

**n.8**  
**2021**

# 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.08  
2021

titolo

**AUTOIMMUNITÀ E COVID-19:  
UNO STUDIO PROSPETTICO MONOCENTRICO  
DI FOLLOW-UP**

title

**COVID-19 AND AUTOIMMUNITY: A SINGLE  
CENTER PROSPECTIVE FOLLOW-UP STUDY**

autori

**Maria Cristina Sacchi<sup>1</sup>, Stefania Tamiazzo<sup>1</sup>, Ernesto Cristiano Lauritano<sup>2</sup>, Ramona Bonometti<sup>3</sup>, Paolo Stobbione<sup>4</sup>, Antonio Maconi<sup>5</sup>.**

*<sup>1</sup>SC Laboratorio Analisi, Settore di Autoimmunologia, AO SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria*

*<sup>2</sup>SS O.B.I. e Terapia Subintensiva, AO SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria*

*<sup>3</sup>Medicina Interna, Ospedale Santo Spirito, Casale Monferrato, Alessandria*

*<sup>4</sup>SSD Reumatologia, AO SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria*

*<sup>5</sup>SC Infrastruttura Ricerca Formazione Innovazione, AO SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria*

tipologia

**original article**

keywords

**COVID-19, malattie autoimmuni, SARS-Cov-2, prognosi, follow-up**

## ABSTRACT

**Obiettivi:** In un nostro recente studio abbiamo riportato la presenza *de novo* di autoanticorpi in pazienti con diagnosi di COVID-19 ospedalizzati. Per verificare se questi autoanticorpi permangono nel tempo e/o portano allo sviluppo di malattie autoimmuni, abbiamo condotto uno studio di follow-up a 3 (t3) e 6 (t6) mesi dal ricovero.

**Metodologia:** Tredici dei 40 pazienti arruolati nel precedente studio hanno dato il consenso a partecipare a questo nuovo protocollo. Ai pazienti sono stati eseguiti gli stessi tests di autoimmunità effettuati al momento della diagnosi.

**Risultati:** In 9 pazienti continuano a persistere autoanticorpi circolanti a 6 mesi dalla diagnosi. Una paziente, negativa al momento del ricovero per tutti i tests di autoimmunità, ha sviluppato una forte positività per gli ANA e gli antigeni Mi2- $\beta$  e Ku a t3 e a t6. Un altro paziente si è positivizzato a t3. Infine, due pazienti sono sempre rimasti negativi per tutto il periodo di monitoraggio.

**Conclusioni:** i nostri dati dimostrano che, dopo sei mesi, la presenza di autoanticorpi permane ancora nella maggior parte dei pazienti. Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di poter verificare se questi pazienti si negativizzeranno nel tempo o potranno sviluppare una sintomatologia clinica compatibile con l'insorgenza di una malattia autoimmune cronica. Inoltre, sarà importante capire, se l'alterazione del sistema autoimmune può essere considerata come uno degli effetti del coronavirus (*long Covid-19*).

## ABSTRACT

**Objectives:** In our recent study we reported the presence of autoantibodies in COVID-19 positive hospitalized patients. To verify whether these autoantibodies persisted over time and led to the development of chronic autoimmune diseases, we conducted a follow-up study at 3 (t3) and 6 (t6) months after admission.

**Methodology:** Thirteen of 40 patients enrolled in the previous study gave their consent to participate in this new protocol. The same autoimmunity tests performed at the time of diagnosis were carried out in these patients.

**Results:** In 9 patients, autoantibodies were still present at follow-up. Another one, negative at admission, developed strong positivity for ANA and Mi2- $\beta$  and Ku antigens at t3 and at t6. Only one showed the presence of *de novo* circulating autoantibodies at t3. Finally, we observed that two patients were always negative for the whole observation period.

**Conclusions:** Our data show that after 6 months, the autoantibodies are still present in the majority of our enrolled population. Further investigations will be necessary in order to verify whether these patients will become negative over time or may develop clinical symptoms coexistent with autoimmune disease. Finally, It will be important to understand whether an alteration of the autoimmune system can be considered effects of coronavirus (*long COVID-19*).

## INTRODUZIONE

La variante di beta-Coronavirus, denominata SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome-Corona Virus-2*) è stata isolata per la prima volta a Wuhan, alla fine del 2019, ed è l'agente responsabile della malattia respiratoria acuta denominata COVID-19 (*Corona Virus Disease-2019*). La gravità delle patologie derivanti dalle infezioni da coronavirus è molto variabile, dal momento che questi virus sono responsabili sia di alcune comuni **sindromi da raffreddamento** che di **sindromi respiratorie severe** come la SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e la MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) (*Du Toit, 2020; Rothan et al, 2020; Hu et al, 2020*). Nel caso dei pazienti COVID-19, la sintomatologia principale è quella tipica dell'influenza (febbre, tosse, stanchezza e dispnea) ma, in taluni casi, può evolvere in quadri clinici molto severi andando incontro alla sindrome da disfunzione multiorgano e portare anche alla morte (*Mokhtari et al, 2020; Gupta et al, 2020.; Ciaccio et al, 2020*). Si è osservato, inoltre, come l'evoluzione dell'infezione da SARS-CoV-2 risulti avere caratteristiche simili alla sindrome da rilascio di citochine (*Chen et al, 2020; Chen et al, 2021*).

Questi dati sono stati confermati in un nostro recente studio, in cui abbiamo osservato come l'aumento del valore di **marcatori infiammatori**, in particolar modo di interleuchina 6 (IL-6) possa essere considerato un criterio diagnostico affidabile per identificare soggetti con una prognosi peggiore (*Sacchi et al, 2021*).

Sebbene l'eziopatogenesi delle malattie autoimmuni sia molto complessa e i meccanismi sottostanti debbano ancora essere completamente descritti, è noto come diversi agenti infettivi, batterici, virali o fungini possano rappresentare un *trigger* per lo sviluppo di **malattie autoimmuni** (*Pesce et al, 2009*).

Recenti lavori hanno descritto la presenza di diversi tipi di autoanticorpi in pazienti con COVID-19 (*Zhang et al, 2020; Vlachoyiannopoulos et al, 2020; Pascolini et al, 2021; Liu et al, 2021*). In aggiunta, diversi studi suggeriscono una possibile associazione tra l'infezione da SARS-CoV-2 e lo sviluppo di alcune patologie autoimmuni come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) (*Bonometti et al, 2020*), la sindrome di Guillain-Barrè (*Soltani et al, 2019*), la sindrome di Miller

Fisher (*Truong et al, 2020*) la porpora trombocitopenica immune (*Molinaro et al, 2020*) e la malattia di Kawasaki (*Ehrenfelda et al, 2020*).

Tuttavia, ad oggi, i dati riportati sono ancora controversi; pertanto, al fine di poter comprendere se la presenza *de novo* di biomarcatori autoimmuni possa essere spiegata come un epifenomeno, una cross reazione, una patologia preesistente non diagnosticata o una nuova patologia autoimmune scatenata da COVID-19, risulta fondamentale eseguire studi di follow-up.

Durante la prima ondata della pandemia da SARS-CoV-2, abbiamo indagato l'assetto autoimmune di pazienti ricoverati con un quadro clinico severo, al fine di verificare una possibile correlazione tra **presenza autoanticorpale** e fenotipo clinico. Abbiamo così arruolato 40 pazienti tra i 20 e 97 anni (70% maschi e 30% femmine) che erano stati ricoverati nel reparto di medicina sub-intensiva. Nessuno di questi pazienti presentava anamnesi di patologia autoimmune o sintomatologia che potesse esserne correlata prima del ricovero. Di questi pazienti sono stati studiati i più comuni autoanticorpi ed è stato evidenziato una correlazione tra infezione da SARS-CoV-2 e lo sviluppo di alcuni autoanticorpi. In particolare, quelli statisticamente significativi sono risultati essere: anticorpi anti-nucleo (ANA), anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (X-ANCA) e anticorpi anti *Saccaromices cerevisiae* (ASCA IgA). Pertanto, nel nostro studio abbiamo messo in evidenza che potrebbe esserci una correlazione tra la risposta a SARS-CoV-2, la presenza di autoanticorpi e l'*outcome* clinico (*Sacchi et al, 2021*). Al fine di verificare se la presenza autoanticorpale fosse transitoria, perdurasse nel tempo ed eventualmente fosse correlata allo sviluppo di patologie autoimmuni, abbiamo eseguito uno **studio di follow-up** su 13 dei 40 pazienti inizialmente arruolati. I pazienti sono stati testati a t3 e t6 dall'ospedalizzazione per i medesimi autoanticorpi considerati al t0. Questo lavoro ci ha permesso di osservare che la maggior parte dei pazienti ha mantenuto dopo 6 mesi un profilo autoanticorpale alterato.

## MATERIALI E METODI

### Approvazione Comitato Etico

Questo studio osservazionale monocentrico prospettico è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria. Questa ricerca è stata condotta in accordo con i principi etici della Dichiarazione di Helsinki.

### Disegno dello studio

Sono stati arruolati per uno studio di follow-up 13 pazienti convalescenti COVID-19 già analizzati al t0 (Sacchi et al., 2021). I *time points* considerati sono stati t3 e t6. I pazienti avevano un'età compresa tra 20 e 77 anni ed erano 6 uomini e 7 donne. Tutti i pazienti che hanno aderito allo studio hanno firmato il consenso informato.

### Test di autoimmunità

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) e gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilii (ANCA) sono stati ricercati mediante l'immunofluorescenza indiretta (IIF) usando i kit EUROIMMUN. Gli ANA sono stati individuati attraverso tre diluizioni seriali (1:80; 1:160; 1:320). I test di conferma sono stati eseguiti con la tecnologia *line-blot* usando i kit: EUROLINE Myositis DL-1530-4G e EUROLINE Scleroderma DL-1532 G. EUROLINE Myositis è specifico per i seguenti antigeni: Mi-2 alpha, Mi-2 beta, TIF1g, MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Sci100, PM-Sci75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-2, EJ, OJ, Ro-52. EUROLINE Scleroderma include questi antigeni: Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, Rp155, fibrillarin, NOR90, Th/To, PM-Sci100, PM-Sci75, Ku, PDGFR, Ro-52. Soltanto le bande con una intensità di segnale in EUROLineScan maggiore di 11 sono state considerate positive, secondo le istruzioni dell'azienda produttrice (EUROIMMUN, Luebeck, Germany). Gli ANCA sono stati determinati ad una diluizione di 1:20. Gli anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA IgA e IgG), le proteine mieloperossidasi (MPO) e proteinasi 3 (PR3) sono stati analizzati mediante la metodica *fluorescent enzyme immunoassay* (FEIA) (Phadia 250-



Thermoscientific, Freiburg, Germany). Gli antigeni nucleari estraibili (ENA) sono stati analizzati con la stessa tecnologia FEIA, usando il pannello per le malattie connettivali CTD Screen (ENA screening): 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 protein, Sm protein and DNA nativo purificato). Gli anticorpi antifosfolipidi (anti-cardiolipina, anti- $\beta$ 2-glicoproteina IgA e IgG) sono stati analizzati usando il test di chemiluminescenza (ACL AcuStar, Instrumentation Laboratory, Bedford, USA). Valori superiori a 20 erano considerati positivi.

## RISULTATI

In un nostro precedente studio retrospettivo osservazionale (*Sacchi et al., 2021*) abbiamo analizzato 40 pazienti sia dal punto di vista infiammatorio che immunologico, evidenziando le alterazioni dei più comuni *markers* di flogosi e una prevalenza significativa di autoanticorpi ANA, ANCA, ASCA IgA (Figura 1). Tredici pazienti, arruolati nel precedente studio con un'età compresa tra i 20 e i 77 anni (media = 55,69 anni), sono stati analizzati a t3 e t6 mesi per gli stessi autoanticorpi considerati a t0. Nessuno è stato affetto, negli ultimi 5 anni, da una delle seguenti malattie: infezione da epatite B, cancro, immunodeficienza, malattie cardiache ischemiche, ictus, demenza, malattia epatica cronica, infezione da HIV, TVP, EP, malattia cerebrovascolare. Il tempo medio di ricovero in ospedale è stato di 22,54 giorni. Nove pazienti (P1, P2, P4, P6, P7, P8, P11, P12, P13) sono stati dimessi con un'importante insufficienza respiratoria da polmonite interstiziale bilaterale COVID-19 correlata. P11 e P13 presentavano una grave insufficienza respiratoria di tipo 1; P12 mostrava una trombocitopenia, molto probabilmente indotta da eparina; P5 presentava una porpora trombocitopenica immune (idiopatica); P10 era dimesso con la presenza di anomalie interstiziali (tabella supplementare 1).

**Tabella supplementare. Quadro clinico dei 13 pazienti osservati durante il follow-up**

	Età (anni)	Sesso	Patologie concomitanti al momento del ricovero	Durata degenza (giorni)	Diagnosi alla dimissione
P1	59	M	NO	10	Polmonite interstiziale COVID-19 correlata
P2	64	F	NO	22	Grave insufficienza respiratoria derivante dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19
P3	72	F	BPCO, diabete, malattia renale cronica, fibrillazione atriale, obesità, gammopatia monoclonale, scompenso cardiaco	26	n.d.
P4	53	F	Asma, emicrania, trombosi venosa	5	Grave insufficienza respiratoria derivante dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19
P5	20	F	NO	5	Porpora trombocitopenica immune
P6	67	F	ipertensione	15	Polmonite interstiziale COVID-19 correlata
P7	36	M	ipertensione	43	Grave insufficienza respiratoria derivante dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19
P8	59	F	ipertensione	17	Grave insufficienza respiratoria derivante dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19
P9	48	M	NO	42	Polmonite interstiziale COVID-19 correlata
P10	59	M	NO	52	Anomalie interstiziali
P11	77	F	ipertensione, precedente tumore al seno, glaucoma	16	Insufficienza respiratoria di tipo I derivata dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19
P12	55	M	Colica renale, neuroma C3-C4; discopatia lombare	22	Grave insufficienza respiratoria derivante dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19 e trombocitopenia
P13	63	M	asma	18	Insufficienza respiratoria di tipo I derivata dalla polmonite interstiziale bilaterale COVID-19

Da punto di vista dell'autoimmunità, 9 dei 13 pazienti (P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P12, P13) presentavano una positività per gli anticorpi ANA a t0 (Figura 2-A).

**Figura 2 A. anticorpi anti-nucleo (ANA)**

ID	t0 pattern	t3 pattern	t6 pattern
P1	-	-	-
P2	-	-	-
P3	-* (granulare 1:320; citoplasmatico 1:320)*	+ granulare 1:160; citoplasmatico 1:160; centrioli 1:320	+ centrioli 1:160; citoplasmatico 80
P4	+ granulare 1:160	+ omogeneo 1:80; granulare 1:80	+ omogeneo 1:80; granulare 1:80
P5	+ centrioli 1:160	+ centrioli 1:80	+ centrioli 1:80
P6	+ mid body 1:80; fuso mitotico 1:80	+ mid body 1:80	+ mid body 1:80; fuso mitotico 1:80
P7	+ citoplasmatico 1:80	-	-
P8	+ omogeneo 1:320	+ omogeneo 1:320	+ omogeneo 1:320
P9	+ citoplasmatico 1:80	-	-
P10	+ citoplasmatico 1:80	-	-
P11	-	+ omogeneo 1:320	n. d.
P12	+ citoplasmatico 1:80; granulare 1:160	+ citoplasmatico 1:80	-
P13	+ citoplasmatico 1:160	+ citoplasmatico 1:80	+ nucleolare 1:160; citoplasmatico 1:160

In totale, 6 pazienti (P3, P4, P5, P6, P8 e P13) mantenevano la positività durante il follow-up, sia a t3 che a t6. Un caso particolare è rappresentato dalla paziente P3, che risultava negativa a tutti i test autoimmuni a t0; dal momento che le sue condizioni cliniche non miglioravano e continuava a essere dipendente dall'ossigenazione artificiale, 16 giorni dopo il ricovero con un tampone molecolare nasofaringeo per SARS CoV-2 negativo, veniva rivalutato il suo profilo autoimmune: si riscontrava, così, una significativa positività per gli ANA, con un *pattern* fluoroscopico citoplasmatico e granulare (1:320). La stessa paziente, in

corrispondenza di t3, mostrava un quadro fluoroscopico misto: granulare (1:160), citoplasmatico (1:160), centrioli (1:320) mentre al t6 perdeva il *pattern* granulare. Inoltre, con la tecnica di secondo livello Immunoblot, eseguita sia a t3 che a t6, si confermava la presenza di autoanticorpi diretti contro gli antigeni Mi2- $\beta$  e Ku. P4 mostrava un quadro granulare (1:160) al t0 a cui si aggiungeva quello omogeneo (1:80) a t3 e t6. P5 ne mostrava invece uno centriolare (1:160) che è stato mantenuto al follow-up, mostrando sempre una positività per gli ENA (CTD screen). P6 era caratterizzata da un *pattern* misto mid-body e fuso mitotico che è stato mantenuto anche al follow-up. P8 aveva un *pattern* omogeneo (1:320). P13 mostrava a t0 un *pattern* citoplasmatico (1:160) che si è mantenuto a t3 (1:80) e t6 (1:160), *time points* in corrispondenza del quale compariva anche quello nucleolare (1:160).

Tre pazienti P7, P9, 10 con un quadro citoplasmatico a t0, si negativizzavano a t3 e t6. P12 era positivo solo a t0 con un quadro citoplasmatico-granulare (1:80) e a t3 con uno citoplasmatico (1:80). Solo P11 si è positivizzato a t3 sviluppando un quadro omogeneo; purtroppo non è stato possibile studiarlo a t6. Infine, P1 e P2, negativi a t0, sono rimasti tali anche durante il follow-up.

Per quanto riguarda gli altri autoanticorpi analizzati (Figura 2-B): P1 ha conservato la positività per gli ENA per tutto il periodo di osservazione; P9 e P10 mostravano gli autoanticorpi X-ANCA a t0; P10 presentava anche gli ASCA IgG in tutti e tre i *time points* (t0, t3, t6), mentre gli ASCA IgA, *borderline* a t0, si sono successivamente positivizzati a t3 e t6. P11 è risultato positivo per ASCA IgA e IgG solo a t0, mentre P12 ha sviluppato questi autoanticorpi durante il follow-up.

Nessuno dei 13 pazienti ha mostrato la presenza di: autoanticorpi anti fosfolipidi (anti- $\beta$ 2glicoproteina, anti-cardiolipina), anti PR3 e anti MPO (dati non mostrati).

Figura 2 B. Altri autoanticorpi

ID	ENA			X-ANCA			ASCA IgA			ASCA IgG		
	t0	t3	t6	t0	t3	t6	t0	t3	t6	t0	t3	t6
P1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	+	-	-	b.l.	+	+	+	+	+
P11	-	-	n.d.	-	-	-	+	-	-	+	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
P13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 2. Ricerca di autoanticorpi durante il follow up in 13 pazienti affetti da SARS-CoV-2.

Tutti i 13 pazienti sono stati analizzati per i seguenti autoanticorpi: ANA, ENA, ANCA atipico (X-ANCA), ASCA IgA, ASCA IgG quando sono stati ricoverati (t0) e durante il follow up, dopo 3(t3) e 6 mesi(t6). La maggior parte dei pazienti presentava anticorpi anti nucleo al momento del ricovero e in 5 di loro gli ANA persistevano anche durante il follow up (5/9). Una paziente (P3), negativo al t0, analizzato 16 giorni dopo il ricovero è risultata positiva per gli ANA. La tabella riassume i *pattern* trovati in ogni paziente nei diversi *timepoint* (A). Per quanto riguarda gli altri autoanticorpi, un paziente positivo per gli ENA al t0, è rimasto positivo durante il follow up. Due pazienti (P9 e 10) presentavano al t0 X-ANCA positivi e uno di loro (P10) era anche positivo per gli autoanticorpi ASCA IgG a tutti i tre *time points*, mentre gli ASCA IgA, borderline al t0 si sono positivamente al t3 e t6. Un paziente (P11) era positivo per gli ASCA IgA e IgG soltanto al t0, mentre un altro paziente (P12) ha sviluppato questi autoanticorpi durante il follow up.

(n.d. = non determinato; \* = il paziente ha sviluppato gli autoanticorpi ANA 16 giorni dopo il ricovero; b.l.= borderline)

## DISCUSSIONE

È noto come l'infezione da SARS-CoV-2 sia in grado di scatenare una forte e dannosa risposta immunitaria (Catanzaro et al, 2020); tuttavia il meccanismo patogenetico non è ancora stato completamente chiarito. Alcuni pazienti COVID-19 possono presentare sintomi debilitanti che perdurano per molti mesi dopo l'infezione iniziale (Long COVID-19) (Huang et al, 2021). Questa condizione è caratterizzata da stanchezza persistente, mal di testa, mancanza di respiro, anosmia, debolezza muscolare, febbre, nebbia cognitiva, tachicardia, disturbi intestinali e manifestazioni cutanee. In questa prospettiva, è fondamentale monitorare i pazienti COVID-19 dopo l'infezione virale per un lungo periodo così da comprendere il possibile risultato clinico.

Recentemente, abbiamo riportato il caso di una donna di 85 anni che, dopo l'infezione da SARS-CoV-2, ha sviluppato trombocitopenia, effusione pleurica, proteinuria e basso complemento. La paziente presentava anche: una positività per gli ANA, caratterizzata da un quadro fluoroscopico misto (citoplasmatico 1: 160, omogeneo 1: 320 e granulare 1: 320), una positività per l'antigene Ku e per gli autoanticorpi X-ANCA. Quanto sopra elencato sono i criteri essenziali per diagnosticare il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) (criteri EULAR 2019) (Aringer, 2019).

Questi dati sostengono fermamente l'idea che i pazienti COVID-19 positivi, con alterazioni dell'assetto autoimmune, debbano essere monitorati nel tempo al fine di osservare la possibile insorgenza di una malattia autoimmune cronica.

Il nostro studio di follow-up ha evidenziato che solo 2 pazienti, P7 e P9, a 6 mesi dalla diagnosi si sono negativizzati, confermando il fatto che potesse trattarsi di una risposta correlabile all'infezione acuta. Di contro, un paziente che al t0 aveva un profilo autoimmune completamente negativo, rivalutato dopo 16 giorni, presentava anticorpi ANA e positività per gli antigeni M2- $\beta$  e Ku che permanevano anche a t3 e t6 (P3). Da un punto di vista clinico, questo paziente mostra ancora un'astenia muscolare persistente a livello del tronco, ma ulteriori indagini sono attualmente in corso per verificare la possibile insorgenza di una polimiosite (Sacchi et al, 2020).

Altri pazienti hanno mostrato una sintomatologia non correlata alla presenza di autoanticorpi. Per esempio, P8 ha mostrato un episodio transitorio di alopecia inquadrabile nel contesto di un *telogen effluvium* acuto post COVID-19 e non correlabile all'alopecia areata generalmente associata a condizioni autoimmuni (Forouzan et al, 2020). P4, P6, P13, nonostante abbiano mantenuto una positività al test ANA, non hanno mostrato sintomi compatibili con connettivopatia, in particolare con xerostomia xeroftalmia, ulcere al cavo orale, artriti, sinoviti o alterazioni cutanee. La giovane paziente P5, con positività agli ANA da *pattern* centriolare, ha sviluppato una iniziale piastrinopenia autoimmune che è stata trattata con steroidi ad alto dosaggio ed immunoglobuline (Molinaro et al, 2020). P12 ha sviluppato ipoacusia durante il

follow-up. È noto come molte malattie autoimmuni possano provocare o essere associate a sordità autoimmune. La malattia dell'orecchio interno autoimmune (AIED) è stata definita come una condizione di perdita dell'udito neurosensoriale bilaterale, causata da una risposta "incontrollata" del sistema immunitario. AIED è considerata "primaria" quando l'orecchio interno è l'unico organo interessato; fino al 30% dei casi, l'AIED è secondaria alla malattia autoimmune sistemica come il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, la sindrome di Sjögren o la granulomatosi di Wegener (Ciorba et al, 2018). Sarà quindi fondamentale monitorare il paziente a lungo termine al fine di determinare la natura dell'ipoacusia sviluppata.

Nei restanti soggetti, nonostante la persistenza di positività autoanticorpale, anche a titoli elevati, non è stata riscontrata nessuna correlazione clinica o sviluppo di patologie autoimmuni. In accordo con i dati di letteratura, infatti, la sola presenza di autoanticorpi non ha valore patogenetico (Kang et al, 2020). Tuttavia, risulta importante seguire nel tempo questi pazienti per capire se si negativizzeranno o se, a più lungo termine, potranno sviluppare una sintomatologia clinica.

In conclusione, il nostro studio è il primo volto ad indagare la persistenza di autoanticorpi nel tempo in pazienti COVID-19 e mette in evidenza come la maggior parte della popolazione arruolata mantenga un'**alterazione dell'assetto autoanticorpale** anche a distanza di 6 mesi dall'evento infettivo acuto. Sebbene il numero dei casi analizzati sia ridotto, i nostri risultati suggeriscono l'importanza di monitorare la presenza degli autoanticorpi a tempi più lunghi al fine di valutare il possibile sviluppo di patologie autoimmuni.

## BIBLIOGRAFIA

- Aringer, M. "EULAR/ACR Classification Criteria for SLE." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 49, no. 3 (2019): S14–17. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.09.009>.
- Bonometti R, Sacchi MC, Stobbione P, Lauritano EC, Tamiazzo S, Marchegiani A, Novara E, et al. "The First Case of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Triggered by COVID-19 Infection." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24, no. 18 (September 2020): 9695–97. [https://doi.org/10.26355/eur-rev\\_202009\\_23060](https://doi.org/10.26355/eur-rev_202009_23060).
- Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. "Immune Response in COVID-19: Addressing a Pharmacological Challenge by Targeting Pathways Triggered by SARS-CoV-2." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, no. 1 (2020): 84. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0191-1>.
- Guang C, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, Wang T, et al. "Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019." *Journal of Clinical Investigation* 130, no. 5 (April 13, 2020): 2620–29. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>.
- Chen LYC, Quach TT. "COVID-19 Cytokine Storm Syndrome: A Threshold Concept." *The Lancet Microbe* 2, no. 2 (2021): e49–50. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30223-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30223-8).
- Ciaccio M, Agnello L. "Biochemical Biomarkers Alterations in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)." *Diagnosis* 7, no. 4 (November 18, 2020): 365–72. <https://doi.org/10.1515/dx-2020-0057>.
- Ciorba A, Corazzi V, Bianchini C, Aimoni C, Pelucchi S, Skarżyński PH, Hatzopoulos S. "Autoimmune Inner Ear Disease (AIED): A Diagnostic Challenge." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 32 (2018): 205873841880868. <https://doi.org/10.1177/2058738418808680>.
- Du Toit A. "Outbreak of a Novel Coronavirus." *Nature Reviews Microbiology* 18, no. 3 (2020): 123–123. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0332-0>.
- Ebrahim Soltani Z, Rahmani F, Rezaei N. "Autoimmunity and Cytokines in Guillain-Barré Syndrome Revisited: Review of Pathomechanisms with an Eye on



- Therapeutic Options." *European Cytokine Network* 30, no. 1 (March 1, 2019): 1–14. <https://doi.org/10.1684/ecn.2019.0424>.
- Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, Alijotas-Reig J, et al. "Covid-19 and Autoimmunity." *Autoimmunity Reviews* 19, no. 8 (2020): 102597. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102597>.
- Forouzan P, Cohen PR. "Incipient Diabetes Mellitus and Nascent Thyroid Disease Presenting as Beard Alopecia Areata: Case Report and Treatment Review of Alopecia Areata of the Beard." *Cureus*, July 31, 2020. <https://doi.org/10.7759/cureus.9500>.
- Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, Bikdeli B, et al. "Extrapulmonary Manifestations of COVID-19." *Nature Medicine* 26, no. 7 (2020): 1017–32. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>.
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z. "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19." *Nature Reviews Microbiology* 19, no. 3 (2021): 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, Kang L, et al. "6-Month Consequences of COVID-19 in Patients Discharged from Hospital: A Cohort Study." *The Lancet* 397, no. 10270 (January 16, 2021): 220–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32656-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32656-8).
- Kang EH, Ha Y, Jong Lee Y. "Autoantibody Biomarkers in Rheumatic Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 4 (February 18, 2020): 1382. <https://doi.org/10.3390/ijms21041382>.
- Liu Y, Sawalha AH, Lu Q. "COVID-19 and Autoimmune Diseases." *Current Opinion in Rheumatology* 33, no. 2 (March 1, 2021): 155–62. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000776>.
- Mokhtari T, Hassani F, Ghaffari N, Ebrahimi B, Yarahmadi A, Hassanzadeh G. "COVID-19 and Multiorgan Failure: A Narrative Review on Potential Mechanisms." *Journal of Molecular Histology* 51, no. 6 (2020): 613–28. <https://doi.org/10.1007/s10735-020-09915-3>.
- Molinaro E, Novara E, Bonometti R, Sacchi MC, Stobbione P, Lauritano EC, Boverio R. "Isolated Immune Thrombocytopenic Purpura in a Young Adult Covid-19

- Patient." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24, no. 20 (October 2020): 10850–52. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202010\\_23447](https://doi.org/10.26355/eurrev_202010_23447).
- Pascolini S, Vannini A, Deleonardi G, Ciordinik M, Sensoli A, Carletti I, Veronesi L, et al. "COVID-19 and Immunological Dysregulation: Can Autoantibodies Be Useful?" *Clinical and Translational Science* 14, no. 2 (2021): 502–8. <https://doi.org/10.1111/cts.12908>.
- Pesce G. "Epidemiologia Delle Malattie Autoimmuni Organo-Specifiche." In *Il Laboratorio Nelle Malattie Autoimmuni d'organo*, 14–36. Bologna: Esculapio, 2019.
- Rothan HA, Byrareddy SN. "The Epidemiology and Pathogenesis of Coronavirus Disease (COVID-19) Outbreak." *Journal of Autoimmunity* 109 (2020): 102433. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>.
- Sacchi MC, Tamiazzo S, Stobbione P, Agatea L, De Gaspari P, Stecca A, Lauritano EC, et al. "SARS-CoV-2 Infection as a Trigger of Autoimmune Response." *Clinical and Translational Science*, January 21, 2021, cts.12953. <https://doi.org/10.1111/cts.12953>.
- Sacchi, MC, Tamiazzo S, Lauritano EC, Bonometti R. "Case Report of COVID-19 in an Elderly Patient: Could SARS-CoV2 Trigger Myositis?" *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24, no. 22 (November 2020): 11960–63. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202011\\_23857](https://doi.org/10.26355/eurrev_202011_23857).
- Truong J, Conley J, Ashurst J. "Miller-Fisher Syndrome: A Case Report and Review of the Literature." *Clinical Practice and Cases in Emergency Medicine* 4, no. 4 (November 2020): 653–55. <https://doi.org/10.5811/cpcem.2020.7.48507>.
- Vlachoyiannopoulos PG, Magira E, Alexopoulos H, Jahaj E, Theophilopoulou K, Koutanidou A, Tzioufas AG. "Autoantibodies Related to Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases in Severely Ill Patients with COVID-19." *Annals of the Rheumatic Diseases* 79, no. 12 (2020): 1661–63. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218009>.
- Zhang Y, Xiao M, Zhang S, Xia P, Cao W, Jiang W, Chen H, et al. "Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19." *New England Journal of Medicine* 382, no. 17 (April 23, 2020): e38. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2007575>.

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

pubblicazione  
revisionata e  
approvata  
maggio 2021

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