Test di generazione della trombina nella coagulopatia da COVID-19

Maria Papandrea[1], Barbara Montaruli[1], Domenico Cosseddu[1], Domenico Vallino[2], Paolo Valesella[1], Antonio Insana[1], Piera Sivera[3]
[1] Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaleira Ordine Mauriziano, Torino
[2] Medicina Chirurgia d'urgenza, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino
[3] Ematologia, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

ABSTRACT

Thrombin generation test in COVID-19 related coagulopathy.
Introduction: critically ill COVID-19 patients are known to have a coagulopathy characterized by increased levels of D-dimer (DD) associated to a thrombotic risk and a significant increase in mortality. However, it is not known whether the associated COVID-19 coagulopathy is due to a prothrombotic state or is caused by endothelial dysfunction and inflammation. Aim of our study, was to better characterize the hypercoagulability state of COVID-19 patients using Thrombin Generation analyser (ST Genesia®, Diagnostica Stago, Asnières, France).
Methods: a total of 46 non-critically ill hospitalized COVID-19 patients were compared to 19 critically ill COVID-19 patients utilizing calibrated automated thrombography and other biochemical, hematological and coagulation parameters.
Results: critically ill patients had a significant increase in C reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), prothrombin time (PT), DD and a significant decrease in lymphocytes count. No significant differences in Thrombin Generation Test (TGT) parameters were observed between the two groups of patients with the only exception of the "Lag Time" parameter.
Discussion: the obtained results confirmed increased levels of DD and PT in critically ill COVID-19 patients. Of note, disease severity did not cause an increase in Thrombin Generation when compared to non-critically COVID-19 patients. The significantly prolonged Lag Time in critically ill COVID-19 patients without decreased endogenous thrombin potential suggests an hypocoagulability state in these patients. The relevance of this finding is uncertain and may appear counterintuitive since these patients are expected to have a hypercoagulability status, and requires further research.

Keywords: *Test di generazione della trombina, COVID-19, coagulopatia*

INTRODUZIONE

La malattia severa da Coronavirus 2019 (COVID-19), causata dal virus SARS-CoV2, è una patologia associata a polmonite interstiziale, che può richiedere ospedalizzazione e supporto d'ossigeno. In circa il 5% dei pazienti la malattia determina lo sviluppo di una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), sepsi e shock settico e/o insufficienza multipla d'organo (MOF), tale da richiedere cure intensive (1). L'acidosi metabolica e la presenza di coagulopatia, inclusa la coagulazione intravascolare disseminata (CID), si associano a questa grave forma di infezione (2). Gli anziani, con disturbi immunitari e comorbilità, rappresentano i soggetti più a rischio di sviluppare ARDS e altre complicanze potenzialmente fatali. Anche i giovani e i soggetti sani non ne sono completamente esenti (3). 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) sino ad arrivare alla CID con un significativo aumento della mortalità (4). Nonostante la tromboprofilassi con eparina a basso peso molecolare (EBPM), il rischio di eventi trombotici è particolarmente elevato nei pazienti COVID-19 ricoverati in terapia intensiva, con stime che vanno dal 25% al 31%. Tra i parametri di laboratorio di coagulazione più rilevanti per seguire l'evoluzione della

Corrispondenza a: Barbara Montaruli, Laboratorio Analisi, AO Ordine Mauriziano, Largo Turati 62, 10128 Torino.
E-mail: bmontaruli@mauriziano.it

Ricevuto: 18.05.2022 Revisionato: 01.06.2022 Accettato: 22.06.2022

Pubblicato on-line: 07.07.2022 DOI: 10.19186/BC_2022.044

coagulopatia COVID-19 risultano particolarmente utili: il conteggio piastrinico, il tempo di protrombina (PT), il fibrinogeno ed il D-dimero (DD). Dati della letteratura riportano, per i parametri della coagulazione sopracitati, una leggera riduzione del conteggio piastrinico, un lieve prolungamento del PT, modeste alterazioni del fibrinogeno e un forte aumento del DD nei pazienti COVID-19 positivi a prognosi infausta (5). Il DD è il parametro che correla meglio con l'evoluzione clinica del paziente, in particolare livelli di DD >3,0 mg/dL correlano direttamente con una cattiva prognosi (6,7). Dati della letteratura su studi autoptici, hanno mostrato nei pazienti COVID-19 positivi la presenza a livello polmonare di fenomeni microangiopatici, emorragici e trombotici. Questi dati sono supportati dall'osservazione condotta in altri studi di una lieve riduzione della metalloproteasi ADAMTS13 (A Disitengrin and Metalloproteinase Thrombospondin 13), un significativo aumento di fattore VIII e del fattore von Willebrand nei pazienti COVID-19 positivi con malattia severa (8). Al momento, quindi, non è chiaro se la causa degli eventi trombotici sia da riferire ad uno stato di ipercoagulabilità generalizzato o ad una disfunzione endoteliale su base infiammatoria con conseguente trombosi microvascolare, evidente soprattutto a livello polmonare.

E' pertanto di cruciale importanza continuare ad indagare il processo di emostasi nei pazienti con malattia da COVID-19 severa per comprendere meglio la genesi di questo stato protrombotico.

Il test di Generazione della Trombina (TGT) è un esame globale in grado di fornire una valutazione del potenziale di coagulazione in un campione di plasma (9). Evidenze cliniche dimostrano che il potenziale di generazione di trombina del sangue è il principale responsabile della coagulazione e può essere misurato attraverso il TGT. Questa indagine consente un approccio globale allo studio dei disordini dell'emostasi; consente inoltre di identificare e quantificare fenomeni di ipercoagulabilità o di ipocoagulabilità anche in soggetti con coagulopatia non nota (un eccesso o difetto di uno o più fattori procoagulanti e/o degli inibitori della coagulazione) (10,11).

Scopo di questo lavoro è di valutare se lo studio della generazione della trombina possa essere di supporto alla determinazione di alcuni parametri dell'emostasi: PT, fibrinogeno e soprattutto DD caratterizzare uno stato di ipercoagulabilità nei pazienti COVID-19 con malattia severa.

METODI

Pazienti

Tra il 27 febbraio e il 27 giugno 2021, sono stati arruolati 65 pazienti consecutivi (23 femmine e 42 maschi) con infezione polmonare da SARS-CoV-2 confermata mediante Real Time PCR su tampone nasofaringeo, ricoverati presso l'ospedale Mauriziano Umberto I di Torino.

I pazienti sono stati suddivisi in critici [N=19, età mediana (intervallo): 75 (34-100)] con malattia grave, ricoverati in terapia intensiva, in rianimazione o deceduti nei 10 giorni di degenza ospedaliera successivi, e non critici [N=46, età mediana (intervallo): 65 (22-97)] con malattia severa/moderata, ricoverati in reparto COVID di medicina interna. Le caratteristiche cliniche dei pazienti critici e non critici sono le seguenti:

- pazienti non critici con malattia severa (saturazione <94%, necessità di ossigeno ed evidenza clinica o radiologica di polmonite) o moderata (saturazione ≥94%, ed evidenza clinica o radiologica di polmonite;
- pazienti critici con malattia grave: insufficienza respiratoria con necessità di supporto ventilatorio, shock settico e/o insufficienza a livello di uno o più organi.

A tutti i pazienti, indipendentemente dal loro grado di criticità è stata somministrata Enoxaparina sodica 4 000 UI/6 000 UI in relazione al peso fino al momento del secondo prelievo (10 giorni dopo il ricovero). Nei casi di embolia polmonare, l'Enoxaparina sodica è stata maggiorata in dose terapeutica (8 000 UI/die x2). A nessun paziente è stata aggiunta terapia antiaggregante.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con coagulopatia nota e pazienti in terapia con Antagonisti della Vitamina K (AVK) o Anticoagulanti Orali Diretti (DOAC).

Procedura

Nei pazienti studiati sono stati effettuati due prelievi venosi in Vacutainer contenenti una soluzione di citrato trisodico 0,109 M nella proporzione sangue/anticoagulante 9:1; il primo entro 3 giorni dall'ingresso in Pronto Soccorso e il secondo 10 giorni dopo il ricovero. Il plasma povero di piastrine (PPP) è stato ottenuto mediante centrifugazione immediata dei campioni ad una velocità di 3 000 g per 15 minuti a temperatura ambiente. Il PPP così ottenuto è stato quindi aliquotato e conservato in congelatore a -70 °C fino al momento dell'analisi. Lo scongelamento dei campioni è stato effettuato in termostato a 37 °C per cinque minuti e le microprovette sono state invertite dolcemente prima dell'analisi.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'ospedale e tutti i pazienti reclutati hanno fornito il consenso informato alla loro inclusione nello studio e al trattamento dei dati personali ai fini dello svolgimento dello stesso in accordo alla dichiarazione di Helsinki del 1964, come emendata nel 2013.

Esami di laboratorio

In tutti i pazienti arruolati abbiamo effettuato, utilizzando reagenti e protocolli del produttore, su coagulometro ACLTOP750 (Werfen, Bedford MA, USA) i seguenti esami di laboratorio di coagulazione:

- tempo di Protrombina (PT);
- tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (APTT);
- D-dimero (DD);
- fibrinogeno.

Su tutti i pazienti abbiamo inoltre eseguito, utilizzando reagenti e protocolli del produttore, i seguenti esami

biochimici ed ematologici:
- emocromo con formula (Alinity hq, Abbott, Abbott Park IL, USA);
- latticodeidrogenasi (LDH), ferritina e proteina C reattiva (PCR) (C 16000, Abbott);
- interleuchina-6 (IL-6) (Immulite, Siemens).

Test di Generazione della Trombina

In tutti i pazienti studiati, il TGT è stato effettuato con l'analizzatore ST Genesia® strumento completamente automatizzato e standardizzato, utilizzando il kit commerciale STG® ThromboScreen (Stago, Asnières-sur-Seine, Francia), seguendo i protocolli ed le indicazioni del produttore.

In breve, la generazione di trombina viene avviata da vescicole fosfolipidiche artificiali (4 μM) per ricreare la superficie piastrinica attivata e da fattore tessutale (TF) con o senza trombomodulina (TM) solubile in presenza di calcio e substrato fluorogenico. La formazione di trombina causa il clivaggio del substrato fluorogenico e la produzione di fluorescenza che viene misurata dallo strumento. Il risultato del TGT è la curva di generazione della trombina, conosciuta come trombogramma, che mostra la concentrazione di trombina prodotta nel tempo e riflette le tre fasi della coagulazione. La curva è infatti caratterizzata da una fase iniziale detta di ritardo, che indica il tempo necessario affinché la reazione di produzione di trombina abbia inizio, seguita da un incremento del segnale, che rappresenta la fase di effettiva formazione della trombina, ed un successivo decremento, che rappresenta la fase di inibizione della trombina. I parametri leggibili del trombogramma e valutati durante lo studio nei due gruppi di pazienti studiati sono:
- il tempo di ritardo (Lag-Time), ovvero il tempo di innesco della cascata coagulativa che è pari al tempo necessario alla formazione di 10 nmol di trombina;
- la massima concentrazione di trombina (Peak Height);
- il tempo di raggiungimento della massima produzione di trombina (Time to Peak);
- la velocità per raggiungere il picco (Velocity Index);
- il tempo in cui termina la generazione di trombina (Start Tail);
- l'area sottesa dalla curva (Endogenous Thrombin Potential, ETP), che rappresenta la quantità di trombina generata.

Analisi statistica

Per tutti i calcoli statistici, è stato utilizzato il software Analyse-it (Microsoft Office Excel). I risultati sono riportati come numero percentuale delle variabili categoriche e come media o mediana delle variabili continue. Il confronto dei risultati dei vari esami eseguiti nei due gruppi di pazienti studiati è stato effettuato utilizzando il test di Mann-Whitney U. Un valore di $p<0,05$ identifica una differenza statisticamente significativa.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche anagrafiche e cliniche dei pazienti arruolati nello studio. Sono stati osservati un aumento della mediana del peso, dell'età e della frequenza cardiaca nei pazienti

Tabella 1
Caratteristiche dei pazienti COVID-19 arruolati nello studio

Caratteristiche anagrafiche e cliniche	Pazienti COVID-19 non critici	Pazienti COVID-19 critici	p
Numero	46	19	
Maschi, n (%)	31 (67)	11 (58)	ns
Femmine, n (%)	15 (33)	8 (42)	ns
Età, anni mediana (intervallo)	65 (22-97)	75 (34-100)	ns
Peso, kg mediana (intervallo)	77 (52-120)	83 (79-100)	0,05
Parametri vitali all'ingresso			
- Febbre, n (%)	24 (52)	9 (47)	ns
- Frequenza cardiaca, bpm, mediana (intervallo)	85 (63-135)	100 (70-160)	ns
- Saturazione, %, mediana (intervallo)	92 (79-100)	88 (41-94)	ns
Comorbidità, n (%)			
- Diabete	8 (17)	4 (21)	ns
- Ipertensione	23 (50)	11 (58)	ns
- Neoplasia	3 (7)	2 (11)	ns
- Evento trombotico	12 (26)	8 (42)	ns
Supporto ventilatorio, n (%)			
- Ossigeno cannule nasali	41 (89)	16 (84)	n.s.
- CPAP	29 (63)	15 (79)	n.s.
- IOT	0	3 (16)	<0,05

n.s, non significativo; CPAP, pressione positiva continua delle vie aeree; IOT, intubazione orotracheale

critici rispetto a quelli non critici, ma nessuna di queste differenze era statisticamente significativa ad eccezione del peso (p=0,05). La maggior parte dei pazienti con malattia critica presentava qualche comorbidità pregressa (diabete, neoplasia, ipertensione o evento trombotico) in più rispetto ai pazienti non critici. Anche in questo caso le differenze fra i due gruppi di pazienti non erano statisticamente significative. L'intubazione orotracheale (IOT) è stata effettuata solo sui pazienti critici, mentre l'ossigeno con cannule nasali e la pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP) è stata effettuata sia sui pazienti critici che non critici. Tra tutti i pazienti studiati, si sono osservati solo due eventi trombotici in corso di malattia e, in particolare, due embolie polmonari, di cui una riscontrata in un paziente ricoverato in terapia intensiva e l'altra riscontrata in un paziente non critico.

Nelle Tabelle 2 e 3 sono riportati i risultati dei i parametri di laboratorio ottenuti sui due prelievi effettuati:

Tabella 2
Parametri di laboratorio nei prelievi effettuati al ricovero

Parametri di laboratorio	Pazienti COVID-19 non critici	Pazienti COVID-19 critici	p
Parametri flogistici, mediana (intervallo)			
PCR, mg/L	76,2 (6,8-2 535)	137,9 (52,4-447)	0,0018
IL-6, pg/mL	22,6 (2,1-6 208)	57,7 (6,7-2 604)	0,0287
LDH, mU/mL	337 (53-773)	411 (286-635)	0,15
Ferritina, ng/mL	713 (34-6 853)	936 (98-9 133)	0,37
Parametri della coagulazione, mediana (intervallo)			
PT, ratio	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,4)	0,48
APTT, ratio	0,9 (0,7-1 261,2)	1,0 (0,7-1,2)	0,25
Fibrinogeno, mg/dL	482 (275-950)	533 (312-834)	0,37
D-dimero, ug/L FEU	764 (264-79 774)	1096 (446-52 272)	0,19
Parametri dell'emocromo, mediana (intervallo)			
Leucociti, 10^9 /L	8,1 (2,1-17,4)	9,7 (4,1-21,3)	0,08
Linfociti, 10^9 /L	1,0 (0,1-13,2)	0,7 (0,2-4,4)	0,09
Emoglobina, g/dL	13,0 (10,3-490)	13,3 (9,2-16,8)	0,42
Piastrine, 10^9/L	218 (14-460)	225 (81-558)	0,91

PCR, proteina C reattiva; IL-6, interleuchina 6; LDH, lattico deidrogenasi; PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato

Tabella 3
Parametri di laboratorio nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero

Parametri di laboratorio	Pazienti COVID-19 non critici	Pazienti COVID-19 critici	p
Parametri flogistici, mediana (intervallo)			
PCR, mg/L	4,3 (0,6-1 670)	18,8 (1,5-114,5)	0,0275
IL-6, pg/ml	9,3 (2,6-4 571)	481,1 (65,2-5 637)	0,0066
LDH, mU/mL	241 (170-562)	401 (262-489)	0,26
ferritina, ng/mL	518 (3-3 071)	747 (58-1 136)	0,92
Parametri della coagulazione, mediana (intervallo)			
PT, ratio	1,0 (0,8-1,1)	1.1 (1.0-1.3)	0.0488
APTT, ratio	0,9 (0,7-470,2)	0,9 (0,8-1,0)	0,36
fibrinogeno, mg/dL	288 (38-834)	355 (189-595)	0,33
D-dimero, ug/L FEU	881 (269-25 079)	4075 (733-7 490)	0,0036
Parametri emocromo, mediana (intervallo)			
Leucociti, 10^9/ L	9,2 (0,3-29,5)	14 (6,3-42,4)	0,05
Linfociti, 10^9/L	1,8 (0,3-4,1)	0,8 (0,4-3,3)	0,0316
Emoglobina, g/dL	12,7 (12,1-13,2)	11,9 (9,3-13,5)	0,06
Piastrine, 10^9 /L	336 (122-690)	250 (140-437)	0,14

PCR, proteina C reattiva; IL-6, interleuchina 6; LDH, lattico deidrogenasi; PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato

parametri flogistici e di chimica clinica (PCR, IL-6, ferritina, LDH) della coagulazione (PT, APTT, DD e fibrinogeno) e dell'emocromo (leucociti, linfociti, piastrine, emoglobina,).

Nei prelievi effettuati nei primi 3 giorni di accesso al Pronto Soccorso (Tabella 2) le uniche differenze statisticamente significative tra pazienti critici e non critici sono a carico di PCR e IL-6 (p=0,0018 e p=0,0287 rispettivamente). Aumenti non significativi sono stati osservati relativamente al DD e al fibrinogeno nei pazienti critici rispetto ai non critici

Nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero (Tabella 3), viene confermato l'aumento statisticamente significativo della PCR e dell'IL-6 nei pazienti critici rispetto ai non critici (p=0,0275 e p=0,0066 rispettivamente). Per contro, nei parametri di coagulazione, a differenza del prelievo al ricovero, è stato osservato un aumento statisticamente significativo del DD (p=0,0036) e del PT (p=0,0488) nei pazienti critici rispetto ai non critici. Tra i parametri dell'emocromo si è riscontrata una diminuzione non significativa delle piastrine e una diminuzione statisticamente significativa del numero dei linfociti (p= 0,0316).

Nella Tabelle 4 e 5 sono riportati i valori della mediana, minimo e massimo dei 6 parametri di TGT in presenza ed assenza di TM ottenuti nei prelievi effettuati al ricovero (Tabella 4) e 10 giorni dopo il ricovero (Tabella 5). Nelle Figure 1 e 2 sono riportati gli istogrammi di frequenza (Box Plot) dei sei parametri del trombogramma del TGT con e senza TM osservati nei due gruppi di pazienti studiati nei prelievi effettuati al ricovero (Figura 1) e nei prelievi effettuati dieci giorni dopo il ricovero (Figura 2).

Per i 6 parametri del TGT studiati in assenza di TM nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata, nei prelievi effettuati al ricovero tra i pazienti critici ed i non critici; aumenti non significativi sono stati invece osservati nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero per i parametri Time to Peak e Start Tail ed un aumento statisticamente significativo del parametro Lag Time (p=0,038) nei pazienti critici rispetto a quelli non critici. Nessuna altra differenza statisticamente significative è stata osservata (parametri Peak Height, Velocity Index e ETP) nelle due coorti prese in esame.

Per i 6 parametri del TGT studiati in presenza di TM, sia nei prelievi effettuati al ricovero che in quelli effettuati 10 giorni dopo il ricovero, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i pazienti critici e non critici.

Da segnalare che, nonostante la totalità dei pazienti fosse in terapia con EBPM al momento dell'esecuzione del TGT, i pazienti COVID-19 critici e non critici hanno evidenziato valori di ETP e di Peak Height simili a quelli dei soggetti sani di riferimento (vedi Tabelle 4 e 5) (12).

DISCUSSIONE

È ormai universalmente riconosciuto che circa il 5% dei pazienti affetti da COVID-19, soprattutto quelli con manifestazioni più gravi, presentano una coagulopatia che, come in altri stati settici, può progredire da semplice alterazione asintomatica dei parametri della coagulazione

Tabella 4
Parametri del test di generazione della trombina nei prelievi effettuati al ricovero.
I risultati normalizzati dei 6 parametri sono presentati come mediana ed intervallo (minimo e massimo).

Parametri del Test di Generazione della Trombina	Pazienti COVID-19 non critici	Pazienti COVID-19 critici	p	Intervallo di riferimento del produttore
Lag Time -TM, min, mediana (intervallo)	1,5 (1,0-2,8)	1,4 (1,11- 2,71)	0,78	-
Lag Time +TM, min, mediana (intervallo)	3,3 (2,2-11,7)	3,1 (2,0-6,3)	0,95	-
Peak height -TM, nM, mediana (intervallo)	99,2 (30,0-150,5)	116,9 (13,4-152,8)	0,70	90 (72,6-107,7)
Peak height +TM, nM, mediana (intervallo)	143,8 (15,5-238,3)	149,6 (32,6-463,3)	0,40	152 (108-196)
Time to peak -TM, min, mediana (intervallo)	1,3 (0,9-2,4)	1,2 (1,0-2,9)	0,41	-
Time to peak +TM, min, mediana (intervallo)	5,6 (3,9-15,0)	5,5 (3,7-8,5)	0,45	-
ETP -TM, nM.min, mediana (intervallo)	90,4 (53,5-170,6)	110,1 (33,1-159,7)	0,67	83 (73-103)
ETP +TM, nM.min, mediana (intervallo)	57,6 (23,7-86,1)	48,5 (5,4-86,8)	0,38	50 (38-62)
Velocity index -TM, nM/min, mediana (intervallo)	89,1 (14,9-198,1)	106,1 (3,8-174,2)	0,62	-
Velocity index +TM, nM/min, mediana (intervallo)	85,6 (5,6-180,3)	78,9 (13,4-393,2)	0,29	-
Start tail -TM, min, mediana (intervallo)	1,2 (0,7-2,0)	1,1 (0,9-2,3)	0,17	-
Start tail +TM, min, mediana (intervallo)	14,5 (11,8-26,8)	5,5 (3,7-8,5)	0,06	-

Lag-Time, tempo di ritardo; TM, trombomodulina; Peak Height, altezza del picco (massima concentrazione di trombina); Time to Peak, tempo di raggiungimento della massima produzione della trombina; ETP, Endogenous Thrombin Potential (quantità di trombina generata, area sottesa dalla curva); Velocity Index, velocità di raggiungimento del picco; Start Tail, tempo in cui termina la generazione di Trombina.

Tabella 5
Parametri del test di generazione della trombina nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero. I risultati sono presentati come mediana e intervallo (minimo e massimo).

Parametri del Test di Generazione della Trombina	Pazienti COVID-19 non critici	Pazienti COVID-19 critici	p	Intervallo di riferimento del produttore
Lag Time -TM, min, mediana (intervallo)	1,3 (1,1-1,7)	2,7 (1,2-4,1)	<0,05	-
Lag Time +TM, min, mediana (intervallo)	2,6 (2,3-3,7)	3,6 (2,3-4,4)	0,22	-
Peak height -TM, nM, mediana (intervallo)	121,2 (46,6-178,4)	37,8 (26,2-169,1)	0,76	90 (72,6-107,7)
Peak height +TM, nM, mediana (intervallo)	197,4 (9,4-273,9)	181,6 (44,7-225,6)	0,64	152 (108-196)
Time to peak -TM, min, mediana (intervallo)	1,2 (0,9-1,8)	2,0 (1,0-2,8)	0,17	-
Time to peak +TM, min, mediana (intervallo)	4,7 (4,0-6,2)	5,6 (4,0-6,2)	0,47	-
ETP -TM, nM.min, mediana (intervallo)	94,4 (71,5-184,9)	46,9 (37,7-118,4)	0,42	83 (73-103)
ETP +TM, nM.min, mediana (intervallo)	41,3 (19,1-94,7)	44,9 (30,0-77,6)	0,61	50 (38-62)
Velocity index -TM, nM/min, mediana (intervallo)	132,5 (26,1-157,5)	29,9 (15,7-176,3)	0,78	-
Velocity index +TM, nM/min, mediana (intervallo)	138,5 (4,5-174,9)	138,8 (24,0-179,5)	0,49	-
Start tail -TM, min, mediana (intervallo)	0,9 (0,7-1,4)	1,3 (0,7-1,6)	0,40	-
Start tail +TM, min, mediana (intervallo)	14,8 (12,1-16,7)	14,6 (13,5-14,8)	0.,49	-

Lag-Time, tempo di ritardo; M, trombomodulina; Peak Height, altezza del picco (massima concentrazione di trombina); Time to Peak, tempo di raggiungimento della massima produzione della trombina; ETP, Endogenous Thrombin Potential (quantità di trombina generata, area sottesa dalla curva; Velocity Index, velocità per raggiungere il picco, Start Tail, tempo in cui termina la generazione di Trombina.

ad uno stato di SIC sino ad arrivare alla CID con un significativo aumento della mortalità (13). 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 (14). Questa fase è caratterizzata prevalentemente da un quadro di polmonite interstiziale, molto spesso bilaterale, associata ad una sintomatologia respiratoria, che nella fase precoce è stabile e senza ipossiemia, ma che può evolvere verso una progressiva instabilità clinica con lo sviluppo di insufficienza respiratoria anche di grave entità, fino ad un quadro conclamato di ARDS (15). Parallelamente all'aggravamento dello stato infiammatorio può comparire uno stato di ipercoagulabilità sistemica e di trombofilia, caratterizzato dalla tendenza alla trombosi (venosa, arteriosa e microvascolare) (16,17). A livello laboratoristico si riscontrano frequentemente elevati livelli di DD e, più raramente, modeste alterazioni del fibrinogeno, un lieve prolungamento del PT con valori vicino alla norma dell'APTT. Nei casi più gravi è possibile l'evoluzione verso un quadro di CID (18,19). Svariate esperienze cliniche hanno evidenziato una correlazione significativa, oltre che tra i livelli di DD e le manifestazioni tromboemboliche venose, anche tra i livelli di DD e la prognosi infausta (20). In alcuni pazienti, la malattia può poi evolvere verso un quadro clinico caratterizzato da una tempesta citochinica e quindi verso uno stato iperinfiammatorio che determina conseguenze locali e sistemiche (21,22). Ad esso si associano, dal punto di vista degli esami di laboratorio una diminuzione progressiva del numero dei linfociti, ed un aumento dei marcatori infiammatori quali PCR, ferritina ed IL-6 (23).

L'alta incidenza di trombosi nei pazienti affetti da COVID-19 suggerisce fortemente una alterazione dell'emostasi in questi pazienti che dal punto di vista degli esami di laboratorio è evidenziata quasi esclusivamente dall'aumento del DD; inoltre, al momento non è chiaro se la causa degli eventi trombotici sia da riferire ad uno stato di ipercoagulabilità generalizzato o ad una disfunzione endoteliale su base infiammatoria con conseguente trombosi microvascolare, evidente soprattutto a livello polmonare.

Scopo del nostro lavoro, è stato quello di valutare con il TGT l'emostasi globale nei pazienti affetti da COVID-19 allo scopo di individuare altri marcatori prognostici di laboratorio che oltre al DD potessero essere di aiuto nel discriminare meglio fra pazienti COVID-19 critici e non critici e quindi fungere da guida nelle decisioni cliniche.

A tale scopo abbiamo effettuato il TGT, la determinazione dei marcatori biochimici di infiammazione (IL-6 e PCR), dei marcatoriactori di emostasi (PT, APTT, Fibrinogeno, DD) unitamente a parametri ematologici al ricovero e 10 giorni dopo il ricovero in 65 pazienti consecutivi afferenti al nostro ospedale per malattia da COVID-19. Di questi 19 erano critici con malattia grave (ricoverati in terapia intensiva ed evidenza di polmonite, insufficienza respiratoria con necessità di supporto ventilatorio, shock settico e/o insufficienza a livello di uno o più

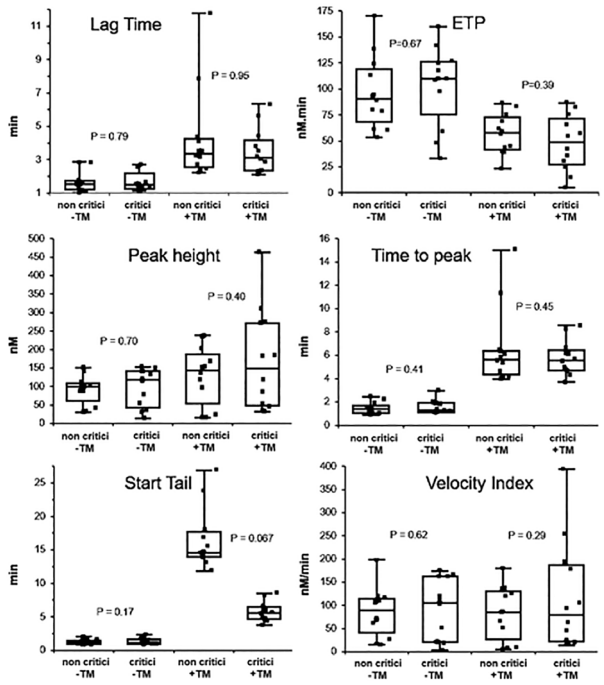

Figura 1

Box plot (mediana, quartili, minimo e massimo) dei sei parametri del trombogramma eseguiti nei prelievi effettuati al ricovero ai pazienti con COVID19 critico e COVID19 non critico in presenza ed assenza di trombomodulina (TM).

ETP, Endogenous Thrombin Potential (quantità di trombina generata, area sottesa dalla curva); Lag-Time, tempo di ritardo; Peak Heigh, altezza del picco (massima concentrazione di trombina); Start Tail, tempo in cui termina la generazione di Trombina; Time to Peak, tempo di raggiungimento della massima produzione della trombina; Velocity Index, velocità di raggiungimento del picco.

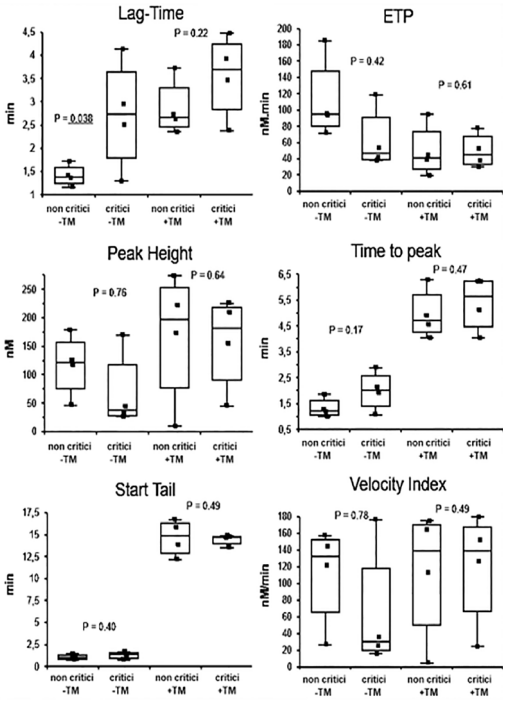

Figura 2

Box plot (mediana, quartili, minimo e massimo) dei sei parametri del trombogramma studiati nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero ai pazienti con COVID19 critico e COVID19 non critico in presenza ed assenza di trombomodulina (TM).

ETP, Endogenous Thrombin Potential (quantità di trombina generata, area sottesa dalla curva); Lag-Time, tempo di ritardo; Peak Heigh, altezza del picco (massima concentrazione di trombina); Start Tail, tempo in cui termina la generazione di Trombina; Time to Peak, tempo di raggiungimento della massima produzione della trombina; Velocity Index, velocità di raggiungimento del picco.

organi) o deceduti e 46 non critici con malattia severa/moderata (ricoverati in reparto COVID di Medicina Interna con necessità o meno di ossigeno ed evidenza di polmonite). Gli esami routinari di coagulazione, di ematologia e dei marcatori biochimici di infiammazione da noi effettuati nei due gruppi di pazienti studiati hanno confermato quanto riportato in letteratura. E' stato infatti osservato un aumento statisticamente significativo della PCR e dell'IL-6 nei pazienti critici affetti da COVID-19, sia nei prelievi effettuati al ricovero che nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero. Il DD ed il PT sono risultati significativamente aumentati nei pazienti critici solo nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero. Per quanto riguarda i parametri dell'emocromo, abbiamo osservato una diminuzione statisticamente significativa del conteggio linfocitario solo nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero in entrambi i gruppi di pazienti presi in esame. A differenza di quanto riportato in letteratura, nei pazienti critici sia nei prelievi effettuati al ricovero che nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero, abbiamo osservato un aumento, che tuttavia non è risultato significativo, del fibrinogeno ed una diminuzione anch'essa non significativa del conteggio delle piastrine (24,25).

Dei 6 parametri del trombogramma del TGT in assenza di TM da noi studiati, così come riportato anche da altri in letteratura, abbiamo osservato un aumento non statisticamente significativo di Start Tail e Time to Peak e Lag Time nei pazienti COVID-19 critici rispetto ai pazienti COVID-19 non critici nei prelievi effettuati al ricovero, ed un aumento non statisticamente significativo di Start Tail e Time to Peak e statisticamente significativo del Lag Time nei pazienti con malattia da COVID-19 critica nei prelievi effettuati 10 giorni dopo il ricovero (26).

Nei pazienti critici l'aumento significativo del Lag Time nonchè quello del Time to Peak (sebbene non significativo) sono indicativi di una ipocoagulabilità (27). La rilevanza di questi riscontri è in contrasto con le complicazioni trombotiche che si osservano in questi pazienti (28). Le ragioni del maggiore prolungamento del Lag Time e la sovrapponibilità di ETP osservata nei pazienti critici con malattia da COVID19 potrebbe essere dovuta così come suggerito da White et al. (27) ad un aumento dei livelli del Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) il quale va ad inibire la cascata coagulativa che nel TGT viene innescata dal Fattore Tissutale. Una ipotesi alternativa si richiama ad una lieve diminuzione del Fattore VII non rilevabile con l'esame PT probabilmente per l'instaurarsi di una insufficienza epatica in questi pazienti; questi rilievi necessitano quindi di ulteriori approfondimenti (27).

Dei 6 parametri del trombogramma del TGT in presenza di TM non abbiamo osservato differenze

statisticamente significative tra le due coorti di pazienti. Questi risultati suggeriscono quindi che il sistema della proteina C attivata non abbia molta rilevanza nella coagulopatia che si sviluppa nei pazienti critici con malattia da COVID-19 (26).

In conclusione, i nostri risultati confermano quanto riportato in letteratura ovvero che gli eventi trombotici che si riscontrano nei pazienti con malattia da COVID-19 critica non riflettono una ipercoagulabilità globale in questi pazienti, ma sono probabilmente riferibili più ad una disfunzione endoteliale su base infiammatoria con trombosi microvascolari evidenti soprattutto a livello polmonare (29).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare le dr.sse TSLB Simona Bolognese, Clementina Fanelli, Laura Frapiccini e Nadia Renzi per il loro fondamentale supporto tecnico. Inoltre si ringraziano sentitamente i produttori dei reagenti utilizzati nello studio per la fornitura gratuita degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Fauci AS, Lane HC, Redfield RR. Covid-19 - Navigating the uncharted. N Engl J Med 2020;382:1268-9.
2. Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. Int J Hematol 2021;113:45-57.
3. Gao Y, Ding M, Dong X, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: a review. Allergy 2021;76:428-55.
4. Hardy M, Michaux I, Lessire S, et al. Prothrombotic disturbances of hemostasis of patients with severe COVID-19: a prospective longitudinal observational study. Thromb Res 2021;197:20-3.
5. Colling ME, Kanthi Y. COVID–19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. Vasc Med 2020;25:471-8.
6. Rostami M, Mansouritorghabeh H. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. Expert Rev Hematol 2020;13:1265-75.
7. Li Y, Zhao K, Wei H, et al. Dynamic relationship between D-dimer and COVID-19 severity. Br J Haematol 2020;190:e24-7 (Ultimo accesso: maggio 2022).
8. Favaloro EJ, Henry BM, Lippi G. Increased VWF and decreased ADAMTS-13 in COVID-19: creating a milieu for (micro)thrombosis. Semin Thromb Hemost 2021;47:400-18.
9. Berry LR, Chan AKC. Thrombin generation. Methods Mol Biol 2013;992:139-54.
10. Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. Clin Chem 2016;62:699-707.
11. Kern A, Várnai K, Vásárhelyi B. Thrombin generation assays and their clinical application. Orvosi Hetilap 2014;155:851-7.
12. Calzavarini S, Brodard J, Quarroz C, et al. Thrombin generation measurement using the ST Genesia Thrombin Generation System in a cohort of healthy adults: normal values and variability. Res Pract Thromb Haemost 2019;3:758-68.
13. Pluta J, Pihowicz A, Horban A, et al. DIC, SIC or CAC - the haemostatic profile in COVID-19 patients hospitalised in the intensive care unit: a single-centre retrospective analysis. Anaesthesiol Intensive Ther 2021;53:108-14.
14. Koçak Tufan Z, Kayaaslan B, Mer M. COVID-19 and Sepsis. Turk J Med Sci 2021;51:3301-11.
15. Zhang X, Li S, Niu S. ACE2 and COVID-19 and the resulting ARDS. Postgrad Med J 2020;96:403-7.
16. Gómez-Mesa JE, Galindo-Coral S, Montes MC, et al. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19. Curr Probl Cardiol 2021;46:100742.
17. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. J Thromb Thrombolysis 2020;50:54-67.
18. 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.
19. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. Am J Hematol 2020;95:834-47.
20. Düz ME, Balcı A, Menekşe E. D-dimer levels and COVID-19 severity: systematic review and meta-analysis. Tuberk Toraks 2020;68:353-60.
21. Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, et al. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. Open Biol 2020;10:200160.
22. Luo XH, Zhu Y, Mao J, et al. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. Scand J Immunol 2021;93:e12989.
23. Ji P, Zhu J, Zhong Z, et al. Association of elevated inflammatory markers and severe COVID-19: a meta-analysis. Medicine (Baltimore) 2020;99:e23315.
24. Wool GD, Miller JL. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. Pathobiology 2021;88:15-27.
25. Eljilany I, Elzouki AN. D-Dimer, Fibrinogen, and IL-6 in COVID-19 patients with suspected venous thromboembolism: a narrative review. Vasc Health Risk Manag 2020;16:455-62.
26. Benati M, Salvagno GL, Nitto SD, et al. Thrombin generation in patients with Coronavirus disease 2019. Semin Thromb Hemost 2021;47:447-50.
27. White D, MacDonald S, Edwards T, et al. Evaluation of COVID-19 coagulopathy; laboratory characterization using thrombin generation and nonconventional haemostasis assays. Int J Lab Hem 2021;43:123-30.
28. Kichloo A, Dettloff K, Aljadah M, et al. COVID-19 and Hypercoagulability: A review. Clin Appl Thromb Hemost 2020;26:1076029620962853.
29. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. Nat Re Ephrol 2021;17:46-64.