

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

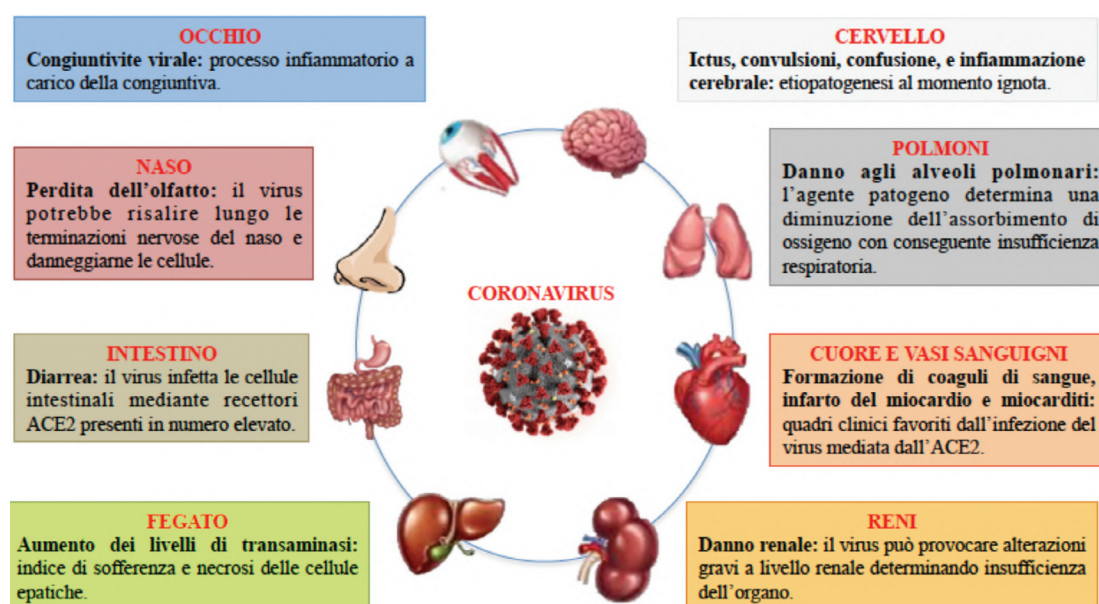


Figura 1. Principali organi coinvolti nell'infezione dall'agente virale SARS-CoV-2.

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

1. 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.
2. HealthMap COVID-19. Updated 2020-07-16. <https://www.healthmap.org/covid-19/> (ultimo accesso: agosto 2020)
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;14:126-35.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Jian-Wei W, Bin C, Chen W. Science in the fight against the novel coronavirus disease. *Chin Med J* 2020;133:1009-11.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Zudaire E, Portal-Núñez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Boil* 2006;80:237-44.
20. 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.
21. 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.
22. Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, et al. Adrenomedullin-RAMP2 system in vascular endothelial cells. *Atheroscler Thromb* 2015;22:647-53.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005;51:1823-9.
28. 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.
29. Nishikimi T. Adrenomedullin in the kidney-renal physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem* 2007;14:1689-99.
30. 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.