

## Valutazione di un pannello di biomarcatori come surrogato del recettore solubile dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico (suPAR) per l'indicazione al trattamento con anakinra in pazienti COVID-19

Massimiliano Ammirabile<sup>1</sup>, Giovanni Del Mese<sup>2</sup>, Alessio Maregnani<sup>1</sup>, Chiara Ferraris Fusarini<sup>1</sup>, Paola De Corato<sup>1</sup>, Federico De Liso<sup>3</sup>, Tito Paolo Simone Taverriti<sup>1</sup>, Iris Maria Silvani<sup>1</sup>, Francesco Spanu<sup>1</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>, Matteo Vidali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SC Patologia Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>2</sup> UOC Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale (SIMT), ASST Fatebenefratelli Sacco, Azienda Ospedaliera Polo Universitario Luigi Sacco, Milano

<sup>3</sup> SC Patologia Clinica, ASST Brianza, Ospedale di Vimercate, Vimercate (MB)

### ABSTRACT

#### Evaluation of a panel of biomarkers as a surrogate of the soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) for the prescription of anakinra in COVID-19 patients.

**Introduction:** the SAVE-MORE study showed that the early start of treatment with the IL-1 $\alpha/\beta$  inhibitor anakinra, guided by Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (suPAR) levels  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ , in patients with moderate or severe COVID-19, significantly reduced the risk of worse clinical outcome at day 28. Recently, the Italian Drug Agency has approved the use of anakinra for the treatment of adults with COVID-19 and suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ . However, suPAR methods are not widely available, which hinders the clinical use of anakinra. Aim of this study was to identify a panel of biochemical tests as a surrogate marker of suPAR positivity ( $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ ).

**Methods:** the study included 456 hospitalized patients at the Policlinico Hospital in Milano (Italy) with COVID-19 diagnosis. suPAR was measured at admission by suPARnostic TurbiLatex kit on Roche Cobas c702.

**Results:** median suPAR was 7.6  $\mu\text{g/L}$  (63% of patients with suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ ). At the univariate logistic regression, suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$  was found to be associated with age, white blood cells, neutrophils, hemoglobin, creatinine, lactate dehydrogenase (LDH), ferritin, C-reactive protein, fibrinogen, D-Dimer, but not with sex, lymphocytes, monocytes, platelets, alanine aminotransferase, total bilirubin, troponin T and thyroid stimulating hormone. However, at the multivariate analysis, only age, hemoglobin, creatinine, LDH, C-reactive protein and D-Dimer were found as independent predictors of suPAR positivity. Percentage of correct classification and AUC of the multivariate model were, respectively, 75.1% and 0.83 (95%CI 0.80- 0.87).

**Discussion:** due to the moderate percentage of correct classification of the multivariate model, we conclude that this combination of blood markers cannot be used as a surrogate of suPAR for anakinra prescription.

**Parole chiave:** suPAR, anakinra, COVID-19

### INTRODUZIONE

Il recettore solubile dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico (suPAR) rappresenta la forma solubile del recettore, i cui livelli ematici indicano un'attivazione aspecifica della risposta immunitaria e infiammatoria (1).

Già prima della pandemia da SARS-CoV-2 numerosi lavori in letteratura avevano evidenziato un'associazione di suPAR con differenti condizioni patologiche. In particolare, in una rassegna di Hamie et al. del 2018 veniva discusso il potenziale ruolo di suPAR in patologie renali (insufficienza renale cronica, glomerulosclerosi

focale segmentale, nefropatia diabetica, nefropatia da IgA), patologie cardiovascolari (malattia coronarica), sepsi e altre malattie infettive (HIV-1, malaria, tubercolosi, meningite batterica), malattie gastrointestinali (pancreatite acuta, insufficienza epatica acuta, cirrosi epatica, epatite cronica B, epatite cronica C), malattie polmonari (malattia polmonare cronica ostruttiva, asma, fibrosi polmonare idiopatica), malattie dermatologiche e reumatiche (psoriasi, LES, artrite reumatoide, spondilite anchilosante), malattie ematologiche e oncologiche (AML, mieloma multiplo, linfomi, cancro ovarico, mammario, gastrico, uterino, intestinale) e diabete (2).

Corrispondenza a: Matteo Vidali, SC Patologia Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Italia, Via F. Sforza 35, 20122, Milano - E-mail: matteo.vidali@policlinico.mi.it

Ricevuto: 21.07.2024

Rivisto: 05.08.2024

Accettato: 21.08.2024

Published on-line: 02.09.2024

DOI: 10.19186/BC\_2024.045

Numerosi autori hanno dimostrato un ruolo di suPAR come predittore indipendente di severità di malattia, riammissione ospedaliera e mortalità a breve o lungo termine (a 7, 30 e 90 giorni) in diverse popolazioni di pazienti e in differenti ambiti clinici (3-7). Inoltre, numerose evidenze sottolineano il valore predittivo negativo di suPAR nell'esclusione di esiti clinici sfavorevoli. La definizione di un valore decisionale per suPAR costituisce, tuttavia, un aspetto critico, a causa dell'eterogeneità degli ambiti clinici e dei pazienti studiati, come pure dei metodi utilizzati per la sua determinazione (3-7). In un documento di consenso del 2020, il gruppo di studio ellenico sulla sepsi, composto da esperti in terapia intensiva, medicina d'urgenza, medicina interna e malattie infettive, ha raccomandato un valore pari a 4 µg/L, sotto al quale è possibile dimettere con sicurezza i pazienti dal Dipartimento di Emergenza dopo un'accurata valutazione clinica, e un valore pari a 6 µg/L, sopra al quale il paziente deve essere strettamente monitorato per il rischio di esito sfavorevole (8). Livelli di suPAR >12 µg/L in pazienti critici sono, invece, risultati prognostici di mortalità a 28 giorni tra il 17% e il 50%, a seconda del punteggio APACHE II (8). Il valore di 6 µg/L è supportato da una recente revisione sistematica sull'utilizzo di suPAR come predittore di sepsi nei dipartimenti di emergenza (9). Inoltre, un sotto-studio del trial TRAGE III ha evidenziato una maggior mortalità nei pazienti dimessi entro 24h con livelli di suPAR >6 µg/L (10). In considerazione della molteplicità di funzioni esercitate dal sistema dell'attivatore urokinasico del plasminogeno e del suo recettore (uPA-uPAR) (11) e delle molte evidenze di un ruolo di suPAR in numerose patologie, incluse malattie polmonari, malattie renali croniche e malattie trombotiche, non sorprende che suPAR sia stato valutato in associazione all'infezione da COVID-19 (12). Recentemente, Lippi et al. in una metanalisi limitata a 5 lavori, hanno evidenziato che la misurazione dei livelli di suPAR in pazienti con infezione da COVID-19 poteva rappresentare uno strumento importante per predire il rischio di sviluppare complicanze severe (insufficienza renale acuta, sindrome da distress respiratorio acuto, insufficienza respiratoria severa, ricovero in terapia intensiva e morte) (13-15). suPAR potrebbe svolgere un ruolo patogenetico nei pazienti con COVID-19, nella progressione a insufficienza renale acuta associata alla presenza di micro- e macro-trombosi, sia mediante l'induzione di stress ossidativo nelle cellule renali, sia attraverso l'induzione di uno stato ipercoagulativo dovuto alla competizione di suPAR per uPA alla membrana cellulare con conseguente riduzione della fibrinolisi (13).

Lo studio SAVE-MORE, di fase 3 randomizzato, in doppio cieco, ha valutato l'efficacia e la sicurezza del trattamento precoce con anakinra, un antagonista del recettore dell'IL-1 ottenuto con tecnica ricombinante, in 594 pazienti ospedalizzati con forma moderata o severa di COVID-19 (16). Uno dei fattori di esclusione dallo studio era rappresentato da livelli di suPAR <6 µg/L. La percentuale di soggetti con guarigione completa e nessuna carica virale rilevata al giorno 28 è risultata pari a 50,4% (204/405) e a 26,5% (50/189), rispettivamente nei pazienti trattati con anakinra o con

placebo, con una mortalità nei due bracci sovrapponibile (16). Complessivamente, lo studio SAVE-MORE ha evidenziato che il trattamento precoce con anakinra, guidato dai livelli di suPAR, in pazienti ospedalizzati con forme di COVID-19 moderato o grave, riduce significativamente il rischio di peggioramento del quadro clinico al giorno 28 (16).

A seguito dello studio SAVE-MORE, con comunicato stampa n. 665 del 28/09/2021, l'Agenzia Italiana per il Farmaco (AIFA) ha approvato l'inclusione di anakinra nell'elenco 648/96 per il trattamento degli adulti ricoverati con COVID-19 e suPAR ≥6 µg/L (17).

Secondo questa nota, la misura della concentrazione di suPAR risulta quindi obbligatoria per la prescrizione di anakinra ai pazienti con diagnosi molecolare confermata di SARS-CoV-2. Tuttavia, sebbene siano oggi disponibili in commercio metodi turbidimetrici, implementabili sulle principali piattaforme automatizzate di chimica clinica, la disponibilità di metodi per suPAR risulta poco diffusa ed eseguibile solo in una minoranza di laboratori analisi, a differenza di quanto accaduto per altri esami, come ad esempio IL-6, che sono stati introdotti in molti laboratori durante la fase di emergenza della pandemia per la possibilità di utilizzare alcuni farmaci per il COVID-19 (18).

Questa scarsa disponibilità del risultato di suPAR rappresenta un fattore limitante critico per la prescrizione di anakinra, riducendo le opzioni terapeutiche per il paziente e obbligando ad utilizzare farmaci alternativi gravati da maggiori effetti collaterali. Scopo di questo studio è stato quello di identificare un pannello di esami biochimici capace di classificare i soggetti con infezione COVID-19 con livelli di suPAR ≥6 µg/L e quindi potenzialmente utilizzabile come marcatore surrogato dello stesso suPAR.

## METODI

### Selezione dei soggetti e delle richieste

Nello studio sono stati inclusi tutti i pazienti ricoverati presso le Unità Operative di Medicina Interna ad alta intensità e di Malattie Infettive dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, con diagnosi molecolare di positività per SARS-CoV-2, candidabili al trattamento con anakinra secondo i criteri specificati nella nota AIFA (15), e con richiesta di suPAR nel periodo 29/10/2021 - 16/05/2022. In totale sono stati arruolati 456 pazienti. Ogni paziente presentava un'unica richiesta per suPAR all'ingresso. Tramite software PL/SQL Developer ver. 7.0.0 e query SQL, dal gestionale di laboratorio Concerto (Dedalus, Italia) sono stati recuperati tutti i risultati di suPAR e di altri esami, inclusi emocromo, creatinina, lattato deidrogenasi (LDH), ferritina, proteina C reattiva (PCR), fibrinogeno, D-Dimero, alanina aminotrasferasi (ALT), bilirubina totale, troponina T e tireotropina (TSH), richiesti contestualmente a suPAR o nell'intervallo di ±1 giorno rispetto alla richiesta per suPAR.

Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, come emendata nel 2013.

### Analisi biochimiche

Il suPAR è stato misurato in campioni di sangue in litio eparina tramite kit suPARnostic® TurbiLatex della ditta Virogates (Danimarca), commercializzato in Italia dalla ditta B.S.N. srl (Castelleone, Cremona). Il saggio suPARnostic® è un immunodosaggio turbidimetrico potenziato da particelle (PETIA), dove particelle rivestite con anticorpi anti-suPAR nel reagente si agglutinano con il suPAR presente nel campione, formando un complesso antigene-anticorpo misurato a 570-590 nm. Il metodo è stato implementato su strumentazione Cobas Roche c702. L'esecuzione giornaliera degli esami richiesti è stata preceduta dall'analisi dei materiali di controllo a due livelli forniti dal produttore del saggio. La ripetibilità totale, o entro il Laboratorio, dichiarata dal produttore era pari a 11,4% (livello basso: 3,7 µg/L), 5,8% (livello medio: 6,9 µg/L) e 6,1% (livello alto: 9,9 µg/L), mentre quella verificata in laboratorio (schema 3 replicati x 5 giorni) prima dell'implementazione è risultata pari a 14,8%, 12,1% e 6,6% rispettivamente.

Gli analiti di chimica clinica e immunometria sono stati analizzati su sistema Cobas Roche (analizzatori e801 e c702), mentre l'emocromo ed gli esami di coagulazione rispettivamente su strumento Sysmex XN-10 e Werfen ACLTOP 750 CTS.

### Analisi statistica

L'analisi statistica e grafica è stata eseguita con il software statistico SPSS v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e con il software R v.4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). La distribuzione gaussiana è stata valutata preliminarmente tramite q-q plot e con il test di Shapiro-Wilk. A causa della distribuzione non gaussiana della maggior parte degli analiti studiati, le variabili quantitative sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (IQR), mentre le variabili categoriche come frequenze assolute e percentuali. Analogamente, le differenze tra due gruppi (suPAR <6 versus ≥6 µg/L) sono state valutate tramite test non parametrico di Mann-Whitney e la correlazione è stata valutata tramite test non parametrico di Spearman. L'associazione tra la positività a suPAR (≥6 µg/L) e i predittori quantitativi continui o qualitativi è stata valutata tramite regressione logistica univariata e multivariata. La capacità predittiva del modello multivariato è stata valutata tramite curva ROC e riportata come AUC (area sotto la curva) unitamente all'intervallo di confidenza al 95% (IC95%). La concordanza tra positività a suPAR (≥6 µg/L) osservata con quella predetta dal modello multivariato è stata valutata tramite calcolo delle coppie concordanti e kappa di Cohen. Nessun dato mancante è stato imputato.

### RISULTATI

Lo studio ha coinvolto 456 pazienti ospedalizzati (maschi:femmine 54:46%), con età mediana di 75 anni (IQR 60-83). Di questi, 124 (27%) erano ricoverati presso l'Unità Operativa di Malattie Infettive, mentre i restanti

332 (73%) presso l'Unità Operativa di Medicina Interna ad alta intensità.

Le caratteristiche biochimiche dei pazienti in studio sono riportate in Tabella 1. La concentrazione mediana di suPAR è risultata pari a 7,6 µg/L (IQR 4,8-10,8) con una frequenza di positività (suPAR ≥6 µg/L) pari a 63%.

I pazienti con suPAR <6 µg/L e quelli con suPAR ≥6 µg/L sono stati confrontati per età, sesso e per tutti i parametri biochimici ed ematologici valutati (Tabella 2). I pazienti con livelli di suPAR ≥6 µg/L presentavano un'età mediana e valori mediani di creatinina, LDH, troponina T, ferritina, PCR, fibrinogeno, D-Dimero, globuli bianchi, neutrofilii significativamente più elevati, e valori mediani di linfociti, monociti ed emoglobina significativamente più bassi rispetto ai pazienti con suPAR <6 µg/L (Tabella 2). L'associazione tra i marcatori biochimici è stata valutata tramite analisi di correlazione non parametrica di Spearman (Figura 1). Tra i coefficienti di correlazione calcolati, alcuni sono risultati >0,500, tra cui troponinaT-creatinina (rho=0,589; p<0,001), fibrinogeno-PCR (rho=0,611; p<0,001), globuli bianchi-monociti (rho=0,553; p<0,001) e globuli bianchi-neutrofilii (rho=0,945; p<0,001) (Figura 1).

L'associazione tra variabili demografiche e marcatori biochimici con il suPAR è stata ulteriormente valutata tramite regressione logistica univariata. All'analisi univariata, livelli di suPAR ≥6 µg/L sono risultati significativamente associati con età, creatinina, LDH, ferritina, PCR, fibrinogeno, D-Dimero, globuli bianchi, neutrofilii ed emoglobina, ma non con sesso, ALT, bilirubina totale, troponina T, TSH, linfociti, monociti e piastrine (Tabella 3).

#### Tabella 1

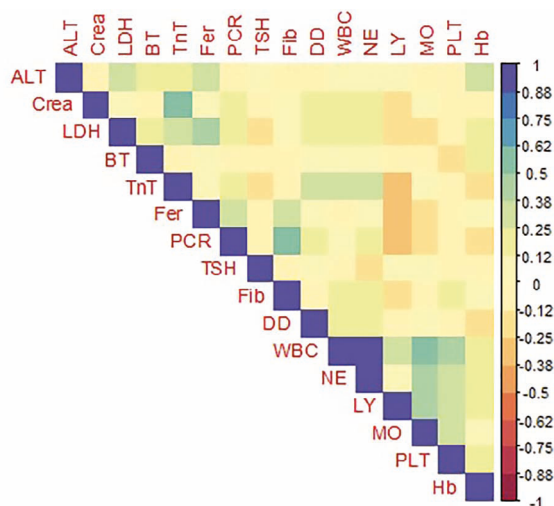
*Caratteristiche biochimiche della popolazione arruolata nello studio. Le variabili sono descritte come mediana e intervallo interquartile (IQR).*

Variabile	Mediana (IQR)
ALT (U/L)	24 (15-38)
Creatinina (mg/dL)	0,95 (0,72-1,29)
LDH (U/L)	253 (192-352)
Bilirubina totale (mg/dL)	0,48 (0,35-0,72)
Troponina T (ng/L)	28 (12-55)
suPAR (µg/L)	7,6 (4,8-10,8)
Ferritina (µg/L)	556 (248-1150)
PCR (mg/L)	53,8 (22,8-107,1)
TSH (mIU/L)	1,70 (0,80-2,40)
Fibrinogeno (mg/dL)	481 (373-598)
D-Dimero (µg/L)	1524 (834-2626)
Globuli bianchi (10 <sup>9</sup> /L)	7,27 (5,05-10,23)
Neutrofilii (10 <sup>9</sup> /L)	5,33 (3,40-7,90)
Linfociti (10 <sup>9</sup> /L)	0,94 (0,62-1,45)
Monociti (10 <sup>9</sup> /L)	0,53 (0,36-0,77)
Piastrine (10 <sup>9</sup> /L)	217 (151-281)
Emoglobina (g/L)	119 (100-134)

**Tabella 2**

Confronto tra pazienti con livelli di suPAR <6 versus ≥6 µg/L per età, sesso e tutti i parametri biochimici ed ematologici valutati. I risultati sono espressi come mediana e intervallo interquartile; i valori statisticamente significativi sono riportati in neretto.

Variabile	suPAR <6 µg/L	suPAR ≥6 µg/L	p
Età (anni)	68 (52-80)	78 (66-85)	<b>&lt;0,001</b>
Sesso, M:F (%)	54:46	54:46	1,000
ALT (U/L)	24 (16-36)	25 (15-39)	0,513
Creatinina (mg/dL)	0,84 (0,67-1,04)	1,05 (0,78-1,63)	<b>&lt;0,001</b>
LDH (U/L)	203 (164-285)	285 (211-393)	<b>&lt;0,001</b>
Bilirubina totale (mg/dL)	0,51 (0,36-0,75)	0,47 (0,35-0,71)	0,403
Troponina T (ng/L)	20 (8,7-42)	39 (18-66)	<b>0,013</b>
Ferritina (µg/L)	354 (198-837)	750 (325-1379)	<b>&lt;0,001</b>
PCR (mg/L)	32,6 (11,4-65,8)	68,3 (31,9-130,6)	<b>&lt;0,001</b>
TSH (mIU/L)	1,77 (0,93-2,40)	1,62 (0,74-2,40)	0,143
Fibrinogeno (mg/dL)	444 (361-561)	505 (379-623)	<b>0,003</b>
D-Dimero (µg/L)	1004 (666-2150)	1874 (997-4307)	<b>&lt;0,001</b>
Globuli bianchi (10 <sup>9</sup> /L)	6,79 (4,91-9,30)	7,65 (5,12-10,80)	<b>0,019</b>
Neutrofili (10 <sup>9</sup> /L)	4,55 (3,18-7,27)	5,90 (3,56-8,44)	<b>0,001</b>
Linfociti (10 <sup>9</sup> /L)	1,21 (0,78-1,67)	0,83 (0,56-1,21)	<b>&lt;0,001</b>
Monociti (10 <sup>9</sup> /L)	0,59 (0,40-0,79)	0,51 (0,34-0,75)	<b>0,046</b>
Piastrine (10 <sup>9</sup> /L)	228 (177-302)	211 (140-278)	0,082
Emoglobina (g/L)	126 (106-138)	116 (97-131)	<b>&lt;0,001</b>

**Figura 1**

Matrice grafica di correlazione per i marcatori biochimici in studio. La scala laterale indica la magnitudine del coefficiente di correlazione rho di Spearman.

Crea, creatinina; BT, bilirubina totale; TnT, troponina T; Fer, ferritina; PCR, proteina C reattiva; Fib, fibrinogeno; DD, D-Dimero; WBC, globuli bianchi; NE, neutrofili; LY, linfociti; MO, monociti; PLT, piastrine; Hb, emoglobina.

Tuttavia, all'analisi multivariata, solo età, creatinina, LDH, PCR, D-Dimero ed emoglobina sono risultati predittori indipendenti di livelli di suPAR ≥6 µg/L (Tabella 3).

In Figura 2 è possibile osservare la curva ROC del modello multivariato per livelli di suPAR ≥6 µg/L. L'area sotto la curva (AUC) è risultata pari a 0,83 (IC95% 0,80-0,87), con specificità e sensibilità, calcolate ad un valore di 6 µg/L, rispettivamente pari a 82% e 64%.

Nella Tabella 4 viene confrontata la positività osservata per suPAR ≥6 µg/L con quella predetta dal modello multivariato per i soggetti di cui era disponibile il dato di tutti gli analiti inclusi nel modello (n=414). La percentuale di coppie concordanti (neg/neg + pos/pos)/totale è risultata pari a (99+212)/414 = 75%. La kappa di Cohen è risultata pari a 0,46 (IC95% 0,37-0,55).

## DISCUSSIONE

Numerosi studi hanno evidenziato un significativo ruolo prognostico del marcatore suPAR. In particolare, suPAR è stato associato ad un elevato valore predittivo di riammissione ospedaliera e di mortalità a 7 e a 30 giorni in numerose patologie. Relativamente a questo aspetto, suPAR è stato valutato in Medicina di Urgenza per individuare quei pazienti per i quali è necessaria una

**Tabella 3**

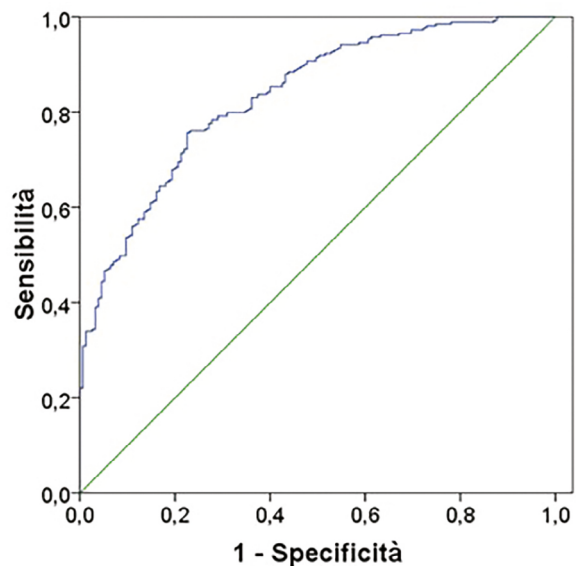
Regressione logistica univariata e multivariata per livelli di suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ . I valori statisticamente significativi sono riportati in neretto.

Variabile	Analisi univariata		Analisi multivariata	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Età (anni)	1,05 (1,03-1,06)	<b>&lt;0,001*</b>	1,03 (1,02-1,05)	<b>&lt;0,001*</b>
Sesso	0,99 (0,67-1,45)	0,943		
ALT (U/L)	1,00 (1,00-1,01)	0,238		
Creatinina (mg/dL)	5,06 (2,90-8,81)	<b>&lt;0,001*</b>	3,49 (1,86-6,54)	<b>&lt;0,001*</b>
LDH (U/L)	1,00 (1,00-1,00)	<b>0,005*</b>	1,00 (1,00-1,00)	<b>0,021*</b>
Bilirubina totale (mg/dL)	1,05 (0,90-1,22)	0,534		
Troponina T (ng/L)	1,01 (1,00-1,02)	0,153		
Ferritina ( $\mu\text{g/L}$ )	1,00 (1,00-1,00)	<b>0,006*</b>	1,00 (1,00-1,00)	0,071
PCR (mg/L)	1,01 (1,01-1,02)	<b>&lt;0,001*</b>	1,01 (1,00-1,01)	<b>0,005*</b>
TSH (mIU/L)	1,00 (0,96-1,04)	0,970		
Fibrinogeno (mg/dL)	1,00 (1,00-1,00)	<b>0,005*</b>	1,00 (1,00-1,00)	0,952
D-Dimero ( $\mu\text{g/L}$ )	1,00 (1,00-1,00)	<b>&lt;0,001*</b>	1,00 (1,00-1,00)	<b>0,004*</b>
Globuli bianchi ( $10^9/\text{L}$ )	1,07 (1,02-1,12)	<b>0,002*</b>	Non incluso per collinearità	
Neutrofili ( $10^9/\text{L}$ )	1,10 (1,05-1,16)	<b>&lt;0,001*</b>	1,06 (0,99-1,13)	0,114
Linfociti ( $10^9/\text{L}$ )	1,02 (0,98-1,06)	0,444		
Monociti ( $10^9/\text{L}$ )	0,71 (0,41-1,24)	0,233		
Piastrine ( $10^9/\text{L}$ )	1,00 (1,00-1,00)	0,064		
Emoglobina (g/L)	0,98 (0,98-0,99)	<b>&lt;0,001*</b>	0,99 (0,98-1,00)	<b>0,043*</b>

stretta osservazione clinica perché a maggior rischio di progressione verso forme più severe di malattia (3,6). Queste evidenze sono già rintracciabili in letteratura prima della pandemia COVID-19. Poiché in alcuni di questi studi suPAR è stato riconosciuto avere un ruolo predittivo nei setting della sepsi, insufficienza renale e tromboembolismo venoso o altre malattie trombotiche, tutti quadri o evoluzioni possibilmente associate a COVID-19, non sorprende che dall'inizio della pandemia numerosi autori abbiano valutato il ruolo di suPAR nei pazienti COVID-19 (13).

A questo proposito, recenti studi hanno evidenziato come in pazienti COVID-19 elevati livelli di suPAR, misurati all'ammissione, siano significativamente associati ad un maggior rischio di sviluppare un danno renale acuto, forme respiratorie più severe e malattia critica (13). In questi ambiti clinici, suPAR risulta un predittore indipendente da altre variabili e con un potere prognostico superiore a quello di altri marcatori come la PCR.

Diversi valori decisionali sono stati proposti in letteratura per suPAR; tuttavia, la maggior parte degli studi concorda sul limite di 6  $\mu\text{g/L}$ , per indicare il valore oltre il quale il paziente presenta un maggior rischio di evoluzione verso forme più severe (8-10).



**Figura 2**  
Curva ROC del modello multivariato per livelli di suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ .

**Tabella 4**

Tabella di contingenza per la positività predetta (modello multivariato) e osservata di suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ .

		Osservato		Totale
		<6 $\mu\text{g/L}$	$\geq 6$ $\mu\text{g/L}$	
Predetto	<6 $\mu\text{g/L}$	99 (24%)	47 (11%)	146 (35%)
	$\geq 6$ $\mu\text{g/L}$	56 (14%)	212 (51%)	268 (65%)
Totale		155 (38%)	259 (62%)	414 (100%)

Nel recente studio SAVE-MORE (16), l'utilizzo di suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ , unitamente ad altri criteri clinici e strumentali, ha consentito di individuare un sottogruppo di pazienti con diagnosi molecolare di SARS-CoV-2 che beneficiavano del trattamento con il farmaco anakinra (14). A fine settembre 2021 AIFA ha approvato l'inclusione di anakinra nell'elenco 648/96 per il trattamento degli adulti ricoverati con COVID-19 e suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ . Tuttavia, nonostante, suPAR sia oggi disponibile su molte piattaforme automatizzate di laboratorio, esso risulta ancora poco diffuso all'interno dei laboratori italiani. In considerazione di questa scarsa disponibilità, in questo lavoro è stato verificato il possibile utilizzo di un pannello di marcatori, associati a infiammazione/infezione e a gravità di malattia in corso di infezione da SARS-CoV-2 e richiedibili in regime di emergenza/urgenza, come surrogato di suPAR.

I principali risultati di questo studio sono i seguenti:

- la percentuale di pazienti con suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$  era pari a 63%;
- suPAR è risultato associato ad età, creatinina, LDH, ferritina, PCR, fibrinogeno, D-Dimero, globuli bianchi, neutrofili ed emoglobina;
- il pannello di predittori indipendenti, identificati all'analisi multivariata, che includeva età, creatinina, LDH, PCR, D-Dimero ed emoglobina, presentava una moderata-alta AUC (0,83) e riusciva a classificare correttamente il 75% dei pazienti.

L'associazione con altri marcatori non sorprende ed è in accordo con quanto riportato da altri studi. Il risultato più interessante di questo lavoro è la capacità predittiva del modello multivariato. A fronte di un'AUC moderata-alta, la capacità di classificare correttamente i pazienti con suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$  era solo del 75%. Occorre, sottolineare che il calcolo delle coppie concordanti non considera la concordanza che ci sarebbe comunque per effetto del caso. La kappa di Cohen, che invece corregge, risulta avere un valore basso-discreto pari a 0,46.

La bassa, o comunque moderata, concordanza non stupisce e sostanzialmente concorda con gli studi della letteratura, dove suPAR ha mostrato di avere un potere predittivo superiore a quello di altri marcatori (6,19-21). In effetti, suPAR, e non altri marcatori o una combinazione di essi, sembra intercettare un certo numero di pazienti a maggior rischio di forme severe di malattia, riammissione e morte (6,19-21).

Ovviamente questi risultati sono da considerarsi come speculativi e unicamente a fini di ricerca, in quanto comunque il modello, anche se caratterizzato da elevata capacità predittiva, non potrebbe attualmente superare il limite rappresentato dalla nota AIFA (17).

È interessante sottolineare che, sebbene i livelli di molti dei parametri valutati fossero significativamente differenti tra i pazienti con suPAR < o  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$  (Tabella 2), solo per una minoranza di essi le differenze erano anche clinicamente significative.

Un limite di questo studio è rappresentato dalla non disponibilità di dati clinici, in particolare quelli di monitoraggio successivo. Questo può rappresentare un problema per la valutazione del modello al fine di predire mortalità e/o riammissione. Tuttavia, questa limitazione non sembra compromettere la solidità dei risultati trovati in quanto esso si focalizza nell'identificare un modello surrogato di suPAR unicamente basato su dati di laboratorio e in secondo luogo perché tutti questi pazienti, in quanto selezionati attentamente, perché possibili candidati ad anakinra, presentavano quadri clinici compatibili con lo studio SAVE-MORE e la nota AIFA.

Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che non è stata condotta una validazione esterna del modello e che non sono stati considerati possibili fattori confondenti, quali comorbidità e/o terapie farmacologiche.

È verosimile che l'inclusione di altri biomarcatori, come pure l'utilizzo di algoritmi di apprendimento automatico più performanti, possa determinare un aumento della capacità predittiva del modello. Nel primo caso, l'utilizzo di altri biomarcatori richiede considerazioni aggiuntive in termini di aumento dei costi e della disponibilità di questi analiti in regime d'emergenza; nel nostro studio sono stati considerati analiti disponibili in emergenza/urgenza e richiesti per la maggior parte dei pazienti con COVID-19. Relativamente al secondo aspetto, è bene sottolineare che la regressione logistica, sebbene meno performante rispetto ad altri algoritmi di apprendimento automatico, risulta più facilmente comprensibile e spiegabile.

È degno di nota sottolineare il fatto che fino a 414 dei 456 (91%) pazienti inizialmente considerati presentavano risultati per tutti gli analiti del modello multivariato (Tabella 4), mentre eventuali dati mancanti non sono stati imputati.

Inoltre, in questo studio nessuna verifica è stata condotta per il valore decisionale di 6  $\mu\text{g/L}$ , né la capacità predittiva di suPAR è stata valutata a differenti valori, in quanto lo scopo dichiarato era identificare tramite un pannello di altri analiti disponibili in urgenza quei pazienti che presentavano livelli di suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ , come già specificato nella nota AIFA.

In conclusione, numerosi marcatori, disponibili in regime di urgenza, sono associati a elevati livelli di suPAR. Il pannello multivariato di marcatori identificato in questo studio, comprendente età, creatinina, LDH, PCR, D-Dimero ed emoglobina, presenta un'AUC moderata-

alta ma complessivamente identifica correttamente solo il 75% delle negatività/positività a suPAR  $\geq 6$   $\mu\text{g/L}$ , suggerendo la necessità di utilizzare suPAR e non un suo surrogato per la prescrizione di anakinra. Infine, è necessaria un'ulteriore convalida clinica per valutare un eventuale ruolo di questo modello nel predire la gravità e la mortalità in questi pazienti.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia tutto il personale tecnico del settore di chimica-clinica della Struttura Complessa Patologia Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

- Rasmussen LJH, Petersen JEV, Eugen-Olsen J. Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) as a biomarker of systemic chronic inflammation. *Front Immunol* 2021;12:780641.
- Hamie L, Daoud G, Nemer G, Nammour T, El Chediak A, Uthman IW, et al. SuPAR, an emerging biomarker in kidney and inflammatory diseases. *Postgrad Med J* 2018;94:517-24.
- Rasmussen LJ, Ladellund S, Haupt TH, Ellekilde G, Poulsen JH, Iversen K, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in acute care: a strong marker of disease presence and severity, readmission and mortality. A retrospective cohort study. *Emerg Med J* 2016;33:769-75.
- Desmedt S, Desmedt V, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. The intriguing role of soluble urokinase receptor in inflammatory diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54:117-33.
- Hayek SS, Sever S, Ko YA, Trachtman H, Awad M, Wadhvani S, et al. Soluble Urokinase Receptor and Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2015;373:1916-25.
- Huang Q, Xiong H, Yan P, Shuai T, Liu J, Zhu L, et al. The diagnostic and prognostic value of suPAR in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Shock* 2020;53:416-25.
- Piccioni A, Baroni S, Manca F, Sarlo F, Savioli G, Candelini M, et al. Multi-Marker approach in patients with acute chest pain in the emergency department. *J Pers Med* 2024;14:564.
- Velissaris D, Dimopoulos G, Parissis J, Alexiou Z, Antonakos N, Babalis D, et al. Prognostic role of Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor at the emergency department: a position paper by the Hellenic Sepsis Study Group. *Infect Dis Ther* 2020;9:407-16.
- Velissaris D, Pierrakos C, Karamouzou V, Pantzaris ND, Gogos C. The use of soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as a marker of sepsis in the emergency department setting. A current review. *Acta Clin Belg* 2021;76:79-84.
- Schultz M, Rasmussen LJH, Høi-Hansen T, Kjølner E, Jensen BN, Lind MN, et al. Early discharge from the emergency department based on Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) Levels: A TRIAGE III Substudy. *Dis Markers* 2019:3403549.
- Mahmood N, Mihalciou C, Rabbani SA. Multifaceted role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front Oncol* 2018;8:24.
- Stauning MA, Altintas I, Kallemsø T, Eugen-Olsen J, Lindstrøm MB, Rasmussen LJH, et al. Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor as a decision marker for early discharge of patients with COVID-19 symptoms in the emergency department. *J Emerg Med* 2021;61:298-313.
- Lippi G, Henry BM, Favaloro EJ. Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in COVID-19 patients. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:e413-5.
- Azam TU, Shadid HR, Blakely P, O'Hayer P, Berlin H, Pan M, et al. Soluble urokinase receptor (SuPAR) in COVID-19-related AKI. *J Am Soc Nephrol* 2020;31:2725-35.
- Oulhaj A, Alsuwaidi AR, Suliman A, Gasmelseed H, Khan S, Alawi S, et al. Admission levels of soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) associated with development of severe complications in hospitalised COVID-19 patients: a prospective cohort study. *Int J Infect Dis* 2021;107:188-94.
- Kyriazopoulou E, Poulakou G, Milionis H, Metallidis S, Adamis G, Tsiakos K, et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat Med* 2021;27:1752-60.
- Anakinra nella terapia dei pazienti adulti con COVID-19 - CTS 23 settembre 2021. [https://www.aifa.gov.it/documenti/20142/1123276/Anakinra\\_28.09.2021.pdf](https://www.aifa.gov.it/documenti/20142/1123276/Anakinra_28.09.2021.pdf) (ultimo accesso: luglio 2024)
- Ammirabile M, Aita A, Bartolini A, Spolaore F, Scapaticci M, Pellegrini C, et al. Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020;44 SS2: 94-S103.
- Arnold DT, Attwood M, Barratt S, Morley A, Elvers KT, McKernon J, et al. Predicting outcomes of COVID-19 from admission biomarkers: a prospective UK cohort study. *Emerg Med J* 2021;38:543-8.
- Rovina N, Akinosoglou K, Eugen-Olsen J, Hayek S, Reiser J, Giamarellos-Bourboulis EJ. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as an early predictor of severe respiratory failure in patients with COVID-19 pneumonia. *Crit Care* 2020;24:187.
- Napolitano F, Di Spigna G, Vargas M, Iacovazzo C, Pinchera B, Spalletti Cernia D, et al. Soluble Urokinase Receptor as a promising marker for early prediction of outcome in COVID-19 hospitalized patients. *J Clin Med* 2021;10:4914.