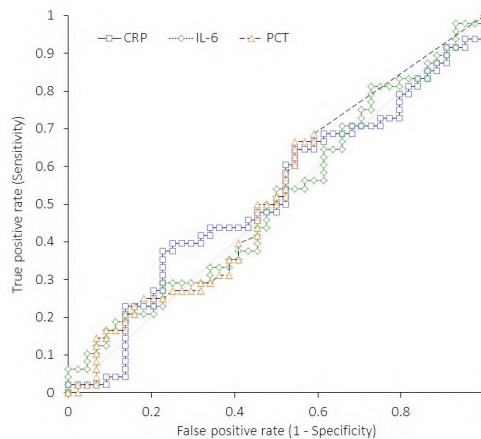


Figure 2

Diagnostic performance in receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of C-Reactive Protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and procalcitonin (PCT) upon emergency department admission in a cohort of patients who tested negative or positive for suspected severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection.

diseases other than COVID-19. Notably, not only was the rate of hyperinflammatory syndrome found to be slightly lower in patients with COVID-19 ARDS than in those with respiratory failure due to other reasons (i.e., 21% versus 28%), but also the concentration of some pro-inflammatory biomarkers, especially IL-6 ($p=0.35$), was found to be similar between the two patient cohorts. In an ensuing article, Leisman et al. carried out a meta-analysis of all COVID-19 studies reporting cytokine concentrations in patients with severe/critical COVID-19 compared to those with sepsis, cytokine release syndrome or ARDS unrelated to COVID-19 (20). In keeping with our evidence, the "cytokine storm" in patients with COVID-19 was found to be of lesser extent compared to that of the other conditions. In particular, the increase of several pro-inflammatory biomarkers such as CRP, IL-6 and ferritin was found to be similar or even globally lower in COVID-19 patients with severe and critical illness than in patients with sepsis, cytokine release syndrome or ARDS unrelated to COVID-19. The serum concentration of PCT was also found to be lower in patients with COVID-19 than in those with sepsis, whilst D-dimer values were found to be consistently higher. However, interferon response, seemed to be substantially suppressed in COVID-19 compared to the other diseases. This would hence confirm that COVID-19 may be characterized by a tendency of developing a viral-induced immunosuppression/anti-inflammatory cytokine response, i.e. an "immunoparalysis" (21), leading to a dysregulated, or even paradoxically inadequate, inflammatory response to SARS-CoV-2 infection, whilst direct cytopathic injury in several organs and tissues, along with the profuse endothelial damage, would place immunothrombosis at the very core of the pathogenesis of COVID-19 (1,22).

Although we could not collect information on the final diagnosis of patients who tested negative for SARS-CoV-2, which is the major limitation of this study, we can however conclude that CRP, IL-6 and PCT cannot efficiently discriminate COVID-19 from other acute diseases leading patient presentation to the ED. There is significant heterogeneity with respect to clinical indications and patient needs for presentation in various EDs, that may often be impacted by geographical variability, as well as seasonal trends (e.g., influenza), which further complicates the use of these biomarkers even in well-validated SARS-CoV-2 pre-test probability scoring systems (23). Therefore, the routine measurement of CRP, IL-6, and PCT, does not appear a useful pre-test strategy in patients presenting to the ED with clinical suspicion of COVID-19. Their measurement should be reserved for disease monitoring and prognostication, rather than for specific diagnostic purposes.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCE

- Lippi G, Sanchis-Gomar F, Henry BM. COVID-19: unravelling the clinical progression of nature's virtually perfect biological weapon. *Ann Transl Med* 2020;8:693.
- American Association of Clinical Chemistry. Coronavirus Testing Survey. Available at: <https://www.aacc.org/science-and-research/covid-19-resources/aacc-covid-19-testing-survey>. Last accessed: October 2020.
- Todd B. The U.S. COVID-19 Testing Failure. *Am J Nurs* 2020;120:19-20.
- Thornton J. Covid-19: Delays in getting tests are keeping doctors from work, health leaders warn. *BMJ* 2020;370:m3755.
- Lippi G, Henry BM, Sanchis-Gomar F, et al. Updates on laboratory investigations in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed* 2020;91:e2020030.
- Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Concise guide to coronavirus disease 2019 (COVID-19) diagnostics. *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.052.
- Kurstjens S, van der Horst A, Herpers R, et al. Rapid identification of SARS-CoV-2-infected patients at the emergency department using routine testing. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1587-93.
- Lippi G, Henry BM, Hoehn J, et al. Validation of the Corona-Score for rapid identification of SARS-CoV-2 infections in patients seeking emergency department care in the United States. *Clin Chem Lab Med*. 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-1121.
- Allen WE, Altae-Tran H, Briggs J, et al. Population-scale longitudinal mapping of COVID-19 symptoms, behaviour and testing. *Nat Hum Behav* 2020;4:972-82.
- Qin L, Yang Y, Cao Q, et al. A predictive model and scoring system combining clinical and CT characteristics for the diagnosis of COVID-19. *Eur Radiol* 2020 doi: 10.1007/s00330-020-07022-1.
- Yang HS, Hou Y, Vasovic LV, et al. Routine laboratory blood tests predict SARS-CoV-2 infection using machine learning. *Clin Chem* 2020 doi: 10.1093/clinchem/hvaa200.
- Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020;507:167-73.
- Giacobbe DR, Battaglini D, Ball L, et al. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. *Eur J Clin Invest* 2020;50:e13319.
- Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:1958-64.
- Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;505:190-1.
- Favaloro EJ, Lippi G. Recommendations for Minimal Laboratory Testing Panels in Patients with COVID-19: Potential for Prognostic Monitoring. *Semin Thromb Hemost* 2020;46:379-82.
- World Health Organization. Laboratory testing for COVID-19 in suspected human cases. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Last accessed, October 2020.
- Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med* 2020 doi: 10.1001/jamainternmed.2020.3313.
- Sinha P, Calfee CS, Cherian S, et al. Prevalence of phenotypes of acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with COVID-19: a prospective

- observational study. *Lancet Respir Med* doi: 10.1016/S2213-2600(20)30366-0.
20. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med* 2020 doi: 10.1016/S2213-2600(20)30404-5.
 21. Henry BM, Benoit S, Vikse J, et al. Functional immunoparalysis characterized by elevated Interleukin-10 and Interleukin-10-to-Lymphocyte Count Ratio is associated with severe disease and poor outcomes in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Med Rxiv* 2020 doi: 10.1101/2020.09.28.20203398.
 22. Franchini M. Alla scoperta della patogenesi del COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi: 10.19186/BC_2020.068.
 23. Lippi G, Horvath A, Adeli K. Editorial and executive summary: IFCC Interim Guidelines on clinical laboratory testing during the COVID-19 pandemic. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-1415.

Kinetics of SARS-CoV-2 IgG response: a model from a case report

Ettore Rocchi, Sara Peluso, Davide Sisti

Unit of Biostatistics and Biomathematics, Department of Biomolecular Sciences, Urbino University "Carlo Bo", Urbino, Italy

Dear Editor,

A few articles describing the temporal trend of the anti-SARS-CoV-2 IgG production, are presently available (1-4) and almost all of these studies deal mainly with the onset of the immune response and neglect the descending phase.

A mathematical model showing the trend and capable, at the same time, to predict it, has not been published yet. In this paper, we tried to model the kinetics of anti SARS-CoV-2 IgG, limited to the descending phase (during the ascending phase, the immunometric assays were not available yet in our Region). The model is based on a single patient, monitored over the time for the specific purpose of studying the immune response. Obviously, it is not possible to provide a statistical approach on a single case, but the result are potentially interesting, since the chosen model presents an excellent goodness-of-fit with the available data.

The subject, an Italian 57-year-old male, living in Pesaro (a province of the Marche Region, one of the main outbreaks of the epidemic in Italy), manifested the onset of symptoms (non-respiratory, but with diarrhea, asthenia, articular and muscle pain, anosmia, and ageusia) starting from March, 9th (fixed as day 0). The duration of the symptoms was 15 days. Health policy, in Italy, at that time, did not allow to perform the swab in the absence of fever, respiratory symptoms and a history of contact with positive subjects.

The blood samples were taken in the days 66, 95, 133 and 224 from the beginning of the symptoms; the immunological test were performed in a clinical laboratory, in Pesaro using a CLIA chemiluminescence assay, (MAGLUMI® SNIBE).

Typical equations of first-order kinetics were used to describe the trend of the IgG concentration, so that a negative exponential function was obtained:

$$C = a e^{-kt} \quad (1)$$

where t is time (days), C is the serum IgG concentration, k is the elimination constant, a is a constant reflecting the force of the immune response and e is the Euler's number.

Obviously, this approach was possible thanks to the fact that we had to model only the descending phase. With some easy mathematical passages, from (1) we obtain

$$\ln C = -kt + \ln a \quad (2)$$

In other words, we find that the logarithm of IgG concentration versus time is linear, so it is possible to apply linear regression methods. Moreover, once we have the equation parameters, it is possible to calculate both the half-life of the specific IgG and the time of their disappearance from the circulation (i.e. the time when the serological test turns negative, <1.1 AU/mL for MAGLUMI® diagnostic assay).

The graph of the exponential model (whose parameters were calculated by linear regression applied to the log-transformed data) is reported in Figure 1. The results show an excellent coefficient of determination ($R^2=0.9942$). Kinetics parameters for the descending phase of anti SARS-CoV-2 serum IgG concentration are shown in Table 1.

Corrispondenza a: Ettore Rocchi, Unit of Biostatistics and Biomathematics, Department of Biomolecular Sciences, Urbino University "Carlo Bo", Piazza Rinascimento 7, I-61029, Urbino (Italy). E-mail ettoreroccoli.uniurb@gmail.com

Ricevuto: 25.09.2020

Revisionato: 20.10.2020

Accettato: 26.10.2020

Pubblicato on-line: 04.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.096

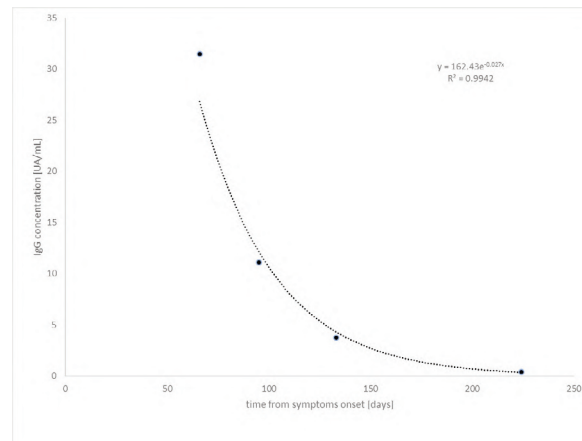


Figure 1
Exponential regression of kinetics data

Table 1
Kinetics parameters for the descending phase of anti-SARS-CoV-2 serum IgG concentration

Parameters	
k	0.027
a	162.43
t(1/2)	25.67 days
t-to-neg	199.98 days

k, elimination constant; *a*, constant reflecting the force of the immune response; *t*(1/2), half-life; *t*-to-neg, time required for the serological test to turn negative.

This result does not necessarily imply a deficiency of immune protection at the expected time of IgG disappearance (i.e. around 6 months, 190 days). Really, as Sette et al. (5) have recently highlighted, a cell-mediated immunity could still be present. Our data become particularly relevant, especially if confirmed on a broader number of patients, since they could be able to give indications about the time required for the serological test to turn negative. The disappearance of IgG antibodies within 6 months (around 190 days) after the onset of symptoms makes the use of antibody testing to infer contact or infection with SARS-CoV-2 more than 6 months previously, very unreliable, or even impossible.

The main limitations of this study are listed below:

- the study was carried on a single patient;
- the patient does not seem to be particularly representative of the COVID-19 positive population (no respiratory symptoms);
- no data on viral load are available;
- the analyzed curve concerns only the descending phase and therefore the IgG peak remains unknown.

Moreover, a huge variability of the IgG kinetics parameters among subjects can be predictable. Nevertheless and despite of the expected inter-subject variability, the good adaptation of the negative exponential model seems to be promising; it also suggests that the model could fit equally well for other cases, with other parameters.

Further studies will be needed to confirm the proposed model, as well as to estimate the variability of the kinetic parameters.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCE

1. Lynch KL, Whitman JD, Lacanienta NP, et al. Magnitude and kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibody responses and their relationship to disease severity. *Clin Infect Dis* 2020 doi: 10.1093/cid/ciaa979
2. Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020;71:778-85.
3. Suhandynata RT, Hoffman MA, Kelner MJ, et al. Longitudinal monitoring of SARS-CoV-2 IgM and IgG seropositivity to detect COVID-19. *J Appl Lab Med* 2020 doi: 10.1093/jalm/jfaa079.
4. Sun B, Feng Y, Mo X, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:940-8.
5. Sette A, Crotty S. Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns. *Nat Rev Immunol* 2020;20:457-8.

Sindrome simil-Kawasaki in una bambina positiva al SARS-CoV-2: l'approccio di laboratorio

Eleonora Palella, Federica Spolaore, Micaela Corbo, Silvia Fasanella, Patrizio Caciagli

Unità Operativa di Patologia Clinica, Ospedale S. Chiara, Trento

ABSTRACT

Kawasaki-like disease in a positive SARS-CoV-2 child: a laboratory approach.

This case describes the clinical presentation of a Kawasaki-like syndrome, an inflammatory process that can affect all blood vessels of the body and may cause cardiac complications, such as coronary artery aneurysms. Patients are typically children, the majority of them are below 5-year-old, who initially present high fever and non-specific skin rash. The girl who came to our attention showed typical clinical symptoms and the diagnosis of Kawasaki disease was made based on the clinical evaluation, anamnesis and interpretation of laboratory results. This case came to our observation during the recent Coronavirus pandemic infection in Northeast of Italy, and can be classified as a Kawasaki-like syndrome. The laboratory data recorded at the time of diagnosis and during the follow-up are presented and discussed.

CASO CLINICO

La paziente, una bambina di 3 anni proveniente dalla regione Lombardia, una delle regioni italiane più colpite dalla pandemia di COVID-19, è giunta al pronto soccorso pediatrico dell' Ospedale Santa Chiara di Trento, in seguito alla persistenza di febbre (37,5°C) refrattaria alla terapia con paracetamolo, trattata a domicilio con terapia antibiotica (Cefaclor Monoidrato) con iperemia faringea ed eruzione cutanea sul palmo delle mani e sulla pianta dei piedi. La bambina presentava, inoltre, tachipnea, astenia, irritazione bilaterale degli occhi ed esfoliazione della mucosa delle labbra. All'esame obiettivo iniziale le condizioni generali erano buone; venivano rilevati i seguenti parametri: frequenza cardiaca, 145 atti ritmici; frequenza respiratoria, 54; pressione arteriosa 87/45 mmHg; temperatura corporea, 36°C; saturazione di ossigeno, 95% in aria ambiente; dolore, 0/10 (scala FLACC, per la valutazione del dolore in pediatria); AVPU (scala per la valutazione del livello di coscienza), A. L'obiettività toracica e la valutazione radiografica sono risultate negative; l'addome si presenta piatto, trattabile, con organi ipocondriaci nei limiti. All'esame ecocardiografico

sono emerse una riduzione del calibro delle coronarie ed una minima insufficienza trans valvolare mitralica.

All'anamnesi, i genitori riferivano di aver eseguito test sierologico rapido per SARS-CoV-2 risultato positivo per IgM e IgG. Entrambi avevano presentato sintomi compatibili con l'infezione da COVID-19, non confermata tuttavia dal tampone rinofaringeo.

Durante il ricovero in pediatria, sono stati eseguiti numerosi esami emato-chimici; le alterazioni più significative di questi sono presentate in Tabella 1. La ricerca del genoma SARS-CoV-2 da mucosa nasofaringea, eseguita con metodo di reazione a catena della polimerasi inversa è risultata positiva con rilevazione del gene RdRP (Tabella 1); il test sierologico è pure risultato positivo per IgG. Nella fase iniziale del ricovero, l'emocromo presentava le alterazioni quantitative tipiche della infezione da SARS-CoV-2: un aumento del conteggio dei neutrofili e una concomitante diminuzione del numero dei linfociti (1,2). Allo striscio periferico sono state riscontrate anche anomalie morfologiche a carico dei neutrofili che riguardavano sia la granulazione nucleare che citoplasmatica con la presenza di granulazioni simili a quelle tossiche, con aree agranulari blu-chiaro periferiche. Le anomalie della morfologia

Corrispondenza a: Eleonora Palella, Largo Medaglie d'Oro n.9, 38122, Trento, Tel 0461903168, E-mail eleonora.palella@apss.tn.it

Ricevuto: 06.08.2020

Revisionato: 28.09.2020

Accettato: 17.10.2020

Pubblicato on-line: 09.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2019.092

Tabella 1
Esami biochimici significativi eseguiti all'ammissione ed alla dimissione

		Valori di riferimento	Ricovero (2.05.2020)	Dimissione (19.05.2020)
Test molecolare per SARS-COV-2	metodo PCR real time		positivo (rilevato gene <i>RdRP</i>)	non rilevabile
Esame sierologico	SARS-COV-2 IgG (metodo in chemiluminescenza)	1,47 index (campione/calibratore)	7,19	non eseguito
Marcatori infiammatori	S-Proteina C Reattiva (mg/L)	<0,6	262	3,4
	B-VES (mm/h)	<37	71	3
	S-IL6 (pg/mL)	0-4,4	1159,1	non eseguito
	S-Ferritina (ng/mL)	8-140	342	171
Marcatori Cardiaci	P-NT-proBNP (pg/mL)	<125	5500	136
Parametri coagulativi	P-Fibrinogeno (mg/dL)	200-450	471	157
	P-Antitrombina %	75-125	41	111
	P-D-Dimero (ng/mL)	<250	2007	559
Tipizzazione linfocitaria	CD16+CD56 (Cellule Natural Killer)	3-20 %	0,6	non eseguito
	CD19 (Linfociti B totali)	4-29%	34,4	non eseguito

nucleare mostrano una elevata frequenza di forme a banda ma anche di cellule dismorfiche con totale assenza di segmentazione nucleare, simili a quelle riscontrate nello "pseudo-Pelger". È stata inoltre osservata la presenza di granulociti immaturi (mielociti e metamielociti); le anomalie morfologiche dei linfociti erano relative alla presenza di linfociti attivati (1,2). In Figura 1 sono presentate alcune delle alterazioni morfologiche riscontrate

Su richiesta del clinico pediatra, che considerata la presentazione clinica, era interessato ad evidenziare l'eventuale presenza di una patologia autoimmune, sono stati anche eseguiti la tipizzazione immunofenotipica, che ha mostrato alterazione dei CD19 e CD16+CD56 (Tabella 1) ed è stato inoltre valutato un profilo autoimmunario che è risultato caratterizzato da positività degli anticorpi antinucleo (ANA) con titolo 1:640 e pattern di tipo "speckled" nel nucleo in interfase, con eterogeneità per dimensione, intensità di fluorescenza, distribuzione dei granuli e una fluorescenza granulare associata alla cromatina in metafase. Classicamente questa descrizione definisce tale pattern come "Dense Fine Speckled". Il quadro fluoroscopico è stato confermato dalla debole positività rilevata per l'antigene DFS-70 ottenuto dall'immunoblot di 19 antigeni associati alle connettività. Negativa la ricerca di anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili, anti-mieloperossidasi, anti-proteinasi 3 e fattore reumatoide.

Durante il ricovero si è assistito ad un aumento della temperatura corporea (38°C), alla comparsa di congiuntivite bilaterale non essudativa con palpebre eritemato-edematose, lingua rossa "fragola", faringe francamente iperemica, macule palmari eritematose bilaterali, più accentuate alle falangi distali e

linfadenopatia bilaterale plantare più sfumata, linfadenopatia non cervicale, eruzione cutanea non polimorfica del tronco. L'edema marcato a carico di mani e piedi, come pure l'oggettività cutanea e mucosa sono rimasti invariati anche al successivo esame fisico. Dal punto di vista respiratorio, è stata riscontrata dapprima una persistenza della respirazione superficiale con polipnea correlata all'analisi dei gas ematici di alcalosi respiratoria; la frequenza respiratoria si è poi progressivamente risolta in coincidenza della negativizzazione del tampone rinofaringeo ed i successivi parametri emogasanalitici arteriosi e venosi sono rientrati negli intervalli di riferimento.

La prima conclusione diagnostica è stata per sindrome di Kawasaki probabilmente atipica (simil-Kawasaki, SK).

Relativamente al trattamento farmacologico, all'arrivo in reparto, nel sospetto di SK è stata avviata terapia endovenosa con immunoglobuline (Ig) alla dose di 2 g/kg in accordo con le linee guida dell' American Heart Association del 2017 (3); il trattamento includeva acido acetilsalicilico 100 mg/die e, data l'assenza di miglioramento clinico, è stata inoltre iniziata in terza giornata una terapia con Deltacortene 1 mg/kg. A tale trattamento ha fatto seguito una risoluzione del quadro febbrile e la progressiva stabilizzazione della frequenza respiratoria. L'insufficienza mitralica è migliorata in seguito alla terapia anti-aggregante. I parametri di laboratorio sono progressivamente migliorati (Tabella 1), come pure si sono risolte le alterazioni della morfologia dei granulociti, mentre a carico dei linfociti si è riscontrata una persistente eterogeneità morfologica con grandi linfociti atipici, cellule linfoplasmacitoidi ed un aumento della percentuale di grandi linfociti granulari.

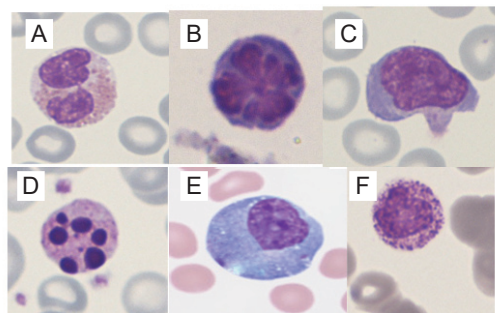


Figura 1

Anomalie morfologiche allo striscio periferico.

A Granulociti eosinofili displastici

B,C Linfociti attivati e plasmalinociti

D Neutrofili circolanti apoptotici

E Linfocita reattivo con citoplasma iperbasofilo

F Mielociti neutrofilici circolanti

DISCUSSIONE

Questo caso clinico descrive l'insorgenza di una sindrome di Kawasaki atipica, o SK (4), in una bambina di 3 anni affetta da COVID-19. La sindrome SK è identificata dagli Autori americani come "sindrome infiammatoria multisistemica dei bambini (MISC-C)", mentre in Europa e in Asia viene identificata come "sindrome multisistemica infiammatoria pediatrica temporaneamente associata alla infezione da SARS-CoV-2 (PIMS-TS)". La sindrome di Kawasaki, descritta dal medico giapponese T. Kawasaki nel 1967 (5), è una vasculite sistemica acuta ed autolimitante dei vasi arteriosi di medio e piccolo calibro che colpisce prevalentemente bambini di età inferiore ai 5 anni. Tale patologia è la causa più comune di malattia cardiaca acquisita nei bambini nei paesi sviluppati. La sua incidenza annuale negli Stati Uniti è di circa 20 casi per 100 000 con un tasso significativamente più alto tra gli asiatici e gli abitanti delle isole del Pacifico. La pandemia COVID-19 ha comportato un imprevisto aumento della prevalenza di questa sindrome tra pazienti sintomatici, soprattutto, ma non solo, bambini e adolescenti (6-8).

La sindrome di Kawasaki è descritta in letteratura come una malattia infiammatoria rara; spesso causa un'arterite coronarica acuta che si associa ad aneurismi delle arterie coronarie che, se non trattati, possono evolvere in una grave infiammazione sistemica con complicanze che possono risultare letali. Nella fase acuta, infatti, talvolta si può manifestare un'instabilità emodinamica che dà origine ad ipotensione, ipoperfusione e shock (sindrome da shock Kawasaki) che richiede il ricovero in terapia intensiva (9). Le osservazioni evidenziate finora dall'inizio della pandemia sembrerebbero rilevare l'emergere di un'entità nosologica autonoma, correlata a COVID-19, rispetto alla sindrome di Kawasaki (6-9).

La causa della sindrome di Kawasaki rimane sconosciuta, ma la stagionalità, la prevalenza nell'età infantile, la ricaduta rara ed il verificarsi nel corso di infezioni suggeriscono un'infezione pregressa o in atto ad eziologia prevalentemente virale. L'eziologia infettiva è stata correlata alla presenza di tossine batteriche con attività di superantigene, alle sindromi da shock tossico da stafilococco e da streptococco, alle infezioni da altri batteri meno comuni e da vari agenti virali, (10,11) ai quali ora possiamo aggiungere SARS-CoV-2 (8).

È importante riconoscere i primi segni e sintomi per una diagnosi tempestiva poiché le complicazioni possono essere prevenute con la somministrazione di Ig endovena entro un periodo di tempo critico (massimo 10 giorni) dall'inizio della malattia (3). La maggior parte dei bambini con SK mostra una rapida risoluzione della febbre e dei sintomi a seguito di questo intervento terapeutico.

Il trattamento riduce notevolmente il rischio di aneurisma dell'arteria coronaria, ma il 5-20% dei casi di SK non risponde, presentando persistenza o reiterazione della febbre e richiedendo quindi ulteriori terapie con antinfiammatori. I pazienti resistenti al trattamento con Ig hanno un aumentato rischio di sviluppare aneurismi coronarici (3,12).

Nel caso clinico discusso, la malattia è stata diagnosticata in base all'associazione sintomatologica caratteristica di febbre, linfadenopatia, eruzione cutanea, alterazioni delle mucose, desquamazione ed è stata facilitata e confermata dall'appropriata scelta degli esami di laboratorio.

La negativizzazione del tampone nasofaringeo e la normalizzazione degli esami di laboratorio, durante il ricovero in ospedale, sono stati di grande importanza per valutare l'efficacia della terapia e la concomitante risoluzione clinica della malattia, senza che si sviluppassero complicazioni o disfunzioni degli organi. In assenza di un trattamento specifico, i sintomi clinici di solito si sviluppano tra 7 e 14 giorni e si risolvono gradualmente, ma la febbre ed il grave processo infiammatorio potrebbero persistere per 2-4 settimane in casi gravi non trattati (12,13) e le complicanze cardiovascolari e dermatologiche potrebbero peggiorare. Da questo e da altri casi descritti in letteratura, possiamo trarre la conclusione che è essenziale mantenere un alto grado d'allerta e sospettare la SK in tutti i bambini con febbre prolungata provenienti da zone di pandemia per infezione da Coronavirus e, quindi, richiedere con la dovuta appropriatezza un ampio pannello di esami di laboratorio che includano necessariamente l'esame emocromocitometrico accompagnato dalla valutazione accurata dello striscio periferico nonché la valutazione degli indici infiammatori ed emogasanalitici. Inoltre, sia la tipizzazione immunofenotipica che gli anticorpi anti nucleo possono contribuire a chiarire il quadro. La tipizzazione immunofenotipica è stata richiesta dal clinico pediatra in quanto nei pazienti SARS-CoV-2 positivi è stata rilevata un'alterazione a carico dei linfociti T CD8+ e CD4+ la cui funzionalità può risultare,

quindi, compromessa (14). La richiesta del clinico di determinare gli ANA è stata dettata dalla necessità di escludere una eventuale componente autoimmunitaria in questa presentazione clinica così complessa. La determinazione degli ANA è infatti utilizzata come test di screening per le più frequenti malattie autoimmunitarie reumatiche sistemiche (SARD). Il riscontro della positività agli ANA con pattern DSF-70 ad alto titolo esclude la fase attiva di SARD e conferma la reazione del sistema immunitario ad un agente infettivo. L'infezione infatti induce uno stress ossidativo cellulare ed uno stato infiammatorio con sovra-regolazione del gene *DFS70/LEDGFp75* che si traduce nella produzione di anticorpi IgG anti DFS-70 (15).

E' auspicabile, in futuro, la creazione di uno specifico pannello di esami laboratoristici che possa indirizzare precocemente alla diagnosi di una sindrome che si configura come una patologia infiammatoria dei vasi correlata ad infezione da SARS-CoV-2 nei giovani pazienti e che richiede una individuazione ed un trattamento tempestivo.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Zini G, Bellesi S, Ramundo F, et al. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am J Hematol* 2020;95:870-2.
2. Wang F, Nie J, Wang H, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis* 2020;221:1762-9.
3. McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation* 2017;135:927-9.
4. Levin M. Childhood multisystem inflammatory syndrome. *N Engl J Med* 2020;383:393-5.
5. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, et al. . A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics* 1974;54:271-6.
6. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A, et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicenter of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* 2020;395(10239):1771-8.
7. McCrindle BW, Manhiot C. SARS-CoV-2-related inflammatory multisystem syndrome in children: different or shared etiology and pathophysiology as Kawasaki disease? *JAMA* 2020;324:246-8.
8. Toubiana J, Poirault C, Corsia A, et al. Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the COVID-19 pandemic in Paris, France: prospective observational study *BMJ* 2020 doi: 10.1136/bmj.m2094.
9. Belhadjer Z, Méot M, Bajolle F, et al. Acute heart failure in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in the context of global SARS-CoV-2 pandemic. *Circulation*. 2020 doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048360.
10. Leung DYM, Schlievert PM. Kawasaki syndrome: role of superantigens revisited. *FEBS J* 2020 doi: 10.1111/febs.15512.
11. Menikou S, Langford PR, Levin M. Kawasaki Disease: The role of immune complexes revisited. *Front Immunol* 2019 doi: 10.3389/fimmu.2019.01156.
12. Chen S, Dong Y, Kiuchi MG, et al. Coronary artery complication in Kawasaki disease and the importance of early intervention : a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr* 2016;170:1156-63.
13. Rife E, Gedalia A. Kawasaki disease: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2020 doi: 10.1007/s11926-020-00941-4.
14. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020;17:541-3.
15. Ochs RL, Mahler M, Basu A, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med* 2016;16:273-93.



BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.