

n.13
2020

Working Paper of Public Health

La serie di Working Paper of Public Health (WP) dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria è una serie di pubblicazioni online ed Open Access, progressiva e multi disciplinare in Public Health (ISSN: 2279-9761). Vi rientrano pertanto sia contributi di medicina ed epidemiologia, sia contributi di economia sanitaria e management, etica e diritto. Rientra nella politica aziendale tutto quello che può proteggere e migliorare la salute della comunità attraverso l'educazione e la promozione di stili di vita, così come la prevenzione di malattie ed infezioni, nonché il miglioramento dell'assistenza (sia medica sia infermieristica) e della cura del paziente. Si prefigge quindi l'obiettivo scientifico di migliorare lo stato di salute degli individui e/o pazienti, sia attraverso la prevenzione di quanto potrebbe condizionarla sia mediante l'assistenza medica e/o infermieristica finalizzata al ripristino della stessa.

Gli articoli pubblicati impegnano esclusivamente gli autori, le opinioni espresse non implicano alcuna responsabilità da parte dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria.

La pubblicazione è presente in: Directory of Open Access Journals (DOAJ); Google Scholar; Academic Journals Database;

Comitato Scientifico:

Prof. Roberto Barbato

Dott.ssa Manuela Ceccarelli

Dott. Diego Gazzolo

Dott.ssa Federica Grosso

Prof. Marco Krengli

Prof.ssa Roberta Lombardi

Prof. Leonardo Marchese

Prof. Vito Rubino

Dott. Gioel Gabrio Secco

Dott. Paolo Tofanini

Dott. Giacomo Centini

Dott. Gianfranco Ghiazza

Dott.ssa Daniela Kozel

Dott. Marco Ladetto

Dott. Antonio Maconi

Dott. Alessio Pini Prato

Dott.ssa Mara Scagni

Dott.ssa Maria Elena Terlizzi

Dott.ssa Roberta Volpini

Comitato editoriale:

Dott. Antonio Maconi

Dott. Alfredo Muni

Dott.ssa Marinella Bertolotti

Responsabile:

Dott. Antonio Maconi

telefono: +39.0131.206818

email: amaconi@ospedale.al.it

Segreteria:

Mariateresa Dacquino, Marta Betti,

Mariasilvia Como, Laura Gatti

telefono: +39.0131.206192

email: mdacquino@ospedale.al.it; lgatti@ospedale.al.it

Norme editoriali:

Le pubblicazioni potranno essere sia in lingua italiana sia in lingua inglese, a discrezione dell'autore. Sarà garantita la sottomissione di manoscritti a tutti coloro che desiderano pubblicare un proprio lavoro scientifico nella serie di WP dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria, purché rientrino nelle linee guida editoriali. Il Comitato editoriale verificherà che gli articoli sottomessi rispondano ai criteri editoriali richiesti. Nel caso in cui lo si ritenga necessario, lo stesso Comitato editoriale valuterà l'opportunità o meno di una revisione a studiosi o ad altri esperti, che potrebbero o meno aver già espresso la loro disponibilità ad essere revisori per

il WP (i.e. peer review). L'utilizzo del peer review costringerà gli autori ad adeguarsi ai migliori standard di qualità della loro disciplina, così come ai requisiti specifici del WP. Con questo approccio, si sottopone il lavoro o le idee di un autore allo scrutinio di uno o più esperti del medesimo settore. Ognuno di questi esperti fornirà una propria valutazione, includendo anche suggerimenti per l'eventuale miglioramento, all'autore, così come una raccomandazione esplicita al Comitato editoriale su cosa fare del manoscritto (i.e. accepted o rejected).

Al fine di rispettare criteri di scientificità nel lavoro proposto, la revisione sarà anonima, così come l'articolo revisionato (i.e. double blinded).

Diritto di critica:

Eventuali osservazioni e suggerimenti a quanto pubblicato, dopo opportuna valutazione di attinenza, sarà trasmessa agli autori e pubblicata on line in apposita sezione ad essa dedicata.

Questa iniziativa assume importanza nel confronto scientifico poiché stimola la dialettica e arricchisce il dibattito su temi d'interesse. Ciascun professionista avrà il diritto di sostenere, con argomentazioni, la validità delle proprie osservazioni rispetto ai lavori pubblicati sui Working Paper of Public Health.

Nel dettaglio, le norme a cui gli autori devono attenersi sono le seguenti:

- I manoscritti devono essere inviati alla Segreteria esclusivamente in formato elettronico all'indirizzo e-mail dedicato
- A discrezione degli autori, gli articoli possono essere in lingua italiana o inglese. Nel caso in cui il manoscritto è in lingua italiana, è possibile accompagnare il testo con due riassunti: uno in inglese ed uno in italiano, così come il titolo;
- Ogni articolo deve indicare, le Keywords, nonché il tipo di articolo (i.e. Original Articles, Brief Reports oppure Research Reviews);
- L'abstract è il riassunto dell'articolo proposto, pertanto dovrà indicare chiaramente: Obiettivi; Metodologia;
- Risultati; Conclusioni;
- Gli articoli dovrebbero rispettare i seguenti formati: Original Articles (4000 parole max., abstract 180 parole max., 40 references max.); Brief Reports (2000 parole max., abstract 120 parole max., 20 references max., 2 tabelle o figure) oppure Research Reviews (3500-5000 parole, fino a 60 references e 6 tabelle e figure);
- I testi vanno inviati in formato Word (Times New Roman, 12, interlinea 1.5). Le note, che vanno battute in apice, non possono contenere esclusivamente riferimenti bibliografici. Inoltre, la numerazione deve essere progressiva;
- I riferimenti bibliografici vanno inseriti nel testo riportando il cognome dell'Autore e l'anno di pubblicazione (e.g. Calabresi, 1969). Nel caso di più Autori, indicare nel testo il cognome del primo aggiungendo et al; tutti gli altri Autori verranno citati nei riferimenti bibliografici alla fine del testo.
- I riferimenti bibliografici vanno elencati alla fine del testo in ordine alfabetico (e cronologico per più opere dello stesso Autore).

Nel sottomettere un manoscritto alla segreteria di redazione, l'autore accetta tutte le norme qui indicate.

n.13
2020

titolo

**L'INFEZIONE DA SARS-COV-2
PUÒ INDURRE UN'ALTERAZIONE
DEL PROFILO AUTOIMMUNOLOGICO**

title

**SARS-COV-2 CAN INDUCE AN ALTERATION
OF THE AUTOIMMUNE PROFILE**

autori

Maria Cristina Sacchi¹, Stefania Tamiazzo¹, Paolo Stobbione², Ernesto Cristiano Lauritano³, Annalisa Roveta⁴, Roberto Guaschino¹, Ramona Bonometti³

¹Settore di Autoimmunologia, Laboratorio Analisi, Azienda ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

²SSD Reumatologia, Azienda ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

³Unità di Medicina Intensiva, Azienda ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

⁴IRFI (Infrastruttura Ricerca Formazione Innovazione), Azienda ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

tipologia

Articolo - Original article

keywords

SARS-Cov-2, Covid-19, Test autoimmuni

ABSTRACT

Obiettivo: lo studio ha valutato il profilo autoimmune di pazienti COVID-19 positivi ospedalizzati.

Metodologia: A 40 pazienti ospedalizzati con diagnosi confermata di COVID-19 sono stati eseguiti esami di chimica clinica e test di autoimmunità.

Risultati: I 40 pazienti arruolati nel nostro ospedale presentavano elevati livelli dei comuni marcatori infiammatori quali Proteina C Reattiva (PCR), Lattato Deidrogenasi (LDH) e ferritina. Anche la concentrazione di Interleuchina-6 (IL-6) era aumentata, confermando il ruolo fondamentale di questa interleuchina durante l'infezione da *severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2)*. Sono stati eseguiti i più comuni tests di autoimmunità. E' stata trovata una significativa prevalenza di anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) e anti-Saccaromices cerevisiae (ASCA IgA e IgG). I pazienti che mostravano una *de novo* risposta autoanticorpale, erano quelli con una peggiore prognosi della malattia.

Conclusioni: Il nostro studio dimostra che l'infezione da COVID-19 può scatenare una risposta autoimmune e potrebbe indurre l'insorgere di malattie autoimmuni. Questi dati spiegano perché farmaci usati per trattare le malattie autoimmuni potrebbero essere anche utili nel combattere l'infezione da SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Objectives: our study aimed to enlighten the autoimmune profile in Covid-19 positive hospitalized patients.

Methodology: 40 adult hospitalized patients, with laboratory-confirmed COVID-19 diagnosis were assessed for normal clinical practice and autoimmunity tests.

Results: 40 patients admitted to our hospital had high levels of common inflammatory markers, such as Reactive Protein C (PCR), Lactate Dehydrogenase (LDH) and ferritin. IL-6 concentration was also increased, supporting the major role of this interleukin during COVID-19 infection. The most common autoimmunity tests were performed. A significant prevalence of antinuclear- antibody (ANA), anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and anti-Saccharomyces antibodies (ASCA) was found. We observed that patients having a *de novo* autoimmune response, had the worst acute viral disease prognosis and outcome.

Conclusion: Our results sustain that COVID-19 infection can trigger autoimmunity and may induce the onset of autoimmune diseases. These data explained why drugs used to treat autoimmune diseases may also be useful for SARS-CoV-2 infection.

1. Introduzione

L'infezione da SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome*) rappresenta l'emergenza pandemica più grave, dovuta sia alla mancanza di terapie specifiche che alla forte virulenza del suo agente patogeno.

Alcuni pazienti COVID-19 (Corona Virus Disease-2019) positivi possono presentare sintomi simili all'influenza come febbre, tosse, stanchezza e dispnea; altri, di contro, possono sviluppare un quadro clinico molto severo andando incontro alla sindrome da disfunzione multiorgano che può portare anche a morte. Sulla base delle evidenze cliniche, l'infezione da SARS-Cov-2 può essere divisa in due fasi: **la fase replicativa** e quella dell'**immunità adattativa**. Queste due fasi potrebbero spiegare l'eterogeneità della patologia COVID-19 (Young et al, 2020). La prima fase è caratterizzata dalla replicazione virale e dalla risposta immune innata: è generalmente associata a sintomi lievi. Durante la seconda si verifica una risposta immune adattativa che può comportare un incremento delle citochine circolanti e danno tissutale. E' stato osservato che, in circa il 20% dei pazienti COVID-19 positivi, l'infezione progredisce verso la sindrome da distress respiratorio acuto o ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) inducendo una risposta citochinica abnorme, la cosiddetta "tempesta citochinica" (Picchianti Diamanti et al, 2020). Pertanto, l'evoluzione dell'infezione da SARS-CoV-2 assomiglia molto alla sindrome da rilascio di citochine (CRS, *cytokine release syndrome*). Inoltre, sia in caso di CRS che di pazienti COVID-19 positivi si osservano elevati livelli di differenti chemochine e mediatori infiammatori, così come l'interleuchina-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ) e il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è la capacità di distinguere le strutture *self*, endogene o esogene, che non costituiscono un pericolo e che possono, o vanno preservate da quelle non-*self* che devono invece essere eliminate. Pertanto, se il sistema immunitario funziona correttamente reagisce contro le molecole estranee all'organismo ritenute in grado di danneggiarlo: ad esempio quelle associate a virus, batteri e parassiti mentre le strutture che costituiscono l'organismo sono riconosciute come *self* dalle cellule del sistema immunitario e, come tali, non vengono aggredite e sono tollerate. Quando però il sistema immunitario fallisce e non riconosce come *self* le proprie componenti, può produrre anticorpi diretti contro cellule, tessuti o organi dell'organismo stesso, gli **autoanticorpi**, provocando così un'inflammazione che porta alla malattia autoimmune vera e propria (*Betterle et al, 2009*).

I **virus** sono noti per essere tra i più comuni fattori esogeni capaci di scatenare una **risposta autoimmune** (*Pesce et al, 2009*). Alcuni virus causano un'attivazione diffusa, non specifica, dei linfociti B inducendoli a produrre vari autoanticorpi; altri attivano i linfociti T determinando la produzione di particolari sostanze chiamate citochine. Anche se non è ancora stata individuata alcuna relazione stabile di causa ed effetto tra una determinata infezione e una specifica patologia autoimmune, numerosi dati circostanziali depongono per una possibile relazione. Ad esempio, EBV e parvovirus B19 con la tiroidite di Hashimoto (*Tomer et al, 1993*), HTLV-1 e HVF (*Human Foamy Virus*) con il morbo di Graves (*Rueda FL et al, 1999*) e l'Herpes Simplex con la *postinfectious autoimmune encephalitis* (*Jeffrey et al, 2018*).

Fino ad alcuni mesi fa non c'era una chiara evidenza che supportava l'ipotesi tra autoimmunità e COVID-19. Ad oggi, soltanto pochi studi

hanno dimostrato la presenza di autoanticorpi nei pazienti affetti da SARS-CoV-2. Zhang e collaboratori hanno descritto che i pazienti COVID-19 positivi affetti da coagulopatie e trombosi, erano positivi per gli anticorpi anti-Cardiolopina IgA e gli anticorpi anti- β 2-Glicoproteine IgA e IgG (Zhang *et al*, 2020). In questo lavoro, gli autori sostengono fermamente che gli anticorpi antifosfolipidi potrebbero essere la causa degli eventi trombotici. Successivamente Vlachoyiannopoulos *et al.* hanno analizzato 29 pazienti greci ed hanno trovato che quasi il 70% di loro aveva sviluppato un'attivazione della risposta autoimmune come conseguenza dell'infezione da SARS-CoV-2 (Vlachoyiannopoulos *et al*, 2020). Si ritiene che siano necessarie ulteriori indagini per definire chiaramente la possibile interazione tra l'insorgere della malattia autoimmune e l'infezione da SARS-CoV-2.

Questo studio, pertanto, si pone l'obiettivo di chiarire se SARS-CoV-2 è in grado di scatenare una risposta autoimmune.

2. MATERIALI E METODI

Approvazione Comitato Etico

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera "S.S. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria.

Popolazione di studio

Tra il 17 marzo e il 6 aprile del 2020 sono stati arruolati 40 pazienti (28 uomini e 12 donne adulti), di età compresa tra i 20 e i 97 anni ricoverati presso il nostro ospedale. Tutti i pazienti erano positivi per SARS-CoV-2. La presenza dell'infezione è stata confermata dalla positività al test rRT-PCR

su tampone naso faringeo. Come gruppo di controllo sono stati selezionati 40 donatori di sangue che avevano dichiarato l'esclusione di eventuali malattie autoimmuni accertate in precedenza.

Esami di laboratorio

Esami ematochimici

Il numero di linfociti è stato determinato mediante il sistema di **citofluorimetria** (Advia 2120i, Siemens).

Creatinina (mg/dL), Lattato dehydrogenase (LDH, U/L), Proteina C reattiva (PCR, mg/dL), complemento 3 (C3, mg/dL) e complemento 4 (C4, mg/dL) sono stati misurati con uno spettrofotometro/immunospettrometro completamente automatizzato (Advia XPT analyzer, Siemens).

La ferritina (ng/mL) e il marcatore di infiammazione interleuchina-6 (IL-6, mg/dL) sono stati dosati con il sistema immunoassay Siemens (Ferritina: Centaur XPT; IL6: Immulite 2000 XPI).

Tests di autoimmunità

Gli anticorpi antifosfolipidi (anti-cardiolipina, anti- β 2-glicoproteina IgA e IgG) sono stati analizzati utilizzando il test di **chemiluminescenza** (ACL AcuStar, Instrumentation Laboratory). Valori superiori a 20 U/mL erano considerati positivi. Anticorpi Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA IgA and IgG), proteine mieloperoxidasi (MPO), proteinasi 3 (PR3), pannello per le malattie connettivali [CTD Screen: human recombinant U1RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, centromero B, Scl-70, Jo-1, fibrillarina, RNA Pol III, Rib-P, PM-Scl, PCNA, Mi-2 proteine, Sm proteine e DNA nativo purificato] sono stati

analizzati mediante la *Metodica Fluorescent Enzyme Immuno Assay* (FEIA) (Phadia 250-Thermoscientific).

Gli Anticorpi anti-citoplasma dei neutofili (ANCA) e gli anticorpi anti-nucleo (ANA) sono stati individuati mediante l'*immunofluorescenza indiretta* (IIF) usando i kit EUROIMMUN. Gli ANCA sono stati valutati ad una diluizione di 1:20, gli ANA analizzati attraverso tre diluizioni seriali (1:80; 1:160; 1:320). I test di conferma sono stati eseguiti con la tecnologia *line-blot* secondo le istruzioni dell'azienda fornitrice (EUROIMMUN). Questi test sono specifici per i seguenti antigeni EUROLINE Myositis: anticorpi anti: Mi-2 alpha, Mi-2 beta, TIF1g, MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl100, PM-Scl75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-2, EJ, OJ, Ro-52. EUROLINE Scleroderma: anticorpi anti: Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, Rp155, fibrillarina, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52.

Analisi statistica

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base all'età (<60 anni e ≥ 60 anni). I valori sono indicati come media +/- la deviazione standard (SD). I dati sono stati analizzati mediante Excel (Excel versione 2009, Microsoft Office Professional 2016), le differenti categorie sono state confrontate mediante il test del χ^2 .

RISULTATI

Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti COVID-19

Le caratteristiche dei 40 pazienti COVID-19 sintomatici e ospedalizzati sono riassunte nella tabella 1. L'età media dei pazienti era 66.8 anni (SD: 17.46) (range 20-97 anni). I pazienti erano 28 uomini (70%) e 12 donne (30%). Undici pazienti (27,5%) sono deceduti a causa dell'infezione da SARS-CoV-2. 30 pazienti (75%), in particolare tutti i 12 con un'età inferiore ai 60 anni, presentavano febbre al momento del ricovero. I più comuni sintomi clinici erano **tosse secca** (57.5%) e **dispnea** (60%); nessuno di loro presentava nausea o vomito e soltanto il 7.5% aveva diarrea. 7 pazienti (17.5%) avevano almeno una patologia concomitante, ma nessuno aveva una storia clinica di pregressa malattia autoimmune.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti COVID-19

	Caratteristiche	Tutti i pazienti(40)	<60 anni (13)	≥60 anni (27)
demografiche	Età, anni (+/- SD) (min-max)	1766.8 (+/- .46); 20-97	46.92 (+/- 12.3); 20-59	76.37 (+/- 9.74); 60-97
	Sesso			
	M	28/40 (70%)	9/13 (69.23%)	19/27 (70%)
	F	12/40 (30%)	4/13 (30.77%)	8/27 (29.63%)
	Vivi	29/40 (72.50%)	12/13 (92.31%)	17/27 (62.96%)
sintomi	Febbre	30/40 (75%)	12/13 (92.31%)	18/27 (66.67%)
	Brividi	nessuno	nessuno	nessuno
	Tosse secca	23/40 (57.50%)	8/13 (61.54%)	15/27 (55.56%)
	Tosse con catarro	nessuno	nessuno	nessuno
	Congiuntivite	nessuno	nessuno	nessuno
	Rinorrea	nessuno	nessuno	nessuno
	Mal di testa	nessuno	nessuno	nessuno
	Dolori muscolari	2/40 (5%)	2/13 (15.38%)	nessuno
	astenia	2/40 (5%)	nessuno	2/27 (7.41%)
	Nausea	nessuno	nessuno	nessuno
	Vomito	nessuno	nessuno	nessuno
	Diarrea	3/40 (7.50%)	1/13 (7.69%)	2/27 (7.41%)
	Dispnea	24/40 (60%)	6/13 (46.15%)	18/27 (66.67%)
	Emottisi	nessuno	nessuno	nessuno
	Ematemesi	nessuno	nessuno	nessuno
	Ageusia	2/40 (5%)	2/13 (15.38%)	nessuno
	Anosmia	1/40 (2.50%)	1/13 (7.69%)	nessuno
	Altri sintomi	4/40 (10%)	2/13 (15.38%)	2/27 (7.41%)
Patologie concomitanti	Altre patologie al ricovero	7/40 (17.50%)	5/13 (38.46%)	2/27 (7.41%)
	BPCO	3/40 (7.50%)	nessuno	3/27 (11.11%)
	Diabete	7/40 (17.50%)	nessuno	7/27 (25.93%)
	Ipertensione arteriosa	24/40 (60%)	3/13 (23.08%)	21/27 (77.78%)
	Malattia coronarica	4/40 (10%)	nessuno	4/27 (14.81%)
	Malattie cerebrovascolari	1/40 (2.50%)	nessuno	1/27 (3.70%)
	Infezione da epatite B	nessuno	nessuno	nessuno
	Cancro (negli ultimi 5anni)	4/40 (10%)	1/13 (7.69%)	3/27 (11.11%)
	Malattia renale cronica	6/40 (15%)	nessuno	6/27 (22.22%)
	Immunodeficienza	1/40 (2.50%)	1/13 (7.69%)	nessuno

Cardiopatía ischemica	7/40 (17.50%)	nessuno	7/27 (22.22%)
Ictus	2/40 (10%)	nessuno	2/27 (7.41%)
Demenza	1/40 (2.50%)	nessuno	1/27 (3.70%)
Epatopatía cronica	nessuno	nessuno	nessuno
Infezione da HIV	nessuno	nessuno	nessuno
Fibrillazione atriale	5/40 (12.50%)	nessuno	5/27 (18.52%)
Trombosi Venosa Profonda (TVP)	nessuno	nessuno	nessuno
Embolia Polmonare (EP)	nessuno	nessuno	nessuno
Altre patologie	17/40 (42.50%)	3/13 (23.08%)	14/27 (51.85%)

Caratteristiche radiologiche dei pazienti affetti da SARS-CoV-2

COVID-19 colpisce prevalentemente il sistema respiratorio ed in particolare i polmoni. Le indagini radiologiche sono state necessarie in 36 pazienti (90%). Le caratteristiche cliniche specifiche osservate erano: ombreggiature irregolari (5%), **anomalie interstiziali** (17.5%) e addensamenti polmonari (10%). Nessuno dei pazienti mostrava un'opacità a vetro smerigliato. Per 4 pazienti non è stato necessario eseguire un Rx del torace (tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche radiologiche dei pazienti COVID-19.

	Pazienti valutati (36)	<60 anni (11)	≥60 anni (25)
Rx Torace	36/40 (9_0%)	11/36 (84.61)	25/36 (92.59)
Opacità da vetro smerigliato	Nessuno	Nessuno	Nessuno
Ombreggiatura irregolare	2/36 (5%)	Nessuno	2/25 (7.69%)
Anomalie interstiziali	7/36 (17.5%)	Nessuno	7/25 (26.92%)
Addensamenti polmonari	4/36 (10%)	2/11 (15.38%)	2/25 (7.69%)

Profilo infiammatorio dei pazienti COVID-19

L'infezione da SARS-CoV-2, come tutte le infezioni virali porta ad una significativa **risposta infiammatoria**. Sono stati valutati i più comuni marcatori di infiammazione: LDH, ferritina, PCR, C3, C4, IL-6.

I valori di laboratorio sono riportati nelle tabelle 3 e 4. La tabella 3 mette in evidenza il numero dei pazienti aventi valori al di fuori del range di riferimento. Abbiamo osservato che in circa il 70% dei pazienti questi marcatori erano aumentati. Il numero dei linfociti era al di sotto del valore minimo di riferimento nel 57.5% dei pazienti. La PCR era 12 volte più alta, se confrontata con il valore massimo di riferimento, nel 92,5% dei casi mentre l'IL-6 10 volte più alta nell'85% dei pazienti considerati. Per determinare se l'età potesse influenzare l'analisi dei marcatori infiammatori noi abbiamo suddiviso i pazienti in due classi (<60anni e ≥ 60 anni). L'analisi statistica mostrava che i pazienti con un'età ≥ 60 anni

avevano LDH (715.58 ± 284.31 U/L), ferritina (1099.61 ± 1011.24 ng/ml), numero di linfociti (LN) (85.23 ± 123.29), creatinina (85.23 ± 123.29), PCR (9.21 ± 6.52 mg/dl) e IL-6 (85.23 ± 123.29 mg/dl) aumentata rispetto ai pazienti più giovani (<60anni) (LDH: 645.36 ± 202.72 ; ferritina: 889.90 ± 591.65 ; creatinina: 0.77 ± 0.15 ; PCR: 7.59 ± 10.87 ; LN: 1.00 ± 0.43). Di contro, i soggetti più giovani mostravano un valore di C3 (158.07 ± 31.86 mg/dl) più alto se confrontato con il gruppo dei pazienti più anziani (C3: 138.23 ± 37.75). C4 sembra non dipendere dall'età, dal momento che il suo valore è simile in entrambi i gruppi (>60anni: 37.35 ± 13.79 ; o ≥ 60 anni: 37.42 ± 13.22). Se si considera l'età come fattore critico discriminante, soltanto due parametri mostravano una significatività statistica ed erano C3 (t-Test $p = 0.02$) e IL-6 (Mann Whitney p value = 0.02). Questi risultati mettono in evidenza come il **sistema immunitario possa reagire tempestivamente contro il virus COVID-19** e il ruolo chiave dell' IL-6 durante il processo di infiammazione causato da SARS-CoV-2.

Tabella 3. Percentuale dei pazienti COVID-19 con esami di laboratorio fuori range

Test di laboratorio	Range di riferimento	Tutti i pazienti	<60 anni	≥60 anni
LDH	230-500 U/L	30/40 (75%)	64.28%	80.77%
Ferritina	10-291ng/ml	32/40 (80%)	7.86%	80.77%
Numero di linfociti	0.9-5,2 x1000/mcl	23/40 (57.50%)	35.71%	73.08%
Creatinina	0.4-1 mg/dl	16/40 (40%)	7.14%	57.69%
PCR	0-0.8 mg/dl	37/40 (92.50%)	8.57%	96.15%
C3	82-160 mg/dl	12/40 (30%)	42.86%	23.07%
C4	12-36 mg/dl	21/40 (52.50%)	50%	53.85%
IL-6	0-5.9 mg/dl	34/40 (85%)	71.43%	92.31%

Tabella 4. Range dei valori dei test di laboratorio riscontrati nei pazienti COVID-19

Test di laboratorio	Range di riferimento	Tutti i pazienti	<60 anni	≥ 60 anni	p value
LDH	230-500 U/L	690.03±259.18	645.36±202.72	715.58±284.31	0.31 (T-test)
Ferritina	10-291 ng/ml	1005.29±892.4	889.90±591.65	1099.61±1011.2	0.26 (T-test)
Numero di linfociti	0.9-5.2 x1000/mcl	3.80±13.80	1.00±0.43	5.31±17.17	0.67 (M-W)
Creatinina	0.4-1 mg/dl	1.13±0.76	0.77±0.15	1.32±0.89	0.69 (M-W)
PCR	0-0.8 mg/dl	10.33±12.78	7.59±10.87	9.21±6.52	0.21 (T-test)
C 3	82-160 mg/dl	145.38±36.45	158.07±31.86	138.23±37.75	0.02 (T-test)*
C4	12-36 mg/dl	37.35±13.37	37.35±13.79	37.42±13.22	0.40 (T-test)
IL-6	0-5.9 mg/dl	58.59±102.92	11.99±11.01	85.23±123.29	0.02 (M-W)*

Marcatore immunologici

Nei 40 pazienti COVID-19 arruolati, sono stati analizzati gli autoanticorpi per determinare il coinvolgimento e la correlazione tra autoimmunità e COVID-19.

La tabella 5 elenca gli autoanticorpi analizzati nei pazienti affetti da SARS-CoV-2 e nei donatori. Abbiamo considerato i più comuni autoanticorpi associati con l'infiammazione come gli ANA, l'anti-cardiolipina, le anti-β2 glicoproteine, gli ENA, gli anti-PR3, gli anti-MPO, gli ANCA e gli ASCA (IgA and IgG).

Sebbene sia comune identificare, anche nella popolazione sana, diversi tipi di autoanticorpi, i pazienti da noi considerati non avevano riportato in anamnesi patologie autoimmuni.

La nostra analisi ha mostrato che i pazienti erano positivi per gli ANA (57%), ASCA (IgA: 25%; IgG: 18%), anti-Cardiolipina (12.5%). Anticorpi anti β 2-Glicoproteine (5%), anti-ENA (2.5%) e anti-PR3 (2.5%) erano presenti in meno del 5% dei pazienti. Inoltre, il 25% dei soggetti presentava anticorpi anti-ANCA. In particolare, un paziente presentava un *pattern* c-ANCA (anticorpi anti- PR3 positivi), mentre gli altri 9 un *pattern* X-ANCA (22,50%). Basandoci sui nostri risultati, i pazienti COVID-19 avevano una significativa prevalenza di ANA, ANCA ed ASCA IgA se confrontati con la popolazione sana (ANA: 12.5%; ASCA IgA: 2.5%; ANCA: 3%;) (p value<0.01). Anticorpi anti-MPO non sono stati riscontrati in nessuno dei pazienti e nella popolazione sana considerata nello studio. I campioni con un *pattern* fluoroscopico positivo sono stati analizzati anche un metodica di secondo livello (Immunoblot). In un paziente abbiamo riscontrato la presenza di autoanticorpi specifici diretti contro gli antigeni PM-Scl100 e Ro52. Inoltre, abbiamo anche valutato i pazienti COVID-19 considerando solo quelli che avevano un titolo di ANA superiore a 1:160. I risultati hanno confermato una significativa prevalenza degli ANA nei pazienti COVID-19 rispetto alla popolazione sana ($p=0,0032$).

Questi risultati evidenziano chiaramente che esiste un **legame tra COVID-19 e autoimmunità**: gli autoanticorpi ANA, ANCA, ASCA potrebbero svilupparsi in seguito a questa infezione virale.

Tabella 5. Elenco degli autoanticorpi riscontrati nei pazienti COVID-19 e negli individui sani

Autoanticorpi	Tutti i pazienti (40)		Individui sani (40)		χ ² (con la correzione Yates) p value
	pos	neg	pos	neg	
ANA	23 (57.50%)	17 (42.50%)	5 (12.50%)	35 (87.50%)	0.0001*
Anti Cardiolipina	5 (12.50%)	35 (87.50%)	5 (12.50%)	35 (87.50%)	0.7353
Anti β2- Glicoproteine	2 (5%)	38 (95%)	1 (2.50%)	39 (97.50%)	1.0000
ENA	1 (2.5%)	39 (97.50%)	0 (0%)	40 (100%)	nv
Anti-PR3	1 (2.5%)	39 (97.50%)	0 (0%)	40 (100%)	nv
Anti-MPO	0 (0%)	40 (100%)	0 (0%)	40 (100%)	nv
ANCA	10 (25%)	30 (75%)	1 (2.50%)	39 (97.50%)	0.0094*
ASCA IgA	10 (25%)	30 (75%)	1 (2.50%)	39 (97.50%)	0.0094*
ASCA IgG	7 (17.5%)	33 (82.50%)	1 (2.50%)	39 (97.40%)	0.0624

DISCUSSIONE

A oggi, l'infezione da SARS-CoV-2 rappresenta la peggior pandemia globale e gli sforzi a livello mondiale sono volti a trovare una possibile cura. E' noto che SARS-CoV-2 è in grado di scatenare una forte e dannosa risposta immune in alcuni pazienti (Catanzaro M et al, 2020); comunque il suo specifico meccanismo d'azione patogeno non è ancora completamente noto.

Differenti studi hanno mostrato che l'infezione da SARS-CoV-2 determina una maggiore produzione di **citochine infiammatorie** (Infantino M et al, 2020; Tufan A et al, 2020). In particolare, è stato osservato che la risposta immunitaria potrebbe, da un lato essere di aiuto per combattere il virus, ma dall'altro aumentare il rilascio di chemochine infiammatorie che potrebbero così condurre al processo noto come "tempesta infiammatoria", andando a peggiorare le condizioni già critiche dei pazienti (Hu et al, 2020; Channapanavar R et al, 2017). I pazienti COVID-19, considerati in questo studio, presentavano elevati livelli dei classici marcatori infiammatori. Inoltre, i pazienti con valori di interleuchina-6 fuori range, hanno avuto un peggiore andamento clinico. I nostri dati sostengono l'idea che alti livelli di IL-6 potrebbero essere un utile indicatore diagnostico per identificare i soggetti con una prognosi sfavorevole (Garcia LF 2020).

Ad oggi, non ci sono chiare evidenze che stabiliscano se l'infezione da SARS-CoV-2 sia in grado di attivare una risposta immune.

Uno studio recente ha descritto le caratteristiche autoimmuni di 21 pazienti COVID-19. In questo lavoro, gli autori hanno trovato che nei pazienti COVID-19 c'era una prevalenza di anti-52kDa SSA/ro, anti-60 kDa SSA/ro e anticorpi anti-ANA (20%, 25% e 50%) rispettivamente,

concludendo che il meccanismo autoimmune è presente nei pazienti COVID-19 (Zhou Y *et al.*, 2020). A giugno 2020 un'altra coorte di 29 pazienti è stata analizzata, portando alla conclusione che la presenza di fenomeni autoimmuni possono essere presenti dopo l'infezione da SARS-CoV-2 (Vlachoyiannopoulos PG *et al.*, 2020). In accordo con la letteratura, i nostri dati sostengono che non solo l'infiammazione, ma anche l'autoimmunità è probabilmente scatenata da questa infezione virale. Nella nostra popolazione di studio, c'era una significativa prevalenza di ANA, ANCA e ASCA IgA rispetto alla popolazione sana. Gli ANA sono un importante marcatore per la diagnosi di diverse malattie autoimmuni, principalmente per le malattie reumatiche ANA-associate (AARD). Comunque gli ANA devono essere valutati in associazione con la clinica perché, anche negli individui sani, è possibile riscontrare la presenza di questi anticorpi (il 25% della popolazione sana presenta anticorpi ANA) (Im Jh *et al.*, 2019; Grygiel-Gòrniak B *et al.*, 2018; Suwanchote S *et al.*, 2018). 23 dei pazienti arruolati (57,50%), presentavano un *pattern* ANA positivo; più di due volte rispetto alla percentuale riscontrata negli individui sani. Questa percentuale raggiunge l'81,81% (9/11) quando vengono considerati anche i pazienti deceduti. Tutti i pazienti COVID-19 analizzati non avevano precedenti di malattie autoimmuni. Sulla base di questi risultati si può ipotizzare che la positività per gli ANA potrebbe essere correlata con una degenza in reparti a media ed alta terapia intensiva e con un *outcome* fatale. Il 25% dei pazienti era positivo per gli ANCA, i biomarcatori per le vasculiti ANCA-associate. I *pattern* atipici (X-ANCA) possono essere riscontrati anche in altre condizioni, come ad esempio nelle malattie del tratto gastro intestinale (Eser *et al.*, 2012). Nel nostro studio 9 pazienti (22,5%) erano X-ANCA positivi, il 50% di questi pazienti sono deceduti mentre i

restanti hanno avuto una lunga degenza. In particolare due pazienti sono stati ricoverati presso la terapia intensiva e sono stati intubati, un paziente è stato per un lungo periodo in terapia semi intensiva e sottoposto ad una ventilazione meccanica. I dati clinici, insieme ai nostri dati di laboratorio, supportano fortemente l'ipotesi che potrebbe esserci un'associazione tra la presenza di X-ANCA e una malattia respiratoria più severa nei pazienti COVID-19. Perciò basandoci sui nostri risultati, possiamo affermare che i pazienti COVID-19 che presentavano un *pattern* positivo per gli ANA (39,13%) e ANCA (40%) avevano un decorso clinico peggiore, talvolta fatale.

Il 25% dei pazienti presentava anticorpi anti-ASCA di classe IgA, mentre il 17,5% anticorpi anti-ASCA di classe IgG. Gli isotipi IgA o IgG ASCA sono normalmente correlati con le malattie infiammatorie dell'intestino. Inoltre sono stati riscontrati nel siero di 60-70% di pazienti affetti da morbo di Chron (*Eser et al 2012*). Nel nostro studio soltanto un paziente era positivo per gli ASCA e aveva i tipici sintomi gastrointestinali (diarrea). Pare quindi non esserci nessuna correlazione tra la presenza di autoanticorpi e fenotipo clinico. Questo risultato troverebbe una spiegazione nel numero di pazienti COVID-19 analizzati, che potrebbe avere causato un *bias* nella popolazione. Bisogna, inoltre considerare, che i pazienti ricoverati avevano gravi problemi respiratori. Di contro, i pazienti con sintomi gastrointestinali e moderata insufficienza respiratoria venivano trattati a domicilio e, pertanto non sono stati valutati.

In letteratura, nei pazienti COVID-19 viene descritta la presenza di ANA, ANCA e ASCA; recentemente, Zang e colleghi, hanno anche osservato in tre pazienti malati, con coagulopatia e trombocitopenia, la presenza di anticorpi anti-Cardiolipina IgA e anti- β 2-Glicoproteine IgA e IgG

(Zhang Y et al, 2020). La presenza di anticorpi antifosfolipidi è importante per la diagnosi della sindrome da antifosfolipi (Uthman IW et al, 2002). Nei pazienti arruolati presso il nostro centro abbiamo individuato la presenza di anticorpi antifosfolipidi anche se con una bassa incidenza. In particolare 5 pazienti (12.5%) erano positivi per anticorpi anticardiolipina e due (5%) per anti- β 2-Glicoproteine. Non è stata osservata nessuna differenza significativa confrontando i malati con la popolazione sana. Sulla base dei dati presenti in letteratura e su quelli da noi raccolti si può ipotizzare che l'aumento degli eventi tromboembolici, che normalmente si manifesta nei pazienti COVID-19, potrebbe non essere influenzato dalla presenza di anticorpi antifosfolipidi ma dipendere da altri fattori.

I risultati ottenuti in questo studio sostengono fermamente l'idea che l'infezione da SARS-CoV-2 sia in grado di determinare un meccanismo autoimmune con lo sviluppo di ANA, ASCA e ANCA. È degno di nota che uno dei nostri 40 pazienti ha avuto un particolare decorso clinico. All'inizio del ricovero gli esami di autoimmunità avevano dato esito negativo. Tuttavia, le sue condizioni cliniche erano particolarmente critiche: presentava infatti, un'insufficienza polmonare severa e una disfunzione renale. Considerato che dopo un mese di degenza nessun miglioramento fu osservato, si è deciso di ripetere i tests di autoimmunità. Durante questa seconda valutazione abbiamo riscontrato una forte positività per gli ANA (*pattern* citoplasmatico 1:160, centrioli 1:320, granulare 1:160). Il blot delle miositi era positivo per gli antigeni M2beta e Ku (Sacchi MC et al., in corso di pubblicazione). Recentemente, è stato da noi pubblicato un caso di insorgenza di *Lupus Eritematosus Sistemico* indotto da COVID-10 (Bonometti R et al., 2020). Questo caso clinico sottolinea l'importanza di tener presente il ruolo che l'autoimmunità può avere nei pazienti COVID-19. Riflettendo su questi

casi clinici proprio la risposta autoimmune potrebbe spiegare, in alcuni casi, la mancanza di un miglioramento clinico anche dopo la risoluzione dell'infezione virale.

CONCLUSIONI

Questo studio mostra che la maggior parte dei pazienti COVID-19 arruolati hanno un'alterazione del profilo autoimmune. I nostri dati sostengono che l'autoimmunità potrebbe essere indotta da SARS-CoV-2, dal momento che nessuno dei pazienti aveva una precedente patologia autoimmune, e questo è in accordo con gli studi, recentemente, descritti in letteratura (*Vlachoyiannopoulos PG et al, 2020*).

I dati relativi ai pazienti con un profilo clinico medio-severo suggeriscono chiaramente che potrebbe esserci una correlazione tra la risposta a SARS-CoV-2 e quella specifica autoimmune individuale. Anche se la considerazione fatta è preliminare e lo studio è monocentrico, le nostre ricerche iniziano a dimostrare l'esistenza di un legame tra COVID-19 e autoimmunità. Saranno necessari ulteriori studi, per verificare se la risposta autoimmune nei pazienti COVID-19 cambia in base alle varie fasi della malattia, confermando la correlazione clinico-laboratorio. Per questo motivo abbiamo iniziato uno studio osservazionale di *follow-up* a 3 e 6 mesi dopo il ricovero, approvato dal Comitato Etico Interaziendale per verificare se i cambiamenti immunologici che abbiamo osservato nella nostra popolazione sono solo transitori, o se l'alterazione potrebbe persistere più a lungo e portare a malattie autoimmuni croniche. In aggiunta questo studio di *follow-up* consentirà la valutazione dei possibili effetti derivati dalla terapia utilizzata.

In conclusione questo studio mostra, nonostante la limitazione della dimensione del campione, che SARS-CoV-2 può essere in grado di causare un'alterazione del sistema autoimmunitario. Inoltre i nostri risultati potrebbero aiutare i medici a capire perché i farmaci normalmente utilizzati per trattare le malattie autoimmunitarie possono anche essere utili per il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFIA

- Angileri F et al. "Molecular mimicry may explain multi-organ damage in COVID-19" *Autoimmun Rev.* 19(8), 102591 (2020).
- Betterle C et al. "Classificazione e fisiopatologia delle malattie autoimmuni organo-specifiche. Il Laboratorio nelle malattie autoimmuni d'organo" (eds. Tozzoli, R., Bizzaro, N., Villalta, D., Tonutti, E., Pinchera., A.) 1-13 (2009).
- Bonometti R et al. "The first case of systemic lupus erythematosus (SLE) trigger by COVID19 infection" *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* Article in press.
- Catanzaro, M., et al. "Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2". *Sig Transduct Target Ther.* 5, 84 (2020).
- Channappanavar R et al. "Pathogenic Human Coronavirus Infections: Causes and Consequences of Cytokine Storm and Immunopathology" *Semin Immunopathol.* 39(5):529-539 (2017).
- Eser A et al. "The impact of intestinal resection on serum levels of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in patients with Crohn's disease" *Aliment Pharmacol Ther.* 35: 292–299 (2012).
- García LF. "Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19" *Front Immunol.* 11:1441. (2020).
- Grygiel-Górniak B et al. "Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases diagnostic and clinical implications" *Reumatologia* 56: 243–248 (2018).
- Hu B. et al. "The Cytokine Storm and COVID-19" *J Med Virol.* 10.1002 (2020).
- Im JH. et al. "Antinuclear antibodies in infectious diseases" *Infectious Diseases.* 0, 1–9 (2019).

- Infantino M. et al. "Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives" *Imaj.* 22, 203-210 (2020).
- Jeffrey MG et al. "Autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: insights into pathogenesis" *The Lancet. Neurology.* 17,9 (2018)
- Pesce G et al. "Epidemiologia delle malattie autoimmuni organo-specifiche" *Il Laboratorio nelle malattie autoimmuni d'organo* (eds, Tozzoli,R., Bizzaro, N., Villalta, D., Tonutti,E.) 14-36 (2009).
- Picchianti Diamanti A. et al. "Cytokine release syndrome in COVID-19 patients, a new scenario for old concern: the fragile balance between infection and autoimmunity" *Int J Mol Sci.* 21(9),3330 (2020).
- Rueda FL et al. "Atypical thyroiditis in Huelva, Spain" *Endocr Pract.* 5,109-113 (1999).
- Shimabukuro-Vornhagen A et al. "Cytokine release syndrome" *J Immunother Cancer.* 6 (1):56 (2018)
- Suwanchote S et al. "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance" *Clinical Rheumatology.* 37, 875–884 (2018).
- Tomer Y et al. "Infection, thyroid disease, and autoimmunity" *Endocr Rev.* 14, 107-120 (1993).
- Tufan A et al. "COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs" *Turk J Med Sci.* 50(SI-1), 620-632 (2020).
- Uthman IW et al. "Viral infection and antiphospholipid antibodies" *Semin Arthritis Rheum.* 31(4),256-263 (2002).

- Vlachoyiannopoulos PG et al. "Autoantibodies related to systemic autoimmune rheumatic diseases in severely ill patients with COVID-19" *Annals of the Rheumatic Diseases*. 0,1–3 (2020)
- Young, BE. et al. "Epidemiologic features and clinical course of patients infected with SARS-Cov2 in Singapore" *Jama*. 323(15),1488-1494 (2020).
- Zhang Y et al. "Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with Covid-19" *N Engl J Med*. 382, e38 (2020).
- Zhou, Y et al. "Clinical and autoimmune characteristics of severe and clinical cases of COVID-19" *Clin Transl Sci*. 21,10.1111 (2020).

 **irfi** | infrastruttura ricerca
formazione innovazione
Azienda Ospedaliera di Alessandria

pubblicazione
revisionata e
approvata
novembre 2020

disponibile online
[www.ospedale.al.it/
working-papers-wp](http://www.ospedale.al.it/working-papers-wp)