

Studio sulla presenza di componenti monoclonali in pazienti con infezione da SARS-CoV-2: dati preliminari

Roberta Marinelli¹, Andrea Sartorio², Valentina Muraro¹, Flora Formenton¹, Francesca Pennetta¹, Elena Simoni³, Gian Luca Casoni⁴, Alberto Mazza⁵, Stefano Cuppini⁵, Alessandro Camerotto¹

¹UOC Medicina di Laboratorio, AULSS 5 Polesana, Rovigo

²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona

³Dipartimento Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova

⁴UOC Pneumologia, AULSS 5 Polesana, Rovigo

⁵UOC Medicina, AULSS 5 Polesana, Rovigo

ABSTRACT

Presence of monoclonal components in SARS-CoV-2 patients: preliminary data.

Introduction: electrophoresis of serum proteins (EF) is indicated for the identification and monitoring of monoclonal components (CM). It has been shown that interleukins play a role in the differentiation of B cells in plasma cells producing immunoglobulins; it has been also demonstrated that COVID-19 patients show a higher prevalence of CM in comparison to the general population. The aim of this work is to retrospectively evaluate the presence of CM in patients hospitalized with COVID-19, compared to a population of patients admitted in non-COVID-19 wards.

Methods: EF was performed in the two groups of patients (COVID positive and negative) using capillary electrophoresis. Patients with previous plasma cell dyscrasias have been excluded.

Results: the results show that in the COVID positive group, the incidence of CM is statistically higher compared to the COVID negative group (39.7% versus 13.3%). In one patient, the CM was no longer detectable when the swab became negative.

Conclusions: the study confirmed that the viral infection produces detectable CM, probably transitory as shown by a case index. The pathogenesis of the phenomenon could be explained by the cytokine stimulus on B cells and by the interaction of the virus with the lymphocyte ACE 2 receptor. Larger studies are needed to confirm the presented data.

Parole chiave: elettroforesi delle sieroproteine, componente monoclonale, COVID-19

INTRODUZIONE

Una componente monoclonale (CM) è una immunoglobulina secreta da un clone di linfociti B che, se prodotta in quantità sufficiente, viene evidenziata come un picco monoclonale all'elettroforesi delle proteine sieriche (EF) (1). Come indicato da anni, anche nelle pagine di questa rivista dal Gruppo di Studio "Proteine" SIBioC, l'indicazione per la richiesta di EF è la ricerca delle CM, la loro quantificazione densitometrica e il successivo monitoraggio indicato con MRI (Minimum Re-testing Interval) da 3 a 6 mesi dopo il primo riscontro e, se stabili, ogni 6-12 mesi (2-3).

Nel marzo 2021, nella recrudescenza dei ricoveri per

COVID-19, si è avuta la percezione che l'incidenza di CM nei reparti dedicati ai pazienti COVID-19 della AULSS 5 Polesana (Rovigo) fosse elevata; il fenomeno è stato quindi analizzato più approfonditamente.

Lo scopo del lavoro è valutare la presenza di CM in pazienti COVID-19 positivi rispetto ad una popolazione di pazienti COVID-19 negativi ricoverati nello stesso periodo.

METODI

È stato condotto uno studio retrospettivo considerando due gruppi di pazienti: un gruppo COVID-19 negativo (COV-) e un altro COVID-19 positivo (COV+).

Corrispondenza a: Roberta Marinelli, UOC Medicina di Laboratorio, AULSS 5 Polesana, Rovigo, E-mail roberta.marinelli@aulss5.veneto.it

Ricevuto: 17.06.2021

Revisionato: 27.08.2021

Accettato: 30.08.2021

Pubblicato on-line: 14.09.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.062

Nel periodo compreso tra il 25 marzo e il 30 aprile 2021, sono stati considerati i pazienti ricoverati nelle Unità Operative rispettivamente di Medicina Generale dell'Ospedale di Rovigo (pazienti COV-) e di COVID (Terapia Semi Intensiva e Pneumologia) dell'Ospedale di Trecenta (pazienti COV+).

Nella Unità Operativa di Medicina Generale i pazienti erano ricoverati soprattutto per patologie croniche cardiovascolari, epatopatie, nefropatie e patologie respiratorie. La richiesta di elettroforesi proteica (EF) è inserita nel profilo di ingresso di questi reparti quale "consuetudine prescrittiva"; i pazienti considerati avevano perciò tutti eseguito una EF al momento del ricovero ospedaliero e quindi prima di ogni somministrazione farmacologica. In particolare, per i pazienti COV+ trattati con l'anticorpo monoclonale Tocilizumab (n 5), l'EF è stata eseguita prima della somministrazione del farmaco.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con precedente riscontro di presenza di CM o diagnosi nota per discrasie plasmacellulari, mediante ricerca nel data base del laboratorio, quando possibile. I pazienti oggetto dello studio, così selezionati, sono stati 163.

I sieri sono stati analizzati mediante EF con tecnologia capillare e successiva immunosottrazione per la tipizzazione della eventuale CM presente, seguendo i protocolli operativi della Ditta produttrice (Sebia, Italia). La strumentazione utilizzata è stata Capillarys 3 Tera, e Hydragel Sebia Italia per EF e immunotipizzazione, rispettivamente.

Metodi statistici

L'analisi statistica è stata eseguita con software Jamovi ver. 1.8.2, The jamovi project (2021).

La numerosità campionaria non è stata definita a priori, ma sono stati arruolati i pazienti presenti nei reparti precedentemente indicati che rispondessero ai criteri di selezione utilizzati.

Per confrontare le caratteristiche dei due gruppi, relativamente alle variabili qualitative, i dati sono stati analizzati con il test del chi-quadro o, quando necessario, con il test esatto di Fisher. Le variabili quantitative sono state analizzate con il test U di Mann-Whitney, previa esecuzione del test di Shapiro-Wilks. In seguito è stata eseguita una regressione logistica multivariata per analizzare se la presenza di CM fosse correlata o meno all'infezione. Il modello di regressione ha considerato come variabili età, sesso e presenza di COVID-19, mentre la variabile dipendente considerata è stata la presenza di CM. I risultati sono stati espressi con Odds ratio e Intervallo di Confidenza al 95% (IC 95%).

Data l'assenza di analisi a priori sulla numerosità campionaria e la differente numerosità dei due campioni, è stata eseguita un'analisi *post-hoc* per valutare la potenza statistica ottenuta. Considerando la differente prevalenza di CM nei due gruppi con una probabilità di errore $\alpha=0,05$ in un modello a due code, la potenza ottenuta è stata pari a 0,96.

Il livello di significatività scelto per tutti i test è stato $p < 0,05$.

I grafici sono stati creati con Google Fogli, Google LLC.

RISULTATI

Dei 163 pazienti arruolati, 58 costituivano il gruppo COV+ e 105 il gruppo COV-. Come presentato in Tabella 1, le caratteristiche anagrafiche dei due gruppi (sesso ed età) sono differenti anche se la significativa statistica non viene raggiunta; nel gruppo COV+ la percentuale dei maschi è maggiore (72,4 *versus* 50,5) e l'età mediana lievemente più bassa (70 *versus* 76 anni). Relativamente alla presenza di CM la differenza è, al contrario, marcata e statisticamente significativa: i pazienti con CM nel gruppo COV+ sono il 39,7%, mentre sono il 13,3% nel gruppo COV- ($p < 0,001$).

Sono stati poi valutati i pazienti rispetto alla presenza/assenza di CM sulla base di sesso, età e positività per COVID-19, riscontrando differenze statisticamente significative soltanto rispetto a quest'ultima; infatti il 62,2% dei pazienti con CM era COV+, e solo il 27,8% di questi non presentava una CM come mostrato in Tabella 2 e Tabella 3.

I risultati della tipizzazione delle CM rilevano che gli isotipi delle CM presenti nei pazienti COV- sono IgG kappa per il 42,9%, mentre nei pazienti COV+ la maggior parte delle CM (61,5%) è costituita da IgG lambda, difformemente da quanto descritto recentemente in letteratura (4), dove invece si è rilevata una prevalenza di IgG-kappa.

L'analisi di regressione logistica multivariata condotta su tutti i pazienti, i cui risultati sono riportati in Tabella 4, evidenzia che la positività per COVID-19 è associata allo sviluppo di CM indipendentemente dall'età e dal sesso, con un Odds-ratio=4,56 (IC95%: 2,03-10,29).

Tabella 1

Caratteristiche dei pazienti dei due gruppi (COVID-19 positivi e negativi) considerati nello studio. Per le variabili qualitative viene riportata la numerosità (n) e la presenza nel relativo gruppo (%); per l'età viene riportata la mediana e lo scarto interquartile (IQR)

	Pazienti COVID-19 positivi (n=58)	Pazienti COVID-19 negativi (n=105)	p
Maschi n (%)	42 (72,4%)	53 (50,5%)	0,007
Femmine n (%)	16 (27,6%)	52 (49,5%)	0,007
Età mediana (IQR)	70 (15,8)	76 (15)	0,007
CM n (%)	23 (39,7%)	14 (13,3%)	<0,001

CM, componente monoclonale.

Tabella 2

Caratteristiche dei pazienti considerati nello studio, suddivisi sulla base della presenza di CM. Per le variabili qualitative viene riportata la numerosità (n) e la prevalenza nel relativo gruppo (%); per l'età viene riportata la mediana e lo scarto interquartile (IQR)

	Pazienti con CM (n=37)	Pazienti senza CM (n=126)	p
Maschi n (%)	25 (67,6%)	70 (55,6%)	0,193
Femmine n (%)	12 (32,4%)	56 (44,4%)	
Età mediana (IQR)	71 (9)	74 (20,8)	0,582
Pazienti COVID-19 positivi n (%)	23 (62,2%)	35 (27,8%)	<0,001

CM, componente monoclonale.

Tabella 3

Caratteristiche dei pazienti considerati nello studio, divisi sulla base della presenza/assenza di componente monoclonale

	Pazienti con CM	Pazienti senza CM	Totale
Pazienti COVID-19 positivi	23	35	58
Pazienti COVID-19 negativi	14	91	105
Totale	37	126	163

CM, componente monoclonale.

Tabella 4

Regressione logistica multivariata applicata a tutti i pazienti, con variabile dipendente la presenza di componente monoclonale

	Odds-ratio	p
Sesso	0,74 IC95%: 0,32-1,7	0,457
Età	1,02 (IC95%: 0,99-1,05)	0,207
Positività per COVID-19	4,56 (IC95%: 2,03-10,29)	<0,001

IC95%, intervallo di confidenza al 95%.

DISCUSSIONE

La presenza di CM definisce le discrasie plasmacellulari (1,5), un gruppo eterogeneo di condizioni di cui fanno parte le Gammopatie Monoclonali di Significato Indeterminato (MGUS) comprese le CM transitorie, il Mieloma Multiplo Smoldering (SMM), Mieloma Multiplo (MM) e la Macroglobulinemia di Waldenstrom (WM).

Nella pandemia da SARS-CoV-2 evidenze emergenti (6,7) suggeriscono che la severità e la prognosi sfavorevole sono correlate ad una risposta del sistema immunitario fuori controllo, principalmente caratterizzata da un eccessivo rilascio di citochine, evento definito come "tempesta citochinica" (6,7). Riguardo al ruolo nella differenziazione di linfociti B in plasmacellule e produzione delle CM, è stato evidenziato (8) come le interleuchine, in particolare la IL-6, possano rappresentarne lo stimolo. Inoltre è noto che anche i linfociti B possiedono recettori ACE 2 (9) e quindi l'interazione tra il Receptor Binding Domain (RBD) della proteina spike virale e il recettore cellulare potrebbe, indipendentemente dall'interleuchina, indurre la stimolazione clonale.

Nel nostro studio la presenza di CM nel gruppo di pazienti COV+ è risultata statisticamente superiore rispetto al gruppo di controllo (COV-). Con l'analisi multivariata, inoltre, è risultato evidente come la presenza della infezione sia associata al riscontro di CM, con un Odds-ratio=4,56 (IC95%: 2,03-10,29). Questo dato sembra rafforzare l'evidenza, presente anche in altri studi (9,4), di un'associazione tra l'infezione da SARS-CoV-2 e CM. Risulta interessante notare anche che la presenza di CM nel nostro gruppo di controllo è più alta rispetto a quanto riportato in letteratura (10). Tuttavia, differenti popolazioni presentano prevalenze di CM anche molto diverse tra loro e non abbiamo dati di riferimento per la popolazione della provincia di Rovigo.

La prevalenza di maschi nel gruppo COV+ è maggiore rispetto a quella osservata nei pazienti negativi, dato coerente con la letteratura disponibile che evidenzia come i maschi siano più colpiti da forme gravi di COVID-19 e quindi più spesso necessitino di ricovero (11).

Lo studio ha rilevato anche che l'infezione induce la comparsa di "piccole" CM, (circa 2 g/L, dati non mostrati). In un caso la CM non era più rilevabile al momento della negativizzazione del tampone. Questi riscontri, considerando lo stimolo antigenico dovuto alla infezione virale, possono orientare per una classificazione di queste CM tra le discrasie plasmacellulari transitorie (12) ma, come molti altri aspetti di questa pandemia, solo il tempo (e il monitoraggio dei pazienti) potrà avvalorare o meno questa ipotesi. I dati qui presentati dovrebbero incoraggiare il monitoraggio dei pazienti con CM al fine di valutarne l'effettiva transitorietà.

A differenza di segnalazioni in letteratura che riportano CM biclonali (11), il nostro studio riporta solo monoclonali. Degno di attenzione è il trattamento dei

pazienti COV+ con Tocilizumab, anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato della classe IgG1 diretto contro i recettori dell'IL-6, solubile (sIL-6R) e legato alla membrana (mIL-6R) bloccandone la trasduzione del segnale, che potrebbe essere rilevato alla tipizzazione immunologica con la possibilità di essere confuso con le CM endogene. Nei pazienti da noi considerati, il Tocilizumab è stato utilizzato dopo l'esecuzione dell'EF e pertanto possiamo escludere che le CM rilevate abbiano un nesso di causalità con il farmaco; tuttavia il trattamento con l'anticorpo monoclonale dovrebbe essere segnalato qualora si esegua una EF in questi pazienti.

Tra i limiti dello studio vanno segnalati:

- l'arco temporale ristretto nel quale sono stati arruolati i pazienti; lo studio è derivato da un'occasionale osservazione nella fase di recrudescenza dell'infezione da SARS-CoV-2 nella primavera del 2021 con riapertura del reparto di terapia semi-intensiva COVID;
- alcuni dati non congruenti con la letteratura esistente (ad esempio il riscontro prevalente di IgG lambda), potrebbero essere attribuibili alla scarsa numerosità dei soggetti arruolati (diretta conseguenza dell'arco temporale ristretto);
- non è stato possibile verificare con certezza che tutti i pazienti con CM non avessero una CM pregressa al momento del ricovero, per carenza di informazioni sui data base disponibili.

Le decisioni degli operatori sanitari, specialmente nelle prime fasi della pandemia sono state spesso difficili e basate su evidenze scarse e poco robuste. L'auspicio è che questo studio, supportato eventualmente da altri simili su casistica più numerosa, possa essere di ausilio per la diagnostica e il monitoraggio dei pazienti e le relative complicanze, nonché per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici che sottendono l'infezione da SARS-CoV-2, in particolare per quanto riguarda i meccanismi di stimolazione del sistema immunitario da parte delle citochine e del recettore linfocitario ACE2.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Calдини A, Graziani MS, Basile U, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
2. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
3. Vernocchi A, Dolci A, per il Gruppo di Studio SIBioC - "Proteine". Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:199-207.
4. Vashistha P, Gupta AK, Arya M, et al. Biclinal gammopathy in a case of severe COVID-19. *Clin Chim Acta* 2020;511:342-5.
5. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, et al. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2008;22:1651-7.
6. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395:1033-4.
7. Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, et al. Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. *Eur Respir J* 2020;56:2003006.
8. Vazzana N, Ognibene S, Dipaola F. «Acute» monoclonal gammopathy in severe COVID-19. *Hematol Transfus Cell Ther* 2020;42:218-20.
9. Farina A, Labriola R, Ialongo C, et al. Transient plasma cell dyscrasia in COVID-19 patients linked to IL-6 triggering. *Microbes Infect* 2021;23:104808.
10. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.
11. Corradini E, Ventura P, Ageno W, et al. Clinical factors associated with death in 3044 COVID-19 patients managed in internal medicine wards in Italy: results from the SIMI-COVID-19 study of the Italian Society of Internal Medicine (SIMI). *Intern Emerg Med*. 2021;16:1005-15.
12. Camerotto A, Giacco G, De Toffoli A. Monitoraggio delle componenti monoclonali transitorie con il sistema informatico del laboratorio. *Med Lab* 1996;4:49-52.