



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

La terapia batterica orale nell' infezione da SARS-CoV2: nuove sfide in corso di pandemia

Scuola di dottorato in Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica
XXXV Ciclo

Candidato

Luigi Celani

Matricola 1233632

Relatore

Prof.ssa Gabriella d'Ettorre

Gennaio 2023

A Giorgia, Leonardo e Marta

Contenuti

I BACKGROUND	6
1. SARS-CoV2 e l'inizio di una pandemia	8
1.1 Eziologia	11
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Patogenesi	18
1.4 Spettro clinico e fattori di rischio	20
1.5 Manifestazioni cliniche	24
1.6 Diagnosi e valutazione	27
1.7 Gestione e trattamento	31
1.8 Prevenzione	36
1.9 Prognosi	37
2. Microbiota e Covid-19	41
2.1 Il microbiota intestinale	41
2.2 Sintomi gastrointestinali nei pazienti con COVID-19	43
2.3 Alterata composizione del microbiota intestinale nei pazienti con COVID-19	45
2.4 Asse intestino-polmoni	47
2.5 Asse intestino-encefalo-polmoni	49
2.6 Ipossia nel COVID-19 e microbiota intestinale	50
2.7 Implicazioni cliniche del microbiota intestinale nel COVID-19	50
II STUDI SPERIMENTALI	53
3. Sfide nella gestione dell'infezione da SARS-CoV2: il ruolo della terapia batterica orale come strategia terapeutica complementare per evitare la progressione del COVID-19	55
3.1 Popolazione studiata, impostazione e raccolta dei dati	56
3.2 Risultati	57
3.3 Discussione e Conclusione	59
4. Terapia batterica orale in pazienti con COVID-19: uno studio retrospettivo	62
4.1 Materiali e metodi	62
4.2 Risultati	63
4.3 Discussione e Conclusione	67
5. Effetto "oxygen sparing" della terapia batterica orale in corso di COVID-19	69
5.1 Materiali e metodi	69
5.2 Risultati	72
5.3 Discussione	75
5.4 Conclusione	77

6. Ruolo della terapia batterica orale nel ridurre l'insorgenza della fatica cronica nei pazienti con COVID-19	79
6.1 Materiali e metodi	79
6.2 Risultati	81
6.3 Discussione	84
6.4 Conclusione	85
III PROSPETTIVE FUTURE E CONCLUSIONI	88
7. Risposta immunitaria ai vaccini e disbiosi	90
8. Interventi basati sul microbiota	92
8.1 Gestione degli antibiotici	92
8.2 Modifica della dieta	92
8.3 Probiotici e Prebiotici	93
8.4 Trapianto fecale	93
9. Conclusioni	95

Parte I

Background

Capitolo 1

SARS-CoV2 e l'inizio di una pandemia

Negli ultimi due decenni coronavirus (CoVs) precedentemente sconosciuti, la sindrome respiratoria acuta grave CoV (SARS-CoV) e la sindrome respiratoria mediorientale CoV (MERS-CoV) hanno attirato l'attenzione medica, scientifica e dei media a causa della loro natura letale e del potenziale epidemico. Nel novembre 2002 il primo caso di SARS si verificò a Foshan, in Cina¹ e nel giugno 2012 il primo caso di MERS in un ospedale di Jeddah, in Arabia Saudita. Entrambe le malattie zoonotiche sono state inserite e ad oggi permangono nell'elenco delle malattie prioritarie del progetto dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) in quanto minacce globali alla sicurezza della salute pubblica globale.²

Il 12 dicembre 2019, le autorità sanitarie della città di Wuhan, nella regione cinese di Hubei, segnalano un'insolita polmonite idiopatica, in alcuni casi progredita in insufficienza respiratoria, che è il principale criterio per definire una sindrome da malattia respiratoria acuta (ARDS)³. Sei dei primi sette pazienti lavoravano in un mercato ittico locale e i campioni vennero inviati presso un laboratorio locale, che identificò un agente patogeno candidato come un coronavirus, chiamato 2019-nCoV. L'analisi successiva ha mostrato una sequenza del 79,6%-87,1% corrispondente ai noti virus MERS-CoV e SARS-CoV, i cui ospiti intermedi sono rispettivamente il dromedario e lo zibetto). Successivamente, è stata riportata una somiglianza complessiva dell'identità della sequenza del genoma >95% con il virus BatVoVRaTG13, precedentemente rilevato nel pipistrello *Rhinolophus affinis*, suggerendo un antenato comune^{3,4}. Di conseguenza, questa relazione filogenetica ha fornito la prova che il virus potrebbe aver avuto origine nei pipistrelli, anche se sono stati suggeriti ospiti alternativi come zibetti e pangolini in quanto un virus simile a SARS-CoV è stato isolato anche da questi ultimi^{4,5}. L'analisi del genoma ha indicato una proteina spike dell'envelope che interagisce con l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) sulla membrana cellulare bersaglio come punto di ingresso. La sequenza del virus è stata determinata e pubblicata all'inizio del 2020^{6,7} e successivamente è stata ribattezzata SARS-Cov-2 nel marzo 2020⁸. Il primo caso ufficiale [secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)] è stato confermato il 30 dicembre 2019 e il primo decesso il 6 gennaio 2020. I dati sono stati regolarmente trasmessi all'OMS, che, il 20 gennaio 2020, ha iniziato a pubblicare settimanalmente i Situation Reports⁹. Il 23° Rapporto, datato 12 febbraio, si riferiva alla malattia come COVID-19¹⁰.

Oltre alla polmonite atipica, una delle prime osservazioni riguardava il tasso di infezione e la sua elevata trasmissibilità, con un tasso di riproduzione (R) di 2,5, notevolmente superiore a quello dell'influenza (R = 0,93) e degli altri coronavirus MERS-CoV (R = 0,69) e SARS-Cov-1 (R = 1,1)¹¹. Successivamente altri dati hanno mostrato come i principali sintomi fossero quelli tipici di una grave infezione polmonare di natura virale, ossia febbre (83%), tosse (82%) e dispnea (31%), con il 15% dei pazienti che riferiva la presenza di tutti e tre i sintomi, inoltre più della metà era affetto da una malattia cronica (in particolare ipertensione, diabete e malattie cerebrovascolari) con un tasso di mortalità dell'11%¹². Un rapporto successivo¹³ ha mostrato che i principali fattori di rischio per il ricovero in terapia intensiva (ICU) erano l'età, l'ipertensione, le malattie cerebrovascolari, il diabete, la dispnea e le vertigini (p < 0,01). I principali risultati di laboratorio legati al ricovero in terapia intensiva erano l'aumento della conta dei neutrofilici, di D-dimero, creatinichinasi (CPK), lattato deidrogenasi (LDH), l'urea, aspartato aminotransferasi (AST), la troponina I ad alta sensibilità e la procalcitonina (p < 0,01). La ventilazione meccanica invasiva si è resa necessaria per il 47% dei pazienti ricoverati in terapia intensiva. Un altro studio ha rilevato che l'età avanzata, livelli alterati di troponina,

elevati valori di LDH e CPK erano tutti predittori indipendenti di mortalità¹⁴. Questi dati sono stati successivamente confermati ed estesi a popolazioni caucasiche.

Un anno dopo i primi casi (12 dicembre 2019), la malattia è diventata globale, presente in tutti i continenti popolati, con circa 76,2 milioni di persone infette (0,97% della popolazione mondiale), causando 1,8 milioni di decessi (2,3%) delle persone infette. Il cruscotto dell'OMS sul coronavirus (COVID-19) ha continuato a fornire due parametri principali: il numero di persone infette (casi) e il numero di decessi¹⁵. I dati che mostrano l'aumento dei tassi di casi e di decessi, e quindi le variazioni dei tassi di decesso per caso, fino al dicembre 2021 sono presentati nella Tabella 1.

TABELLA 1. Casi e decessi a livello globale di COVID-19

Mese*	2020			2021		
	Casi	Decessi	Percentuale dei decessi	Casi	Decessi	Percentuale dei decessi
Gennaio	**	**	**	89.6	1.99	2.22
Febbraio	0.047	0.001	2.70	105.6	2.39	2.26
Marzo	0.11	0.036	3.36	116.2	2.67	2.30
Aprile	1.18	0.066	5.59	134.9	3.00	2.22
Maggio	3.96	0.285	7.20	157.1	3.39	2.16
Giugno	6.79	0.417	6.14	175.4	3.75	2.14
Luglio	12.6	0.550	4.36	186.3	4.00	2.15
Agosto	19.6	0.763	3.89	202.3	4.28	2.11
Settembre	29.1	0.970	3.33	224.3	4.62	2.06
Ottobre	37.9	1.166	3.08	237.1	4.84	2.04
Novembre	50.9	1.311	2.58	246.7	5.00	2.03
Dicembre	71.7	1.670	2.33	262.3	5.22	1.99

*Dati grezzi: milioni. *primo giorno del mese** Numeri troppo piccoli per essere affidabili. All'inizio del 2022, questi dati sono aumentati ulteriormente, passando rispettivamente a 324.31, 5.55 e 1.7% in gennaio, a 411.86, 5.84 e 1.4% in febbraio, a 459.1, 6.07 e 1.3% in marzo e a 501.14, 6.2 e 1.2 in aprile.*

Sebbene vi siano stati diversi picchi e cali, in linea di massima il numero di decessi è aumentato in modo approssimativamente rettilineo durante il 2020 e il 2021, e sebbene anche il numero di casi sia aumentato in modo approssimativamente rettilineo, il tasso è aumentato notevolmente all'inizio del 2022. Molte nazioni hanno tardato a fare i conti con il virus e i suoi effetti. Alcuni hanno prontamente posto limitazioni ai viaggi per vietare efficacemente la migrazione e altre restrizioni (come la chiusura di scuole e università e l'attuazione del coprifuoco notturno), mentre altri hanno impiegato più tempo per adottare gli stessi interventi. Parte delle differenze è presumibilmente dovuta alla frequenza dei test, alle modalità di segnalazione dei casi e dei decessi ecc. Un altro fattore indipendente è stata la capacità delle nazioni e dei loro sistemi sanitari di rispondere all' infezione.

Questi fattori si riflettono nei dati della Tabella 2, che confronta gli aumenti cumulativi del numero di casi confermati circa 6 mesi dopo l'inizio della pandemia, a 1 anno e a 18 mesi in nazioni selezionate. Anche questi dati sono aggiustati per la popolazione di ogni nazione e indicano quindi una grande variabilità nella diffusione della malattia tra nazioni, regioni e continenti. Analogamente, la Tabella 3 mostra dati a confronto sull'aumento dei decessi legati ai casi, anch'essi aggiustati per la dimensione della popolazione. È bene ricordare che l'interpretazione di questi dati nei primi 6 mesi fino a metà giugno 2020 è comunque da considerarsi controversa a causa dell'iniziale eterogeneità nella definizione di caso e decesso correlato a covid-19 (ad esempio, solo negli ospedali o negli ospedali e altrove) che all'inizio risultavano variabili da Paese a Paese. Con lo sviluppo della pandemia, le definizioni cliniche oggettive e la maggiore disponibilità di test scientifici hanno fornito dati più affidabili.

TABELLA 2. Dati sui casi confermati di COVID-19 in nazioni selezionate

Nazioni	Giugno 2020		Dicembre 2020		Giugno 2021	
	Casi confermati (10 ⁶)	Casi confermati (% della popolazione)	Casi confermati (10 ⁶)	Casi confermati (% della popolazione)	Casi confermati (10 ⁶)	Casi confermati (% della popolazione)
Mondo	8.71	0.11	76.2	0.97	177.9	2.26
Argentina	0.04	0.09	1.48	3.32	4.24	9.52
Australia	<0.1	<0.01	0.03	0.11	0.03	0.11
Brasile	0.38	0.12	6.78	2.07	17.8	5.44
Cina	0.08	<0.01	0.09	<0.01	0.12	<0.01
Colombia	0.06	0.12	1.40	2.82	3.89	7.84
Francia	0.16	0.24	2.31	3.45	5.65	8.43
Germania	0.19	0.23	1.49	1.78	3.72	4.44
India	0.41	0.03	10.0	0.72	29.9	2.21
Italia	0.24	0.40	1.93	2.96	4.24	7.02
Messico	0.17	0.13	1.30	1.03	2.47	1.96
Perù	0.27	0.84	0.99	3.09	2.02	6.31
Russia	0.58	0.40	2.85	1.82	5.32	3.68
Spagna	0.25	0.53	1.83	3.75	3.77	8.04
Sud Africa	0.09	0.16	0.91	1.58	1.81	3.13
UK	0.28	0.42	2.06	2.77	4.62	6.97
USA	2.22	0.68	17.5	5.35	33.2	10.1

Tutti i dati da www.covid19.who.int

TABELLA 3. Dati sui decessi causati COVID-19 in nazioni selezionate

Nazioni	Giugno 2020		Dicembre 2020		Giugno 2021	
	Decessi (10 ³)	Decessi (% della popolazione)	Decessi (10 ³)	Decessi (% della popolazione)	Decessi (10 ³)	Decessi (% della popolazione)
Mondo	486.2	<0.01	1752.7	0.02	3860.8	0.05
Argentina	0.98	<0.01	41.7	0.09	88.2	0.20
Australia	0.1	<0.01	0.9	<0.01	0.9	<0.01
Brasile	48.9	0.01	185.6	0.06	498.5	0.15
Cina	4.6	<0.01	4.8	<0.01	5.4	<0.01
Colombia	1.5	<0.01	40.0	0.08	98.7	0.20
Francia	29.5	0.04	60.0	0.09	109.8	0.16
Germania	8.9	0.01	26.0	0.03	90.4	0.11
India	13.3	<0.01	145.5	0.01	386.7	0.03
Italia	34.6	0.06	68.4	0.11	127.3	0.21
Messico	20.4	0.02	117.2	0.09	230.9	0.18
Perù	32.0	0.10	91.6	0.29	189.9	0.09
Russia	8.1	0.01	50.8	0.03	129.4	0.09
Spagna	29.7	0.06	52.1	0.11	81.1	0.17
Sud Africa	1.87	<0.01	24.5	0.04	59.8	0.10
UK	39.8	0.06	67.1	0.10	128.0	0.19
USA	120.1	0.04	319.0	0.10	596.1	0.18

Tutti i dati da www.covid19.who.int

1.1 Eziologia

I Coronavirus (CoV) sono virus a RNA a filamento positivo (+ssRNA) con un aspetto a corona al microscopio elettronico, dovuto alla presenza di glicoproteine a spiga sull'involucro. La sottofamiglia Orthocoronavirinae della famiglia Coronaviridae (ordine Nidovirales) classifica quattro generi di CoV:

- **Alphacoronavirus** (alfaCoV)
- **Betacoronavirus** (betaCoV)
- **Deltacoronavirus** (deltaCoV)
- **Gammacoronavirus** (gammaCoV)

Il genere BetaCoV è ulteriormente suddiviso in cinque sottogeneri o lineaggi¹⁶. La caratterizzazione genomica ha dimostrato che i pipistrelli e i roditori sono le probabili fonti genetiche degli alfaCoV e dei betaCoV. Al contrario, le specie aviarie sembrano rappresentare le fonti genetiche dei deltaCoV e dei gammaCoV. I CoV sono diventati i principali agenti patogeni dei focolai emergenti di malattie respiratorie. I membri di questa grande famiglia di virus possono causare malattie respiratorie, enteriche, epatiche e neurologiche in diverse specie animali, tra cui cammelli, bovini, gatti e pipistrelli. Per ragioni ancora da spiegare, questi virus possono attraversare le barriere di specie e causare, nell'uomo, malattie che vanno dal comune raffreddore a patologie più gravi come la MERS e la SARS. Ad oggi sono stati identificati sette CoV umani (HCoV) in grado di infettare l'uomo. Alcuni di essi sono stati identificati a metà degli anni Sessanta, mentre altri sono stati individuati solo nel nuovo millennio. In generale, le stime indicano che il 2% della popolazione è portatore sano di un CoV e che questi virus sono responsabili di circa il 5%-10% delle infezioni respiratorie acute¹⁷.

- **CoV umani comuni:** HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 (betaCoV del lineaggio A); HCoV-229E e HCoV-NL63 (alfaCoV). Questi virus possono causare raffreddori comuni e infezioni autolimitanti del tratto respiratorio superiore in individui immunocompetenti. Tuttavia, nei soggetti immunocompromessi e negli anziani possono causare anche infezioni del tratto respiratorio inferiore.
- **Altri CoV umani:** SARS-CoV e MERS-CoV (betaCoV del lineaggio B e C, rispettivamente). Questi virus sono considerati più virulenti e in grado di causare epidemie con manifestazioni respiratorie ed extra-polmonari di gravità clinica variabile.

SARS-CoV-2 è un nuovo betaCoV appartenente allo stesso sottogenere del Coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) e del Coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV), che sono stati precedentemente implicati in epidemie di SARS-CoV e MERS-CoV con tassi di mortalità fino al 10% e al 35%, rispettivamente⁴. Ha una forma rotonda o ellittica e spesso pleomorfa e un diametro di circa 60-140 nm. Come altri CoV, è sensibile ai raggi ultravioletti e al calore. A questo proposito, anche se la temperatura elevata diminuisce la replicazione di qualsiasi specie di virus, si sta studiando la temperatura di inattivazione del SARS-CoV-2. Una superficie di acciaio inossidabile mantenuta a una temperatura dell'aria di 54,5°C (130 °F) provoca l'inattivazione del 90% del SARS-CoV-2 in circa 36 minuti. A 54,5°C, il tempo per una diminuzione del 90% dell'infettività è stato di 35,4 ± 9,0 minuti e l'emivita del virus è stata di 10,8 ± 3,0 minuti¹⁸. Al contrario, può resistere a temperature più basse, anche inferiori a 0°C. Inoltre, questi virus possono essere efficacemente inattivati da solventi lipidici, tra cui etere (75%), etanolo, disinfettanti contenenti cloro, acido perossiacetico e cloroformio, ad eccezione della clorexidina.

La caratterizzazione genomica del nuovo HCoV, isolato da un paziente con polmonite atipica dopo una visita a Wuhan, presentava un'identità nucleotidica dell'89% con il SARS-like-CoVZXC21 e dell'82% con il SARS-CoV umano. Di conseguenza, è stato definito SARS-CoV-

2 dagli esperti del Comitato internazionale per la tassonomia dei virus. Il genoma a RNA a singolo filamento del SARS-CoV-2 contiene 29891 nucleotidi, che codificano per 9860 aminoacidi.

Sebbene l'origine del SARS-CoV-2 sia attualmente sconosciuta, si ipotizza che abbia avuto origine da un animale, il che implica una trasmissione zoonotica. Un rapporto recentemente pubblicato dall'OMS che descrive le possibili origini della SARS-CoV-2 non è stato conclusivo in quanto non ha specificato chiaramente l'origine del virus; tuttavia, ha riferito che la circolazione della SARS-CoV-2 è avvenuta già nel dicembre 2019. Questo rapporto ha esplorato diverse possibili ipotesi sull'origine del virus, tra cui l'origine del virus in un animale, la trasmissione del virus a un ospite intermedio e il successivo passaggio all'uomo.

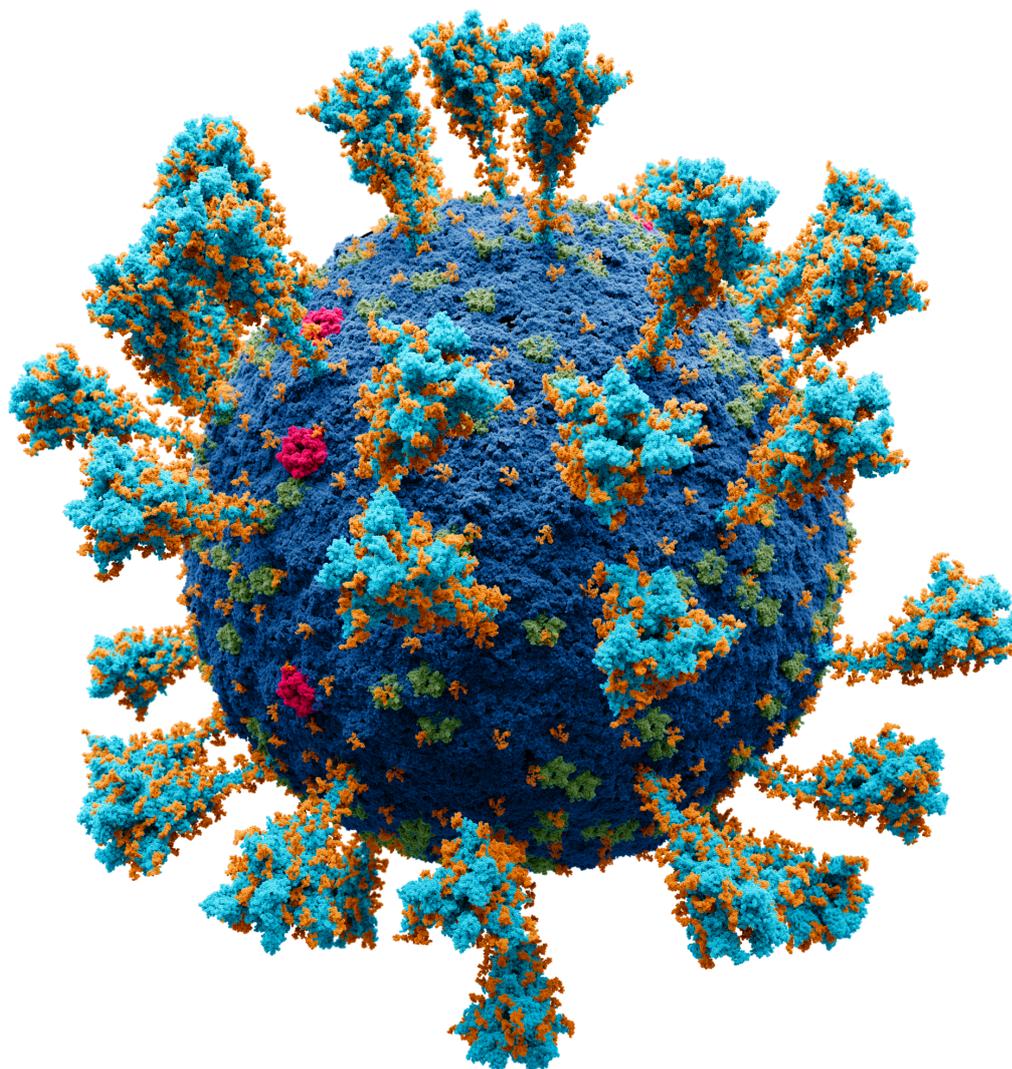


FIGURA 1. Modello atomico scientificamente accurato del coronavirus (SARS-CoV-2).

Il recettore ospite per l'ingresso nelle cellule del SARS-CoV-2 è lo stesso del SARS-CoV, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2)⁷. Il SARS-CoV-2 si lega all'ACE2 attraverso il dominio di legame al recettore della sua proteina spike (Fig 2.). Anche la serinoproteasi cellulare TMPRSS2 sembra importante per l'ingresso nelle cellule del SARS-CoV-2¹⁹.

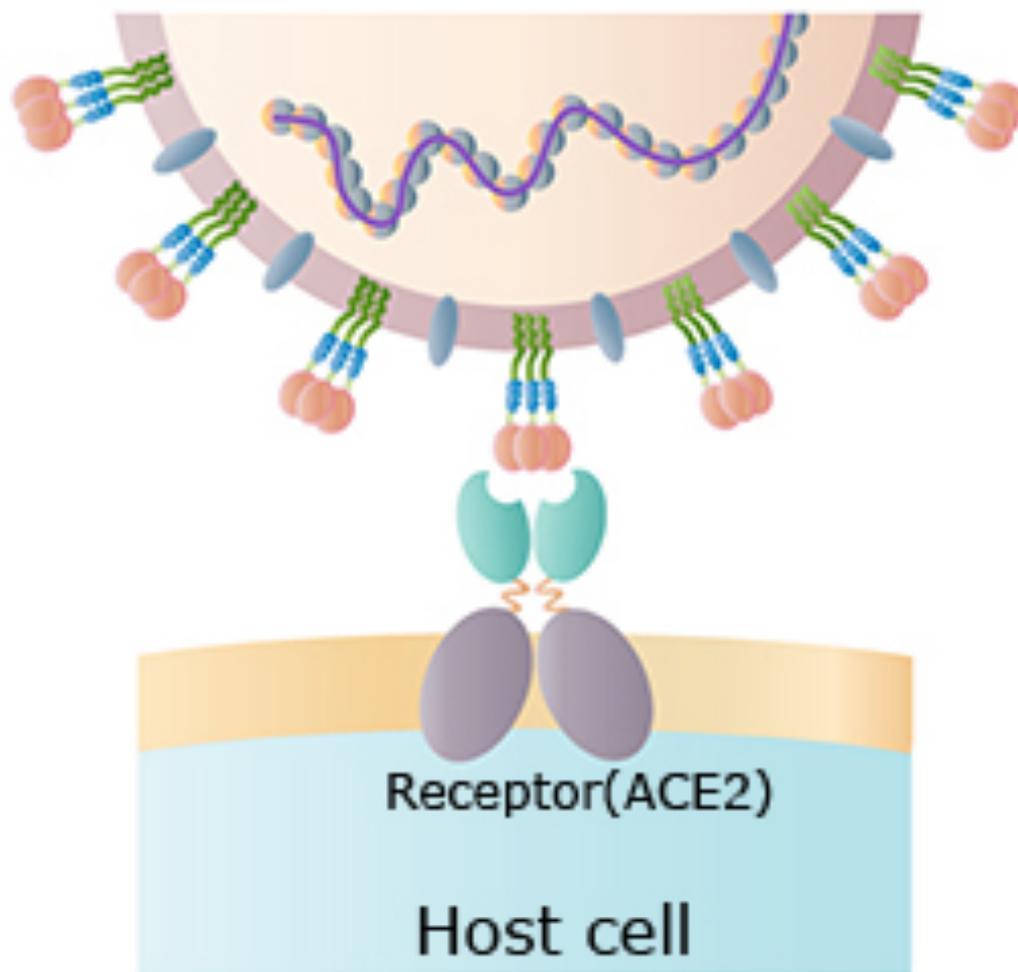


FIGURA 2. Legame tra proteina Spike (S) e recettore ACE2. Adattato da Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Sep;41(9):1141-1149.

Variants of Concern- Come altri virus, SARS-CoV-2 si evolve nel tempo. La maggior parte delle mutazioni nel genoma del SARS-CoV-2 non ha alcun impatto sulla funzione virale. Alcune varianti hanno suscitato grande attenzione a causa della loro rapida comparsa all'interno delle popolazioni e dell'evidenza di implicazioni cliniche o di trasmissione; queste sono considerate "variants of concern". Ogni variante ha diverse denominazioni basate sulla nomenclatura utilizzata da diversi sistemi di classificazione filogenetica; anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha designato etichette per le varianti degne di nota basate sull'alfabeto greco.

Omicron (B.1.1.529) e le sue varianti - La variante Omicron è stata segnalata per la prima volta in Botswana e subito dopo in Sudafrica nel novembre 2021. In Sudafrica, la variante Omicron è stata associata a un aumento delle infezioni regionali ed è stata identificata in molti altri Paesi, dove è stata associata a un forte aumento delle infezioni segnalate^{15,20,21,22}. Successivamente, sono emerse altre sotto-varianti Omicron con vantaggi replicativi sempre maggiori, che hanno sostituito la precedente variante predominante. Ogni sotto-variante si differenzia dalle altre per diverse mutazioni nella proteina spike (ad eccezione di BA.4 e BA.5, che hanno proteine spike identiche)²³.

Diverse sotto-varianti Omicron presentano un vantaggio replicativo rispetto alla variante Delta ed eludono l'immunità umorale indotta da infezioni e vaccini in misura maggiore rispetto alle

varianti precedenti. Inoltre, sembrano essere associate a una malattia meno grave rispetto ad altre varianti.

Vantaggio di replicazione - L'emergere di ogni sotto-variante Omicron predominante (BA.1, poi BA.2, poi BA.4 e BA.5) è stato associato a un aumento locale delle infezioni da SARS-CoV-2, il che suggerisce un vantaggio di replicazione rispetto alla precedente variante o sotto-variante prevalente. BA.4 e BA.5 sono stati identificati per la prima volta in Sudafrica e, sulla base di un'analisi della prevalenza delle sotto-varianti Omicron in quel Paese, si stimava che avessero un vantaggio replicativo rispetto a BA.2 paragonabile al vantaggio che BA.2 aveva su BA.1²³. Omicron (in particolare BA.1) è stato anche associato a un tasso di reinfezioni più elevato rispetto a Delta (in uno studio, 25 contro 19 per cento)²⁴. Un altro studio sui contatti familiari di pazienti con infezione da Omicron BA.1 ha suggerito un tasso di reinfezione del 53%, che variava in base allo stato di vaccinazione del paziente indice e all'uso di misure preventive nella famiglia²⁵. Il vantaggio replicativo potrebbe essere legato, in parte, all'escape immunitario da parte delle sotto-varianti Omicron.

Escape immunitario - Le varianti Omicron possono sfuggire all'immunità umorale e sono associate a un rischio più elevato di reinfezione in individui precedentemente infettati con un ceppo diverso. In uno studio che ha valutato i dati di sorveglianza nazionale del Sudafrica, il rapporto tra reinfezioni (test positivo ripetuto almeno 90 giorni dopo un precedente test positivo) e infezioni primarie è stato più alto durante l'inizio del picco di casi associato alla variante Omicron BA.1 rispetto ai picchi associati alle varianti Beta e Delta (0,25 contro 0,12 e 0,09)²⁶. Risultati simili sono stati riportati da uno studio caso-controllo del Qatar, in cui un'anamnesi di infezione precedente era associata a un rischio inferiore dell'85-90% di infezione con le varianti Alfa, Delta o Beta, ma solo a un rischio inferiore del 56% con Omicron BA.1²⁷. Queste osservazioni sono ulteriormente supportate dai risultati di diversi laboratori, in cui i sieri di individui con un'infezione precedente o con una vaccinazione precedente non neutralizzano Omicron come le altre varianti; in alcuni casi, l'attività neutralizzante contro Omicron non era rilevabile nei sieri di convalescenti e in quelli post-vaccinazione²⁸⁻³⁰. Analogamente, rispetto all'Omicron BA.1, le sottolinee BA.2.12.1, BA.4 e BA.5 non sono altrettanto riconosciute dagli anticorpi suscitati dall'infezione o dalla vaccinazione con BA.1 o BA.2³¹⁻³³; pertanto, gli individui che hanno avuto un'infezione precedente all'era Omicron sono probabilmente suscettibili di reinfezione con altre sotto-varianti Omicron^{20,21,34}.

Tuttavia, anche se il rischio individuale di malattia grave con Omicron è inferiore a quello delle varianti precedenti, l'elevato numero di casi associati può comunque determinare un eccesso cumulativo di ricoveri e decessi associati a COVID-19 rispetto ad altre varianti^{35,36}.

Il rischio ridotto di malattia grave potrebbe riflettere una protezione parziale conferita da un'infezione o da una vaccinazione precedente.

Altre varianti

- **Alfa (lineage B.1.1.7)** - Questa variante è stata identificata per la prima volta nel Regno Unito alla fine del 2020 e successivamente è diventata la variante dominante a livello globale fino alla comparsa della variante Delta³⁷. Alpha è più trasmissibile di circa il 50-75% rispetto ai ceppi precedentemente in circolazione³⁷⁻³⁹. Alcuni studi^{40,41}, ma non tutti⁴², suggeriscono che la variante Alpha sia associata a una maggiore gravità della malattia.
- **Beta (lineage B.1.351)** - Questa variante, nota anche come 20H/501Y.V2, è stata identificata e predominante in Sudafrica alla fine del 2020⁴³. Sebbene sia stata successivamente identificata in altri Paesi, compresi gli Stati Uniti, non è diventata una variante dominante a livello globale. Il problema principale della variante Beta è l'evasione immunitaria: il plasma dei pazienti convalescenti e quello post-vaccinazione non neutralizza i costrutti virali con la proteina spike Beta come quelli con la proteina spike wild-type⁴⁴⁻⁴⁷.
- **Gamma (lineage P.1)** - Questa variante, nota anche come 20J/501Y.V3, è stata

identificata per la prima volta in Giappone nel dicembre 2020 ed era prevalente in Brasile⁴⁸. Sebbene sia stata successivamente identificata in altri Paesi, compresi gli Stati Uniti, non è diventata una variante dominante a livello globale. Diverse mutazioni della variante hanno destato preoccupazione per l'aumento della trasmissibilità e l'impatto sull'immunità⁴⁹.

- **Delta (lineage B.1.617.2)** - Questo variante è stata identificata per la prima volta in India nel dicembre 2020 e da allora è stata la variante più diffusa a livello mondiale fino alla comparsa di Omicron. Rispetto alla variante Alpha, la variante Delta è più trasmissibile^{50,51} ed è stata associata a un rischio maggiore di malattia grave e di ospedalizzazione^{52,53}. Diversi studi suggeriscono che l'efficacia del vaccino è leggermente attenuata contro l'infezione sintomatica con Delta, ma rimane elevata contro la malattia grave e l'ospedalizzazione. Questi dati sono discussi altrove.

1.2 Epidemiologia

Dalle prime segnalazioni di casi provenienti da Wuhan, città della provincia cinese di Hubei, alla fine del 2019, sono stati segnalati casi in tutto il mondo. A livello globale, sono stati segnalati oltre 500 milioni di casi confermati di COVID-19.

Il conteggio dei casi segnalati sottostima l'onere complessivo della diffusione di COVID-19, poiché solo una parte delle infezioni acute viene diagnosticata e segnalata. Le indagini di sieroprevalenza negli Stati Uniti e in Europa hanno suggerito che, dopo aver tenuto conto dei potenziali falsi positivi o negativi, il tasso di esposizione precedente a SARS-CoV-2, riflesso dalla sieropositività, supera l'incidenza dei casi riportati di circa 10 volte^{54,55}. Uno studio che ha utilizzato diverse fonti di dati, tra cui database sul conteggio dei casi, sui decessi legati al COVID-19 e sulla sieroprevalenza, ha stimato che nel novembre 2021, oltre 3 miliardi di individui, ovvero il 44% della popolazione mondiale, sono stati infettati almeno una volta da SARS-CoV-2⁵⁶. Si stima che circa un terzo dei casi totali si sia verificato in Asia meridionale.

1.2.1 Trasmissione

La trasmissione respiratoria diretta da persona a persona è la modalità principale di trasmissione per SARS-CoV-2⁵⁷. Si ritiene che si verifichi principalmente attraverso il contatto ravvicinato (cioè entro un raggio di circa due metri) attraverso le particelle respiratorie; il virus rilasciato nelle secrezioni respiratorie quando una persona con infezione tossisce, starnutisce o parla può infettare un'altra persona se viene inalato o entra in contatto diretto con le mucose. Il contagio può avvenire anche se le mani di una persona vengono contaminate da queste secrezioni o se tocca superfici contaminate e poi si tocca gli occhi, il naso o la bocca, anche se non si ritiene che le superfici contaminate siano una delle principali vie di trasmissione.

SARS-CoV-2 può anche essere trasmesso a distanze maggiori per via aerea (attraverso l'inalazione di particelle che rimangono nell'aria nel tempo e a distanza), ma la misura in cui questa modalità abbia contribuito alla pandemia è incerta⁵⁸⁻⁶⁰. Segnalazioni sparse di focolai di SARS-CoV-2 (ad esempio, in un ristorante, su un autobus) hanno evidenziato il potenziale di trasmissione aerea a distanza in spazi chiusi e poco ventilati⁶¹⁻⁶³. Altri studi hanno identificato l'RNA virale nei sistemi di ventilazione e nei campioni d'aria delle stanze d'ospedale dei pazienti affetti da COVID-19, compresi quelli con infezione lieve⁶⁴⁻⁶⁶; tuttavia i tentativi di trovare il virus vitale nell'aria e nei campioni di superficie in ambienti sanitari hanno avuto successo solo raramente⁶⁶⁻⁶⁸. Tuttavia, i tassi di trasmissione complessiva e di reinfezioni da parte di SARS-CoV-2 suggeriscono che la trasmissione aerea a lungo raggio non è una modalità primaria^{59,60}. Inoltre, in alcune casi di operatori sanitari esposti a pazienti con infezione non diagnosticata, pur utilizzando solo precauzioni per contatto e droplets, non sono state identificate infezioni secondarie nonostante l'assenza di precauzioni per via aerea⁶⁹. Le raccomandazioni sulle

precauzioni per via aerea nell'ambiente sanitario variano a seconda del luogo sebbene siano universalmente raccomandate quando si eseguono procedure che generano aerosol.

SARS-CoV-2 è stato rilevato anche in campioni non respiratori, tra cui feci, sangue, secrezioni oculari e liquido seminale, ma il ruolo di questi siti nella trasmissione è incerto⁷⁰⁻⁷³. In particolare, diversi rapporti hanno descritto il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 da campioni di feci, anche dopo che non l'RNA virale non era più rilevato da campioni delle vie respiratorie superiori^{72,73}, e il virus con attività replicativa è stato coltivato dalle feci in rari casi^{70,74}. Segnalazioni sparse di cluster in un edificio residenziale e in una densa comunità urbana con scarse condizioni igieniche hanno suggerito la possibilità di una trasmissione attraverso l'aerosolizzazione del virus dal drenaggio delle acque reflue^{75,76}.

Il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 nel sangue è stato riportato anche in alcuni studi, tuttavia la probabilità di trasmissione per via ematica (ad esempio, attraverso derivati ematici o aghi) sembra bassa; i virus respiratori non sono generalmente trasmessi per via ematica e non sono state riportate infezioni trasmesse per via trasfusione per SARS-CoV-2 o MERS-CoV o il SARS-CoV⁷⁷. Non vi è inoltre alcuna evidenza che SARS-CoV-2 possa essere trasmessa attraverso il contatto con sedi non mucose. Per quanto riguarda la via di trasmissione verticale, una meta-analisi che ha incluso 936 neonati di madri affette da COVID-19 ha dimostrato che questa modalità è possibile, ma si verifica in una minoranza di casi⁷⁸.

La trasmissione tramite contaminazione di superfici inanimate con SARS-CoV-2 è stata ben caratterizzata sulla base di molti studi che hanno dimostrato la vitalità del SARS-CoV-2 su varie superfici porose e non porose. In condizioni sperimentali, il SARS-CoV-2 è risultato stabile sulle superfici in acciaio inossidabile e plastica rispetto a quelle in rame e cartone, con riscontro di virus vitale fino a 72 ore dopo l'inoculazione sulle superfici⁷⁹. Virus vitale è stato isolato fino a 28 giorni a 20 gradi C da superfici non porose come vetro e acciaio inossidabile. Al contrario, il recupero del SARS-CoV-2 su materiali porosi è stato ridotto⁸⁰. Uno studio che ha valutato la durata della vitalità del virus su oggetti e superfici ha mostrato che il SARS-CoV-2 può essere trovato su plastica e acciaio inossidabile fino a 2-3 giorni, su cartone fino a 1 giorno, su rame fino a 4 ore. Inoltre, sembra che la contaminazione sia stata maggiore nelle unità di terapia intensiva (ICU) rispetto ai reparti generali, SARS-CoV-2 è stato rinvenuto sui pavimenti, sui mouse dei computer, sui bidoni della spazzatura e sui corrimano dei letti dei pazienti, nonché nell'aria fino a 4 metri di distanza dai pazienti, il che implica anche una trasmissione nosocomiale oltre alla trasmissione tramite fomi⁶⁵.

Il CDC ha recentemente pubblicato un aggiornamento che riporta la possibilità di trasmissione dell'infezione attraverso il contatto con superfici contaminate dal virus, ma il rischio è basso.

Il potenziale di trasmissione di SARS-CoV-2 inizia prima dello sviluppo dei sintomi ed è massimo nelle prime fasi della malattia per poi diminuire in seguito. La trasmissione dopo 10 giorni di malattia è improbabile, in particolare per i pazienti immunocompetenti con infezione non grave. Gli individui infetti hanno maggiori probabilità di essere contagiosi nei primi 7-10 giorni di infezione, quando i livelli di RNA virale dai campioni delle vie respiratorie superiori sono più alti e il virus è più facilmente rilevabile⁸¹⁻⁸³. Ciò è supportato da dati che valutano la durata del rischio di trasmissione. La maggior parte di questi dati è stata raccolta durante il primo anno della pandemia. Dati successivi sulla variante Omicron suggeriscono che il picco di RNA virale e la maggiore probabilità di diffusione del virus infettivo possono verificarsi leggermente più tardi, da tre a sei giorni dopo l'insorgenza dei sintomi⁸⁴. Tuttavia, la durata mediana in cui il virus Omicron infettivo è stato rilevabile nei campioni nasali variava da tre a cinque giorni dopo la diagnosi e il virus infettivo è stato raramente rilevato oltre 10 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi, suggerendo che la trasmissione dopo questo periodo rimane improbabile con Omicron⁸⁵.

La durata della disseminazione dell'RNA virale è variabile e può aumentare con l'età e la gravità della malattia. In una revisione di 28 studi, la durata mediana della rilevazione dell'RNA virale nei campioni respiratori è stata di 18 giorni dopo la comparsa dei sintomi; in alcuni individui, l'RNA virale è stato rilevato dal tratto respiratorio diversi mesi dopo l'infezione iniziale⁸⁶. L'RNA virale rilevabile, tuttavia, non indica necessariamente la presenza di un virus infettivo e sembra esistere una soglia di livello di RNA virale al di sotto della quale l'infettività è

improbabile. L'isolamento del virus infettivo da campioni delle vie respiratorie superiori oltre 10 giorni dopo l'inizio della malattia è stato documentato solo raramente in pazienti che avevano un'infezione non grave e i cui sintomi si erano risolti^{87,88}. Infine, è stato descritto anche uno shedding prolungato del virus in campioni fecali⁷⁴.

1.2.2 Risposta immunitaria dopo l'infezione

Anticorpi protettivi specifici per il SARS-CoV-2 e risposte cellulo-mediate sono indotte dopo l'infezione. È dimostrato che alcune di queste risposte possono essere rilevate per almeno un anno dopo l'infezione.

In seguito all'infezione da SARS-CoV-2, la maggior parte dei pazienti sviluppa anticorpi sierici rilevabili verso il dominio di legame al recettore della proteina spike virale e un'attività neutralizzante associata^{89,90}. Tuttavia, l'entità della risposta anticorpale può essere associata alla gravità della malattia e i pazienti con un'infezione lieve possono non produrre anticorpi neutralizzanti rilevabili⁹¹. Quando gli anticorpi neutralizzanti vengono generati, in genere diminuiscono dopo diversi mesi dall'infezione, anche se alcuni studi hanno riportato un'attività neutralizzante rilevabile fino a 12 mesi⁹²⁻⁹⁴. In uno studio condotto su 121 donatori di plasma convalescenti con titoli iniziali di legame con lo spike $\geq 1:80$, i titoli sono diminuiti leggermente nel corso di cinque mesi, ma sono rimasti $\geq 1:80$ nella stragrande maggioranza⁹⁵. Altri studi hanno anche identificato cellule B di memoria del dominio di legame del recettore e dello spike che sono aumentate nei mesi successivi all'infezione, così come plasmacellule specifiche per la proteina spike; questi risultati suggeriscono il potenziale di una risposta umorale di memoria a lungo termine^{92,93,96}.

L'attività neutralizzante è stata associata alla protezione da successive infezioni⁹⁷.

Gli studi hanno anche identificato risposte di cellule T CD4 e CD8 specifiche per la SARS-CoV-2 in pazienti guariti dalla COVID-19 e in individui che avevano ricevuto la vaccinazione COVID-19, il che suggerisce il potenziale di una risposta immunitaria duratura delle cellule T^{92,93,98}.

Se esiste un effetto protettivo sull'infezione da SARS-CoV-2 derivante da una precedente infezione da coronavirus del raffreddore comune (ccCoV), è probabilmente modesto. Diversi studi hanno cercato di trovare risposte immunitarie cellulari e/o umorali incrociate ai ccCoV e al SARS-CoV-2 e di determinare se queste risposte abbiano un impatto sull'incidenza clinica o sulla gravità della COVID-19. I risultati sono eterogenei. I risultati sono eterogenei e difficili da interpretare. Alcuni studi hanno dimostrato un effetto benefico dell'immunità da precedenti infezioni da ccCoV sul decorso della COVID-19^{99,100}, mentre altri non hanno evidenziato alcun effetto¹⁰¹ o addirittura un effetto negativo¹⁰².

1.2.3 Rischio di reinfezione

Prima della comparsa della variante Omicron, il rischio di reinfezione a breve termine (ad esempio, nei primi mesi dopo l'infezione iniziale) era basso. Un'infezione precedente riduceva il rischio di infezione nei sei-nove mesi successivi di almeno l'80-85%^{103,104}. Tuttavia, il rischio di reinfezione con la variante Omicron in individui precedentemente infettati con altre varianti è più elevato; il rischio di reinfezione con alcuni sublineage di Omicron dopo una precedente infezione con un diverso sublineage di Omicron è incerto, ma probabilmente anche più elevato rispetto alle precedenti stime di reinfezione, data l'evidenza di escape immunitario¹⁰⁵.

Uno studio osservazionale danese ha cercato di valutare il rischio di reinfezione analizzando il rischio di un test PCR positivo durante il secondo picco COVID-19 (da settembre a dicembre 2020) tra gli individui che erano stati sottoposti al test PCR durante il primo picco COVID-19 (da febbraio a giugno 2020)¹⁰⁴. Su 11.068 persone con un test PCR positivo durante il primo picco, 72 sono risultate positive durante il secondo picco (0,65%), rispetto a 16.819 persone su 514.271 (3,27%) che erano risultate negative durante il primo picco; l'"effetto protettivo"

stimato della precedente infezione è stato di circa l'80%. L'età superiore ai 65 anni è stata associata a un tasso più elevato di test positivi in entrambi i picchi.

1.3 Patogenesi

SARS-CoV2 è composto da quattro proteine strutturali principali: spike (S), glicoproteina dell'envelope (E), nucleocapside (N), proteina di membrana (M), insieme a 16 proteine non strutturali e 5-8 proteine accessorie¹⁰⁶. La glicoproteina di superficie (S), che assomiglia a una corona, si trova sulla superficie esterna del virione e subisce una scissione in una subunità S1 amino (N) terminale, che facilita l'incorporazione del virus nella cellula ospite, e in una subunità S2 carbossilica (C) terminale, contenente un peptide di fusione, un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico, responsabile della fusione virus-membrana cellulare. La subunità S1 è ulteriormente suddivisa in un dominio di legame al recettore (RBD) e in un dominio N-terminale (NTD), che facilita l'ingresso del virus nella cellula ospite e funge da potenziale bersaglio per la neutralizzazione in risposta ad antisieri o vaccini¹⁰⁷. L'RBD è un dominio peptidico fondamentale nella patogenesi dell'infezione, in quanto rappresenta un sito di legame per i recettori umani dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2).

Il SARS-CoV2 entra nelle cellule dell'ospite legando la SARS-CoV-2 spike o proteina S (S1) ai recettori ACE2 presenti in abbondanza sull'epitelio respiratorio, come le cellule epiteliali alveolari di tipo II. Oltre all'epitelio respiratorio, i recettori ACE2 sono espressi anche da altri organi come l'esofago superiore, gli enterociti dell'ileo, le cellule del miocardio, le cellule tubulari prossimali del rene e le cellule uroteliali della vescica. Il processo di attaccamento virale è seguito dall'innescamento della subunità S2 della proteina spike da parte della serina proteasi transmembrana 2 dell'ospite (TMPRSS2) che facilita l'ingresso nelle cellule e la successiva endocitosi della replicazione virale con l'assemblaggio dei virioni¹⁹.

In sintesi, la RBD dello spike consente il legame con il recettore ACE2 nei polmoni e in altri tessuti. La proteina spike di un sito aminoacidico (sito polibasico) permette l'elaborazione funzionale della stessa da parte dell'enzima umano furina (proteasi). Questo processo consente l'esposizione delle sequenze di fusione e, quindi, la fusione delle membrane virali e cellulari, passaggio necessario per l'ingresso del virus nella cellula.

1.3.1 Effetto del SARS-CoV2 sul sistema respiratorio

COVID-19 è considerata principalmente una malattia virale respiratoria e vascolare in quanto il suo agente causale, SARS-CoV2, colpisce prevalentemente i sistemi respiratorio e vascolare.

La patogenesi della polmonite indotta dal SARS-CoV2 è meglio spiegata da due fasi, una precoce e una tardiva. La fase precoce è caratterizzata dalla replicazione virale con conseguente danno tissutale diretto mediato dal virus, seguita da una fase tardiva in cui le cellule dell'ospite infettate innescano una risposta immunitaria con il reclutamento di linfociti T, monociti e neutrofili che rilasciano una risposta immunitaria, e il reclutamento di neutrofili che rilasciano citochine come il fattore di necrosi tumorale- α (TNF α), il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti-macrociti (GM-CSF), l'interleuchina-1 (IL-1), l'interleuchina-6 (IL-6), l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-12 e l'interferone (IFN)- γ . Nella COVID-19 grave, l'iperattivazione del sistema immunitario provoca una "tempesta di citochine" caratterizzata dal rilascio in circolo di alti livelli di citochine, in particolare IL-6 e TNF- α , che causano una risposta infiammatoria locale e sistemica^{108,109}. L'aumento della permeabilità vascolare e il conseguente sviluppo di edema polmonare nei pazienti con COVID-19 grave sono spiegati da molteplici meccanismi, tra cui: a) l'endotelite, come risultato della lesione virale diretta e dell'infiammazione perivascolare che porta alla deposizione di microvasi e microtrombi; b) la disregolazione del RAAS dovuta

all'aumento del legame del virus con i recettori ACE2; c) l'attivazione della via della callicreina-bradichinina, la cui attivazione aumenta la permeabilità vascolare, d) aumento della contrazione delle cellule epiteliali che causa il rigonfiamento delle cellule e l'alterazione delle giunzioni intercellulari¹¹⁰⁻¹¹². Oltre a IL-6 e TNF- α , il legame del SARS-CoV2 con il Toll-Like Receptor (TLR) induce il rilascio di pro-IL-1 β , che viene scisso nell'IL-1 β matura attiva che media l'infiammazione polmonare, fino alla fibrosi¹¹³.

1.3.2 Effetto del SARS-CoV2 sui sistemi di organi extrapolmonari

Sebbene il sistema respiratorio sia il bersaglio principale di SARS-CoV2, il virus può colpire altri importanti sistemi di organi come il tratto gastrointestinale (GI), epatobiliare, cardiovascolare, renale e il sistema nervoso centrale. La disfunzione d'organo indotta dal SARS-CoV2, in generale, può essere spiegata da uno o una combinazione dei meccanismi proposti, come la tossicità virale diretta, il danno ischemico causato da vasculite, trombosi o tromboinfiammazione, la disregolazione immunitaria e la disregolazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS)¹¹⁴.

Sistema cardiovascolare (CVS): Sebbene non sia noto l'esatto meccanismo di coinvolgimento cardiaco nel COVID-19, è probabile che sia multifattoriale. I recettori ACE2 sono presenti anche nelle cellule del miocardio, il che implica una citotossicità diretta del SARS-CoV2 sul miocardio con conseguente miocardite. Anche citochine proinfiammatorie, come l'IL-6, possono portare a infiammazione vascolare, miocardite e aritmie. La sindrome coronarica acuta (SCA) è una manifestazione cardiaca ben riconosciuta della COVID-19 ed è probabilmente dovuta a molteplici fattori che includono, ma non solo, l'ipercoagulabilità associata al COVID-19, il rilascio di citochine proinfiammatorie, il peggioramento di una grave malattia coronarica preesistente, la cardiomiopatia da stress e lo squilibrio emodinamico associato che possono ridurre il flusso sanguigno coronarico, il ridotto apporto di ossigeno con conseguente destabilizzazione della microtrombogenesi della placca coronarica o il peggioramento della coronaropatia preesistente¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Alterazioni ematologiche: SARS-CoV2 ha un effetto significativo sul sistema immunoematologico ed emostatico. Il meccanismo della leucopenia, una delle anomalie di laboratorio più comuni riscontrate nella COVID-19, è sconosciuto. Sono state formulate diverse ipotesi che includono la distruzione dei linfociti mediata dall'ACE 2 a causa dell'invasione diretta del virus, l'apoptosi dei linfociti dovuta alle citochine proinfiammatorie e la possibile invasione del virus negli organi linfatici¹¹⁹. La trombocitopenia non è comune nella COVID-19 ed è probabilmente dovuta a molteplici fattori che includono la soppressione delle piastrine mediata dal virus, la formazione di autoanticorpi e l'attivazione della cascata della coagulazione che porta al consumo delle piastrine. Sebbene sia noto che la COVID-19 è associata a uno stato di ipercoagulabilità, i meccanismi esatti che portano all'attivazione del sistema coagulativo sono sconosciuti e probabilmente attribuiti alla risposta infiammatoria indotta da citochine. La patogenesi di questa ipercoagulabilità associata è multifattoriale ed è probabilmente indotta da un danno diretto di origine virale o da una lesione dell'endotelio vascolare indotta da citochine che porta all'attivazione di piastrine, monociti e macrofagi, all'aumento dell'espressione del fattore tissutale, del fattore di von Willebrand e del Fattore VIII che porta alla generazione di trombina e alla formazione di coaguli di fibrina^{120,121}. Altri meccanismi che sono stati proposti includono possibili sequele protrombotiche indotte dai fagociti mononucleari, alterazioni delle vie del sistema renina-angiotensina (RAS), microangiopatia mediata dal complemento¹²¹.

Sistema nervoso centrale (SNC): Vi sono prove emergenti della presenza di recettori ACE2 nel cervello umano, che implicano la potenziale infezione del cervello da parte del SARS-CoV-2¹²². Le possibili vie attraverso le quali il SARS-CoV-2 può invadere il sistema nervoso centrale sono il trasferimento trans-sinaptico attraverso i neuroni infetti attraverso il nervo olfattivo, l'infezione delle cellule endoteliali vascolari o la migrazione dei leucociti attraverso la barriera

emato-encefalica¹²³.

Tratto gastrointestinale (GI): la patogenesi delle manifestazioni GI di COVID-19 è sconosciuta ed è probabilmente considerata multifattoriale a causa di diversi meccanismi potenziali che includono la citotossicità virale diretta ACE 2-mediata della mucosa intestinale, l'infiammazione indotta da citochine, la disbiosi intestinale e le anomalie vascolari¹²⁴.

Epatobiliare: Sebbene la patogenesi del danno epatico nei pazienti COVID-19 sia sconosciuta, il danno epatico nei pazienti COVID-19 è probabilmente multifattoriale ed è spiegato da molti meccanismi, da soli o in combinazione, che includono la replicazione virale mediata dall'ACE-2 nel fegato, il danno diretto mediato dal virus, il danno ipossico o ischemico, la risposta infiammatoria immuno-mediata, il danno epatico indotto da farmaci (DILI) o il peggioramento della malattia epatica preesistente¹²⁵.

Renale: La patogenesi del danno renale associato alla COVID-19 non è nota ed è probabilmente multifattoriale, spiegata da un singolo fattore o da una combinazione di molti fattori, come il danno citotossico diretto del virus, lo squilibrio del RAAS, lo stato iperinflammatorio associato indotto da citochine, il danno microvascolare e lo stato protrombotico associato alla COVID-19. Anche altri fattori, come l'ipovolemia associata, i potenziali agenti nefrotossici e la sepsi nosocomiale, possono potenzialmente contribuire al danno renale¹²⁶.

1.4 Spettro clinico e fattori di rischio

Il tempo mediano di incubazione per SARS-CoV-2 è stimato in circa 5 giorni e la maggior parte dei pazienti sviluppa i sintomi entro circa 11 giorni dall'infezione¹²⁷.

Lo spettro clinico del COVID-19 varia da forme asintomatiche o paucisintomatiche a malattie cliniche caratterizzate da insufficienza respiratoria acuta che conseguente richiesta di ventilazione meccanica, shock settico e insufficienza d'organo multipla. Si stima che dal 17,9% al 33,3% dei pazienti infetti rimanga asintomatico^{128,129}.

Una revisione effettuata prima dell'introduzione della vaccinazione COVID-19 ha stimato che il 33% delle persone con infezione da SARS-CoV-2 non sviluppa mai sintomi¹³⁰. Questa stima si basava su quattro grandi indagini trasversali basate sulla popolazione, tra le quali la percentuale mediana di individui che non presentavano sintomi al momento del test positivo era del 46% (range 43-77%), e su 14 studi longitudinali, tra i quali una media del 73% di individui inizialmente asintomatici rimaneva tale al follow-up. Una metanalisi di 95 studi cinesi e americani su quasi 30 milioni di individui testati (compresi alcuni bambini) ha rilevato che il 40,5% (95% CI 33,5-47,5%) degli individui infettati dal SARS-CoV-2 erano asintomatici¹³¹. Tuttavia, vi è ancora una certa incertezza sulla percentuale di infezioni asintomatiche, con un'ampia gamma di studi riportati. Inoltre, la definizione di "asintomatico" può variare tra gli studi, a seconda dei sintomi specifici valutati.

Al contrario, la stragrande maggioranza dei pazienti sintomatici presenta comunemente febbre, tosse e respiro corto e meno comunemente mal di gola, anosmia, disgeusia, anoressia, nausea, malessere, mialgie e diarrea.

In base alla gravità della malattia presente, che comprende sintomi clinici, anomalie di laboratorio e radiografiche, emodinamica e funzionalità degli organi. I National Institutes of Health (NIH) hanno pubblicato linee guida che classificano la COVID-19 in cinque tipi distinti.

Infezione asintomatica o presintomatica: Individui con test SARS-CoV-2 positivo senza sintomi clinici compatibili con COVID-19.

Malattia lieve: Individui che presentano sintomi di COVID-19 come febbre, tosse, mal di gola, malessere, cefalea, dolori muscolari, nausea, vomito, diarrea, anosmia o disgeusia, ma senza respiro affannoso o immagini anomale del torace.

Malattia moderata: Soggetti che presentano sintomi clinici o evidenza radiologica di malattia delle basse vie respiratorie e che hanno una saturazione di ossigeno (SpO₂) \geq 94% con aria ambiente.

Malattia grave: Individui che hanno $(\text{SpO}_2) \leq 94\%$ con aria ambiente; un rapporto tra pressione parziale dell'ossigeno arterioso e frazione di ossigeno inspirato, $(\text{PaO}_2/\text{FiO}_2) < 300$ con tachipnea marcata con frequenza respiratoria > 30 respiri/min o infiltrati polmonari $> 50\%$.

Malattia critica: Soggetti con insufficienza respiratoria acuta, shock settico e/o disfunzione d'organo multipla. I pazienti con grave malattia da COVID-19 possono diventare critici con lo sviluppo di una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) che tende a manifestarsi circa una settimana dopo l'inizio dei sintomi.

L'ARDS è caratterizzata da una grave insufficienza respiratoria di nuova insorgenza o dal peggioramento di un quadro respiratorio già identificato. La diagnosi richiede una serie di criteri clinici e ventilatori, come la diagnostica per immagini del torace, tra cui la radiografia del torace, la TC o l'ecografia polmonare che dimostrano la presenza di opacità bilaterali (infiltrati polmonari $> 50\%$), non completamente spiegate da versamenti, lobari o collasso polmonare. Se sono presenti reperti clinici e radiologici di edema polmonare, insufficienza cardiaca o altre cause come il sovraccarico di liquidi, devono essere esclusi prima di valutare l'ARDS. La definizione di Berlino classifica l'ARDS in tre tipi in base al grado di ipossia, con il parametro di riferimento costituito dal rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ o P/F ¹³²:

- ARDS lieve: $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ nei pazienti che non ricevono ventilazione meccanica o in quelli gestiti con ventilazione non invasiva (NIV) utilizzando una pressione positiva di fine espirazione (PEEP) o una pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP) $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$.
- ARDS moderata: $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$
- ARDS grave: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$.

Quando la PaO_2 non è disponibile, un rapporto $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2 \leq 315$ è suggestivo di ARDS. Uno studio osservazionale prospettico multicentrico che ha analizzato la mortalità a 28 giorni nei pazienti con ARDS ventilati meccanicamente ha concluso che i pazienti con ARDS COVID-19 avevano caratteristiche simili a quelle dell'ARDS da altre cause. Il rischio di mortalità a 28 giorni aumentava con la gravità dell'ARDS¹³³.

1.4.1 Fattori di rischio per la malattia grave

La malattia grave può verificarsi in individui di qualsiasi età, ma si verifica prevalentemente negli adulti in età avanzata o con comorbidità mediche sottostanti. Anche specifiche caratteristiche demografiche e anomalie di laboratorio sono state associate alla malattia grave. La vaccinazione per COVID-19 riduce sostanzialmente il rischio di malattia grave.

Sono stati proposti diversi strumenti di previsione per identificare i pazienti che hanno maggiori probabilità di avere una malattia grave sulla base di caratteristiche epidemiologiche, cliniche e di laboratorio; tuttavia, la maggior parte degli studi che valutano questi strumenti sono limitati dal rischio di bias e non sono stati convalidati adeguatamente per la gestione clinica^{134,135}.

- **Età avanzata** - Gli individui di qualsiasi età possono contrarre l'infezione da SARS-CoV-2, anche se gli adulti di mezza età o più anziani sono più comunemente colpiti e gli adulti più anziani hanno maggiori probabilità di avere una malattia grave. In diverse coorti di pazienti ospedalizzati con COVID-19 confermata, l'età mediana variava da 49 a 56 anni^{12,13,136}. In un rapporto del Centro cinese per il controllo e la prevenzione delle malattie che comprendeva circa 44.500 infezioni confermate, l'87% dei pazienti aveva un'età compresa tra 30 e 79 anni¹³⁷. Analogamente, in uno studio modellistico basato su dati provenienti dalla Cina continentale, il tasso di ospedalizzazione per COVID-19 è aumentato con l'età, con un tasso dell'1% per i pazienti di età compresa tra i 20 e i 29 anni, del 4% per quelli di età compresa tra i 50 e i 59 anni e del 18% per quelli di età

superiore agli 80 anni¹³⁸. Anche l'età avanzata è associata a un aumento della mortalità^{137,139-141}. In un rapporto del Centro cinese per il controllo e la prevenzione delle malattie, i tassi di mortalità sono stati dell'8 e del 15% tra i soggetti di età compresa tra i 70 e i 79 anni e di 80 anni o più, rispettivamente, in contrasto con il tasso di mortalità del 2,3% tra l'intera coorte. In un'analisi condotta nel Regno Unito, il rischio di morte tra i soggetti di 80 anni e più era 20 volte superiore a quello dei soggetti di età compresa tra 50 e 59 anni. Negli Stati Uniti, 2449 pazienti con diagnosi di COVID-19 tra il 12 febbraio e il 16 marzo 2020 disponevano di informazioni relative all'età, al ricovero e all'unità di terapia intensiva¹⁴²; il 67% dei casi è stato diagnosticato in soggetti di età ≥ 45 anni e, analogamente a quanto riscontrato in Cina, la mortalità è risultata più elevata tra gli individui più anziani, con l'80% dei decessi avvenuti in soggetti di età ≥ 65 anni. Al contrario, i soggetti di età compresa tra i 18 e i 34 anni rappresentavano solo il 5% degli adulti ricoverati per COVID-19 in un ampio studio su database di assistenza sanitaria e avevano un tasso di mortalità del 2,7%; l'obesità patologica, l'ipertensione e il sesso maschile erano associati alla mortalità in questa fascia di età¹⁴³. L'infezione sintomatica nei bambini e negli adolescenti è di solito lieve, anche se una piccola percentuale presenta una malattia grave e persino fatale.

- **Comorbidità** - Molteplici comorbidità e condizioni di base sono state associate a sviluppo di malattia grave (cioè infezione con conseguente ospedalizzazione, ricovero in terapia intensiva, intubazione o ventilazione meccanica o morte)^{137,141,143-150}. Questi fattori di rischio sono descritti nella tabella 4. Sebbene la malattia grave possa verificarsi in qualsiasi individuo, la maggior parte dei pazienti con malattia grave presenta almeno un fattore di rischio. In un rapporto su 355 pazienti deceduti con COVID-19 in Italia, il numero medio di comorbidità preesistenti era di 2,7 e solo 3 pazienti non avevano alcuna condizione di base¹⁴⁰. Tra i pazienti in età avanzata e con comorbidità mediche, il COVID-19 è spesso grave. Ad esempio, in un focolaio di SARS-CoV-2 in diverse strutture di assistenza a lungo termine nello stato di Washington, l'età mediana dei 101 residenti della struttura colpiti era di 83 anni e il 94% aveva una condizione cronica di base; i tassi di ospedalizzazione e di mortalità preliminare sono stati rispettivamente del 55 e del 34%¹⁵¹. In un'analisi di quasi 300.000 casi confermati di COVID-19 riportati negli Stati Uniti, il tasso di mortalità era 12 volte più alto tra i pazienti con co-morbilità segnalate rispetto a quelli che non ne avevano¹⁵².
- **Inattività fisica** - L'inattività fisica è stata associata allo sviluppo di malattia grave e ad outcome peggiore^{153,154}. Ad esempio, in uno studio retrospettivo a livello nazionale su oltre 65.000 persone partecipanti, alti livelli di attività fisica (>150 minuti/settimana) sono stati associati a tassi più bassi di ospedalizzazione (rapporto di rischio [RR] 0,66, 95% CI 0,63-0,70), ricovero in terapia intensiva (RR 0,59, 95% CI 0,59-0,70), 66, 95% CI 0,63-0,70), ricovero in terapia intensiva (RR 0,59, 95% CI 0,52-0,66), ventilazione meccanica (RR 0,55, 95% CI 0,47-0,64) e morte (RR 0,58, 95% CI 0,50-0,68) rispetto ai bassi livelli di attività fisica (<60 minuti/settimana)¹⁵⁵. In un'altra coorte retrospettiva a livello nazionale di 2295 adulti infettati con SARS-CoV-2, coloro che si sono impegnati in attività aerobiche e di rafforzamento muscolare hanno avuto un rischio inferiore di malattia grave COVID-19 e di morte correlata a COVID-19 rispetto a coloro che non si sono impegnati nell'esercizio fisico¹⁵⁶.
- **Background socioeconomico e sesso** - Alcune caratteristiche demografiche sono state associate a malattie più gravi. I soggetti di sesso maschile hanno rappresentato un numero sproporzionatamente più elevato di casi critici e di decessi in diverse coorti in tutto il mondo^{139,140,144,157,158}. Gli individui afroamericani, gli ispanici e quelli provenienti dell'Asia meridionale hanno presentato un numero elevato di infezioni e di decessi dovuti a COVID-19 negli Stati Uniti e nel Regno Unito, probabilmente in relazione a disparità di fondo nei determinanti sociali della salute^{141,159-162}. Alcune analisi aggiustate per comorbidità e stato socioeconomico invece non hanno trovato

un'associazione tra l'origine afroamericana o l'etnia ispanica e gli esiti avversi del COVID-19 nei pazienti ospedalizzati^{163,164}. Una maggiore mortalità associata a COVID-19 è stata riportata anche tra altri gruppi socioeconomicamente vulnerabili, come i soggetti detenuti¹⁶⁵.

- **Anomalie di laboratorio** - Anche particolari caratteristiche di laboratorio sono state associate a esiti peggiori, queste includono^{145,166-168}:

- linfopenia
- trombocitopenia
- enzimi epatici elevati
- aumento della lattato deidrogenasi
- aumento dei marcatori infiammatori (es. proteina C-reattiva, ferritina) e delle citochine infiammatorie (es. interleuchina 6 e tumor necrosis factor alfa)
- D-dimero elevato (>1 mcg/mL)
- tempo di protrombina elevato
- Troponina elevata
- Creatina fosfochinasi elevata
- Lesione renale acuta

A titolo di esempio, in uno studio è stato osservato un calo progressivo della conta dei linfociti e un aumento del D-dimero nel tempo nei paziente deceduti, rispetto a livelli più stabili nei sopravvissuti¹³.

La carenza di alcuni micronutrienti, in particolare della vitamina D^{169,170}, è stata associata a un decorso più grave in studi osservazionali, ma è probabile che molteplici fattori confondano le associazioni osservate. Inoltre, non esistono studi con evidenze robuste che l'inversione delle carenze di micronutrienti con l'integrazione migliori gli esiti della COVID-19.

- **Fattori virali** - È stato riportato che i pazienti con malattia grave presentano livelli di acido ribonucleico (RNA) virale più elevati nei campioni respiratori rispetto a quelli con malattia più lieve^{171,172}, sebbene alcuni studi non abbiano trovato alcuna associazione tra i livelli di RNA virale respiratorio e la gravità della malattia^{90,173}. Il rilevamento di RNA virale nel sangue è stato associato a una malattia grave, con conseguente danno d'organo (es. polmoni, cuore, reni), coagulopatia ed elevata mortalità^{174,175}.
- **Fattori genetici** - Anche i fattori genetici dell'ospite sono in fase di valutazione per le associazioni con la malattia grave¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

TABELLA 4. Comorbidità che il CDC classifica come fattori di rischio per COVID-19 grave

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Età ≥65 anni ▪ Asma ▪ Cancro ▪ Malattia cerebrovascolare ▪ Bambini con determinate condizioni di baseΔ ▪ Malattia renale cronica ▪ Malattia polmonare cronica (malattia polmonare interstiziale, embolia polmonare, ipertensione polmonare, bronchiectasie, BPCO) ▪ Malattia epatica cronica (cirrosi, malattia del fegato grassa non alcolica, malattia del fegato alcolica, epatite autoimmune) ▪ Fibrosi cistica ▪ Diabete mellito, tipo 1 e tipo 2

- Disabilità (es. ADHD, paralisi cerebrale, malformazioni congenite, limitazioni nella cura di sé o nelle attività della vita quotidiana, disabilità intellettive e dello sviluppo, difficoltà di apprendimento, lesioni del midollo spinale)
- Condizioni cardiache (come insufficienza cardiaca, malattia coronarica o cardiomiopatie)
- HIV
- Disturbi della salute mentale (disturbi dell'umore, tra cui depressione, disturbi dello spettro della schizofrenia)
- Condizioni neurologiche (demenza)
- Obesità (BMI ≥ 30 kg/m²) e sovrappeso (BMI da 25 a 29 kg/m²), o $\geq 95^{\circ}$ percentile nei bambini
- Inattività fisica
- Gravidanza o gravidanza recente
- Immunodeficienze primarie
- Fumo (attuale e precedente)
- Anemia falciforme o talassemia
- Trapianto di organi solidi o di cellule staminali
- Disturbi da uso di sostanze
- Tubercolosi
- Uso di corticosteroidi o altri farmaci immunosoppressivi

Possibili fattori di rischio, ma l'evidenza è mista (le comorbidità sono state associate a COVID-19 grave in almeno una meta-analisi o revisione sistematica, ma altri studi hanno raggiunto conclusioni diverse):

- Deficit di alfa 1 antitripsina
- Displasia broncopolmonare
- Epatite B
- Epatite C
- Ipertensione

Δ I bambini con le seguenti condizioni potrebbero essere a maggior rischio di malattia grave: complessità medica; condizioni genetiche, neurologiche o metaboliche; cardiopatia congenita; obesità; diabete; asma o altre malattie polmonari croniche; malattia a cellule falciformi; immunosoppressione.

1.5 Manifestazioni cliniche

Tra i pazienti con COVID-19 sintomatica, tosse, mialgie e cefalea sono i sintomi più comunemente riportati. Sono ben descritte anche altre caratteristiche, tra cui diarrea, mal di gola e anomalie dell'olfatto o del gusto. I sintomi respiratori lievi (es. congestione nasale, starnuti) sembrano essere più comuni con la variante Delta e Omicron¹⁷⁹. La polmonite è la manifestazione grave più frequente dell'infezione, caratterizzata principalmente da febbre, tosse, dispnea e infiltrati bilaterali alla diagnostica per immagini del torace^{12,13,180}. Sebbene alcune caratteristiche cliniche (in particolare disturbi dell'olfatto o del gusto) siano più comuni con COVID-19 rispetto ad altre infezioni respiratorie virali¹⁸¹, non esistono sintomi o segni specifici che possano distinguere in modo affidabile la COVID-19¹⁸². Tuttavia, lo sviluppo di dispnea circa una settimana dopo la comparsa dei sintomi iniziali può essere suggestivo di COVID-19.

In un rapporto su oltre 370.000 casi confermati di COVID-19 da gennaio a maggio 2020 con stato sintomatologico noto segnalati al CDC negli Stati Uniti, la tosse (50%), la febbre (43%), le mialgie (36%) e la cefalea (34%) sono stati i sintomi di presentazione più comuni¹⁵². Altri studi di coorte su pazienti con COVID-19 confermata hanno riportato una gamma simile di risultati clinici^{13,183-185}. In uno studio osservazionale che ha valutato i sintomi clinici riferiti da 63.000 casi confermati di COVID-19 in due periodi di tempo (da giugno a novembre 2021, quando predominava la variante Delta, e da dicembre 2021 a gennaio 2022, quando predominava la variante Omicron), la congestione nasale (dal 77 all'82%), il mal di testa (dal 75 al 78%), gli starnuti (dal 63 al 71%) e il mal di gola (dal 61 al 71%) sono stati i sintomi più comuni¹⁷⁹.

Febbre - La febbre non è un dato universale alla presentazione, anche tra le coorti ospedalizzate. In uno studio, la febbre è stata riportata in quasi tutti i pazienti, ma circa il 20% aveva una febbre di grado molto basso $<38^{\circ}\text{C}$ ¹³⁶. In un altro studio su 1099 pazienti di Wuhan e di altre aree della Cina, la febbre (definita come temperatura ascellare superiore a $37,5^{\circ}\text{C}$) era presente solo nel 44% dei pazienti al momento del ricovero, ma è stata riscontrata nell'89% durante l'ospedalizzazione¹⁸⁰. In uno studio su oltre 5.000 pazienti ricoverati con COVID-19 a New York, solo il 31% aveva una temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ alla presentazione¹³⁹.

Anomalie dell'olfatto e del gusto - In alcuni studi sono stati riportati frequentemente disturbi dell'olfatto e del gusto (ad esempio, anosmia e disgeusia)^{179,186,187}, anche se queste anomalie sembrano essere meno comuni con la variante Omicron¹⁷⁹. In un'indagine condotta in Italia su 202 pazienti ambulatoriali con COVID-19 lieve, il 64% ha riferito alterazioni dell'olfatto o del gusto e il 24% ha riferito alterazioni molto gravi; le alterazioni dell'olfatto o del gusto sono state riferite come unico sintomo nel 3% del totale e hanno preceduto i sintomi in un altro 12%¹⁸⁸. Tuttavia, il tasso di anomalie oggettive dell'olfatto o del gusto potrebbe essere inferiore a quello auto-riferito. La maggior parte dei disturbi soggettivi dell'olfatto e del gusto associati alla COVID-19 non sembra essere permanente; in una meta-analisi di 18 studi osservazionali, il 74 e il 96% ha recuperato l'olfatto e il 78 e il 98% il senso del gusto rispettivamente a 30 e a 180 giorni¹⁸⁹.

Sintomi gastrointestinali - Sebbene non siano stati riscontrati nella maggior parte dei pazienti, i sintomi gastrointestinali (ad esempio, nausea e diarrea) possono essere il disturbo più frequente in alcuni pazienti^{13,136,185,190}. In una revisione sistematica di studi che riportavano sintomi gastrointestinali in pazienti con COVID-19 confermata, la prevalenza complessiva era del 18%, con diarrea, nausea/vomito o dolore addominale riportati rispettivamente nel 13, 10 e 9%⁷².

Reperti dermatologici - Nei pazienti affetti da COVID-19 può verificarsi una serie di reperti dermatologici. Sono state segnalate eruzioni maculopapulari/morbilloformi, orticarioidi e vescicolari e livedo reticularis transitoria¹⁹¹. Sono stati descritti anche noduli rosso-violacei sulle dita distali simili a "geloni" o "dita dei piedi COVID", principalmente in adolescenti e giovani adulti con infezione altrimenti asintomatica o lieve; in alcuni casi, questi si sono sviluppati fino a diverse settimane dopo i sintomi iniziali della COVID-19¹⁹².

Altre manifestazioni - Può verificarsi talvolta congiuntivite⁷¹. Altre manifestazioni cliniche, come cadute, declino generale della salute e delirio, sono state segnalate negli adulti più anziani, in particolare in quelli di età superiore agli 80 anni e in quelli con sottostante compromissione neurocognitiva¹⁹³.

1.5.1 Decorso acuto e complicazioni

Come sopra descritto, l'infezione sintomatica può variare da lieve a critica.

Alcuni pazienti con sintomi inizialmente non gravi possono progredire nel corso di una settimana¹⁹⁴. In uno studio su 138 pazienti ricoverati a Wuhan per polmonite da SARS-CoV-2, la dispnea si è sviluppata dopo una media di cinque giorni dall'inizio dei sintomi e il ricovero in ospedale è avvenuto dopo una media di sette giorni di sintomi¹³. In un altro studio, il tempo mediano alla dispnea è stato di otto giorni¹³⁶.

Sono state descritte diverse complicanze del COVID-19:

- **Insufficienza respiratoria** - La sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) è la complicanza principale nei pazienti con malattia grave e può manifestarsi poco dopo l'inizio della dispnea. Nello studio di 138 pazienti sopra descritto, l'ARDS si è sviluppata nel 20% dei casi a una media di otto giorni dall'inizio dei sintomi; la ventilazione meccanica è stata attuata nel 12,3%¹³. In ampi studi condotti negli Stati Uniti, dal 12 al 24% dei pazienti ospedalizzati ha richiesto la ventilazione meccanica^{139,144}.
- **Complicanze cardiache e cardiovascolari** - Altre complicanze hanno incluso aritmie,

lesioni miocardiche, insufficienza cardiaca e shock^{13,195-197}.

- **Complicanze tromboemboliche** - Il tromboembolismo venoso, comprese le trombosi venose profonde estese e l'embolia polmonare, è comune nei pazienti con COVID-19 grave¹¹⁸, in particolare tra i pazienti in terapia intensiva (ICU), tra i quali i tassi riportati variano dal 10 al 40%¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Sono stati segnalati anche eventi trombotici arteriosi, tra cui ictus acuto (anche in pazienti di età inferiore a 50 anni senza fattori di rischio) e ischemia degli arti^{201,202}.
- **Complicanze neurologiche** - L'encefalopatia è una complicanza comune della COVID-19, in particolare tra i pazienti in condizioni critiche; ad esempio, in una serie di pazienti ospedalizzati, l'encefalopatia è stata riportata in un terzo dei casi²⁰³. Ictus, disturbi del movimento, deficit motori e sensoriali, atassia e convulsioni si verificano meno frequentemente.
- **Complicanze infiammatorie** - Alcuni pazienti con COVID-19 grave presentano evidenze di laboratorio di una risposta infiammatoria esuberante, con febbre persistente, marcatori infiammatori elevati (ad esempio, D-dimero, ferritina) e citochine proinfiammatorie elevate; queste anomalie di laboratorio sono state associate a malattie critiche e fatali^{136,204,205}. Sebbene queste caratteristiche siano state assimilate alla sindrome da rilascio di citochine (ad esempio, in risposta all'immunoterapia con cellule T), i livelli di citochine proinfiammatorie nel COVID-19 sono sostanzialmente inferiori a quelli osservati nella sindrome da rilascio di citochine e nella sepsi²⁰⁶. Sono stati descritti casi di sindrome di Guillain-Barré, con esordio da 5 a 10 giorni dopo i sintomi iniziali²⁰⁷. Nei bambini affetti da COVID-19 è stata descritta anche una sindrome infiammatoria multisistemica con caratteristiche cliniche simili a quelle della malattia di Kawasaki e della sindrome da shock tossico. Nei rari adulti in cui è stata segnalata, questa sindrome è stata caratterizzata da marcatori infiammatori elevati e disfunzione multiorgano (in particolare disfunzione cardiaca)^{208,209}.
- **Infezioni secondarie** - Le infezioni secondarie si verificano in una minoranza di pazienti con COVID-19²¹⁰⁻²¹³. In una revisione sistematica di 118 studi, il tasso di coinfezioni batteriche (identificate al momento della diagnosi di COVID-19) era dell'8% e il tasso di superinfezioni batteriche (identificate durante l'assistenza per COVID-19) era del 20%²¹⁴. *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* erano i patogeni coinfezzanti più comuni, mentre *Acinetobacter spp* era il patogeno superinfettante più comune. Una meta-analisi di 22 studi ha esaminato le superinfezioni batteriche, fungine e virali e ha rilevato un tasso di superinfezione del 16%²¹³. Il virus di Epstein-Barr è stato l'organismo più frequente, seguito da *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Hemophilus influenzae* e aspergilloso polmonare invasiva. Le superinfezioni fungine rappresentano un rischio in alcune popolazioni. Diversi lavori hanno descritto l'aspergilloso invasiva tra i pazienti immunocompetenti gravemente malati con ARDS da COVID-19, sebbene la frequenza vari ampiamente a causa delle differenze nei criteri diagnostici²¹⁵⁻²¹⁷. Sono stati riportati anche casi di mucormicosi in pazienti con COVID-19 acuta e recente, in particolare dall'India; la regione rino-orbitale è il sito più comune di infezione e i fattori di rischio includono il diabete mellito e l'assunzione di glucocorticoidi²¹⁸.

1.5.2 Recupero e sequele a lungo termine

Il tempo di recupero dal COVID-19 è molto variabile e dipende dall'età, dallo stato vaccinale e dalle comorbidità preesistenti, oltre che dalla gravità della malattia. I soggetti con infezione lieve dovrebbero riprendersi in tempi relativamente brevi (ad esempio, entro due settimane), mentre per molti soggetti con malattia grave i tempi di recupero sono più lunghi (ad esempio, da due a tre mesi). I sintomi persistenti più comuni includono affaticamento, problemi di memoria, dispnea, dolore toracico, tosse e deficit cognitivi²¹⁹.

1.5.3 Alterazioni laboratoristiche

. Un'ampia meta-analisi che ha valutato le caratteristiche clinico-patologiche di 8697 pazienti con COVID-19 in Cina ha riportato anomalie di laboratorio che includevano linfopenia (47,6%), livelli elevati di proteina C-reattiva (65,9%), enzimi cardiaci elevati (49,4%) e anomalie di laboratorio. Altre anomalie di laboratorio includevano leucopenia (23,5%), D-dimero elevato (20,4%), velocità di eritrosedimentazione elevata (20,4%), leucocitosi (9,9%), procalcitonina elevata (16,7%) e anomalie della funzionalità renale (10,9%)²²⁰.

1.6 Diagnosi e valutazione

È buona norma che venga raccolta un'anamnesi clinica dettagliata riguardante l'insorgenza e la durata dei sintomi, l'anamnesi dei viaggi, l'esposizione a persone con infezione da COVID-19, le condizioni mediche preesistenti e l'anamnesi farmacologica. I pazienti con segni clinici tipici sospetti di COVID-19, come febbre, tosse, mal di gola, perdita del gusto o dell'olfatto, malessere e mialgie, devono essere sottoposti tempestivamente al test per SARS-CoV-2. Oltre ai pazienti sintomatici, i pazienti con sintomi atipici di COVID-19 o chiunque abbia un'esposizione nota ad alto rischio al SARS-CoV-2 deve essere sottoposto a test per l'infezione da SARS-CoV-2 anche in assenza di sintomi.

1.6.1 Test diagnostici

Test molecolari

La modalità diagnostica standard consiste nell'analizzare un tampone nasofaringeo per la ricerca dell'acido nucleico del SARS-CoV-2 mediante un test molecolare. I test PCR commerciali sono stati convalidati dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense con autorizzazioni per l'uso in emergenza (EUA) per la rilevazione qualitativa dell'acido nucleico del SARS-CoV-2 da campioni ottenuti da tamponi nasofaringei e da altri siti come orofaringe, tamponi nasali anteriori/medi, aspirati nasofaringei, lavaggi broncoalveolari (BAL) e saliva. La raccolta di campioni di BAL deve essere effettuata solo nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica, poiché i campioni delle basse vie respiratorie sembrano rimanere positivi per un periodo più lungo.

La sensibilità del test PCR dipende da molteplici fattori, tra cui l'adeguatezza del campione, la tecnica di raccolta del campione, il tempo trascorso dall'esposizione e la fonte del campione²²¹. Tuttavia, la specificità della maggior parte dei test PCR per SARS-CoV-2 approvati dalla FDA è quasi del 100%, a condizione che non vi sia contaminazione incrociata durante il trattamento del campione.

I test per l'antigene della SARS-CoV-2 sono meno sensibili, ma hanno tempi di esecuzione più rapidi rispetto ai test di PCR molecolare²²². Per pazienti selezionati si dovrebbero prendere in considerazione anche test completi per altri patogeni virali respiratori.

Test sierologici

Un test anticorpale può valutare la presenza di anticorpi in seguito all'infezione. I test anticorpali svolgono un ruolo importante nella sorveglianza del COVID-19 e sono disponibili molti kit commerciali per valutare la presenza di anticorpi contro SARS-CoV-2.

Nonostante i numerosi test anticorpali progettati fino ad oggi, i test sierologici hanno limiti di specificità e sensibilità e i risultati dei diversi test variano. Il test sierologico può essere utile

per un'ampia sorveglianza del COVID-19 e per valutare l'immunità conferita dall'infezione o dalla vaccinazione. Attualmente sono in corso ricerche per determinare gli aspetti quantitativi e qualitativi degli anticorpi per quanto riguarda la protezione da future infezioni da SARS-CoV-2 e la durata della protezione.

Altre valutazioni di laboratorio

In tutti i pazienti ricoverati dovrebbero essere eseguiti un'emocromo completo, un pannello metabolico completo che includa test di funzionalità renale ed epatica e un pannello per il profilo della coagulazione.

Nei pazienti ricoverati si possono prendere in considerazione ulteriori esami, come la ricerca di marcatori infiammatori quali VES, proteina C-reattiva, ferritina, lattato deidrogenasi, D-dimero e procalcitonina.

1.6.2 Diagnostica radiologica

Considerando che questa malattia virale si manifesta comunemente come polmonite, la diagnostica per immagini ha un ruolo fondamentale nel processo diagnostico, nella gestione e nel follow-up. Gli studi di imaging possono includere radiografia del torace, ecografia polmonare o tomografia computerizzata (TC) del torace. Non sono disponibili linee guida sulla tempistica e sulla scelta degli studi di imaging polmonare nei pazienti con COVID-19 e il tipo di imaging deve essere considerato in base alla valutazione clinica.

Radiografia del torace

L'esame radiografico standard (RX) del torace ha una bassa sensibilità nell'identificare le prime alterazioni polmonari; può essere completamente normale nelle fasi iniziali della malattia.

Nelle fasi più avanzate dell'infezione, l'esame radiografico del torace mostra comunemente opacità alveolari multifocali bilaterali, che tendono a confluire fino all'opacità completa del polmone. Può essere dimostrato anche un versamento pleurico.

In uno studio retrospettivo su 64 pazienti di Hong Kong con COVID-19 documentata, il 20% non presentava alcuna anomalia alla radiografia del torace in nessun momento della malattia²²³. I risultati radiografici anomali più comuni erano consolidamento e opacità ground-glass, con distribuzione bilaterale, periferica e nella zona inferiore del polmone; il coinvolgimento polmonare aumentava nel corso della malattia, con un picco di gravità a 10-12 giorni dall'inizio dei sintomi. Sono stati descritti anche casi di pneumotorace spontaneo, sebbene sia relativamente poco frequente²²⁴.

TC del torace

Sebbene la tomografia computerizzata (TC) del torace possa essere più sensibile della radiografia del torace e alcuni reperti della TC del torace possano essere caratteristici di COVID-19, nessun reperto può confermare o escludere completamente la possibilità di COVID-19. Negli Stati Uniti, l'American College of Radiology (ACR) raccomanda di non utilizzare la TC del torace per lo screening o la diagnosi della COVID-19 e di riservarla ai pazienti ricoverati in ospedale, se necessario per la gestione²²⁵. In caso venga eseguita una TC, la Radiological Society of North America ha classificato le caratteristiche come tipiche, indeterminate o atipiche per COVID-19²²⁶.

La TC del torace nei pazienti con COVID-19 mostra più comunemente opacità a vetro smerigliato con o senza anomalie consolidative, coerenti con una polmonite virale (Fig. 3)^{184,227,228}. Ad esempio, in una revisione sistematica di studi che hanno valutato i risultati della TC del torace in oltre 2700 pazienti con COVID-19, sono state rilevate le seguenti anomalie²²⁹:

- Opacità a vetro smerigliato - 83%.
- Opacità a vetro smerigliato con consolidamento misto - 58%.
- Addensamento pleurico adiacente - 52%.
- Ispessimento del setto interlobulare - 48%.
- Broncogrammi aerei - 46%.

Altri reperti meno comuni sono stati un pattern tipo “crazy-paving” (opacizzazioni a vetro smerigliato con ispessimento settale sovrapposto), bronchiectasie, versamento pleurico, versamento pericardico e linfadenopatie.

Le anomalie della TC del torace nella COVID-19 sono spesso bilaterali, hanno una distribuzione periferica e coinvolgono i lobi inferiori.

Questi risultati comuni nel COVID-19, non sono esclusivi e vengono frequentemente riscontrati in altre polmoniti virali (Fig. 4)^{230,231}. In uno studio condotto a Wuhan su 1014 pazienti sottoposti a test RT-PCR e TC del torace per la valutazione della COVID-19, una TC del torace "positiva" per la COVID-19 (determinata da un consenso di due radiologi) aveva una sensibilità del 97%, utilizzando i test PCR come riferimento; tuttavia, la specificità era solo del 25%²³². La bassa specificità potrebbe essere legata ad altre eziologie che causano risultati TC simili. In un altro studio che ha confrontato le TC del torace di 219 pazienti con COVID-19 in Cina e 205 pazienti con altre cause di polmonite virale negli Stati Uniti, i casi di COVID-19 avevano una maggiore probabilità di avere una distribuzione periferica (80 contro 57%), opacità ground-glass (91 contro 68%), opacità reticolari fini (56 contro 22%), ispessimento vascolare (59 contro 22%) e un “halo sign” inverso (11 contro 1 %), ma meno probabilità di avere una distribuzione centrale e periferica (14 contro 35 %), broncogramma aereo (14 contro 23 %), ispessimento pleurico (15 contro 33 %), versamento pleurico (4 contro 39 %) e linfadenopatia (2.7 contro 10 %)²³³.

Come nel caso della radiografia del torace, la TC del torace può essere normale subito dopo l'inizio dei sintomi, mentre è più probabile che le anomalie si sviluppino nel corso della malattia¹⁸³. Tuttavia, anomalie della TC del torace sono state identificate anche in pazienti prima dello sviluppo dei sintomi e persino prima della rilevazione dell'RNA virale dai campioni delle vie respiratorie superiori¹⁸⁴.

Tra i pazienti che migliorano clinicamente, la risoluzione delle anomalie radiografiche può essere in ritardo rispetto al miglioramento della febbre e dell'ipossia.

Ecografia polmonare

L'ecografia polmonare point-of-care è stata descritta per la valutazione del coinvolgimento polmonare in pazienti con sospetto COVID-19 quando altre risorse di imaging non sono prontamente disponibili. I risultati dell'ecografia polmonare in pazienti con COVID-19 documentata hanno incluso l'ispessimento e l'interruzione della linea pleurica; linee B visibili sotto la pleura che appaiono distinte, multifocali o confluenti; consolidamenti a chiazze, a strie e nodulari; segni di broncogramma aereo nei consolidamenti^{234,235}. Sebbene l'ecografia sembri essere relativamente sensibile per la diagnosi di COVID-19, alcuni studi hanno riportato una bassa specificità. In una revisione sistematica di cinque studi, la sensibilità e la specificità in pool erano rispettivamente dell'86 e del 55%²³¹. Nel corso della malattia è possibile identificare una prima fase con aree focali di linee B fisse seguita da una fase di aumento numerico delle linee B fino al polmone bianco con piccoli ispessimenti subpleurici, che progredisce ulteriormente fino all'evidenza di consolidazioni posteriori.

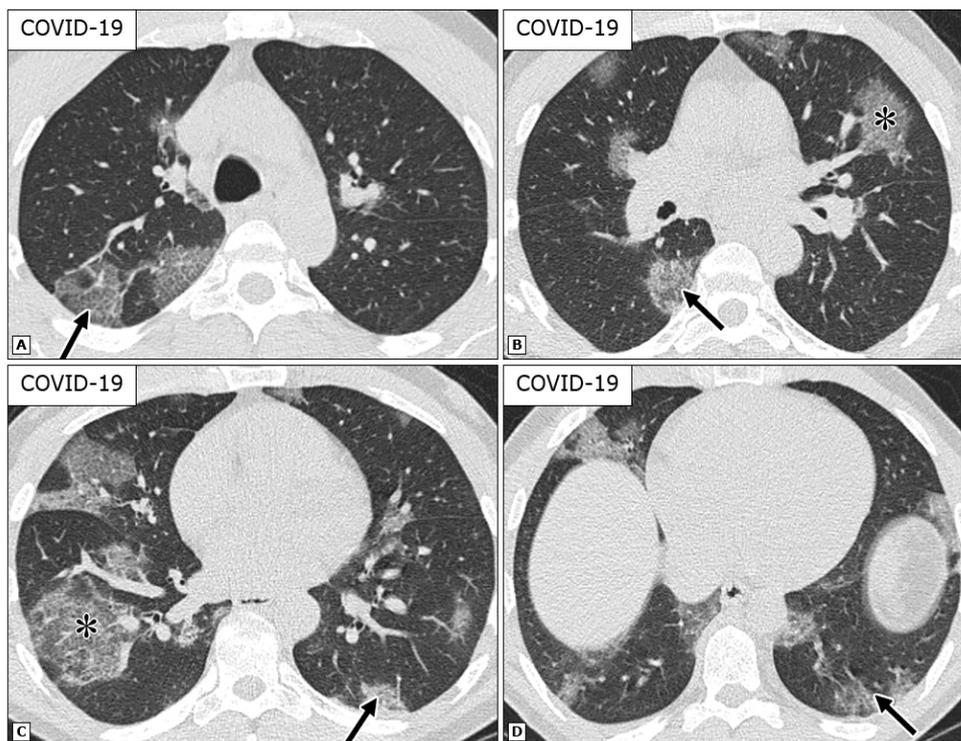


FIGURA 3. Caratteristiche tipiche dell'imaging TC per COVID-19. Le immagini assiali a sezione sottile non potenziate dei polmoni di un uomo di 52 anni con RT-PCR positiva (da A a D) mostrano GGO bilaterali e multifocali arrotondate (asterischi) e periferiche (freccie) con ispessimento del setto interlobulare sovrapposto e linee intralobulari visibili ("crazy-paving").
Adattato da: Simpson S, Kay FU, Abbara S, et al. Radiological Society of North America Expert Consensus Document on Reporting Chest CT Findings Related to COVID-19: Endorsed by the Society of Thoracic Radiology, the American College of Radiology, and RSNA. *Radiology: Cardiothoracic Imaging* 2020

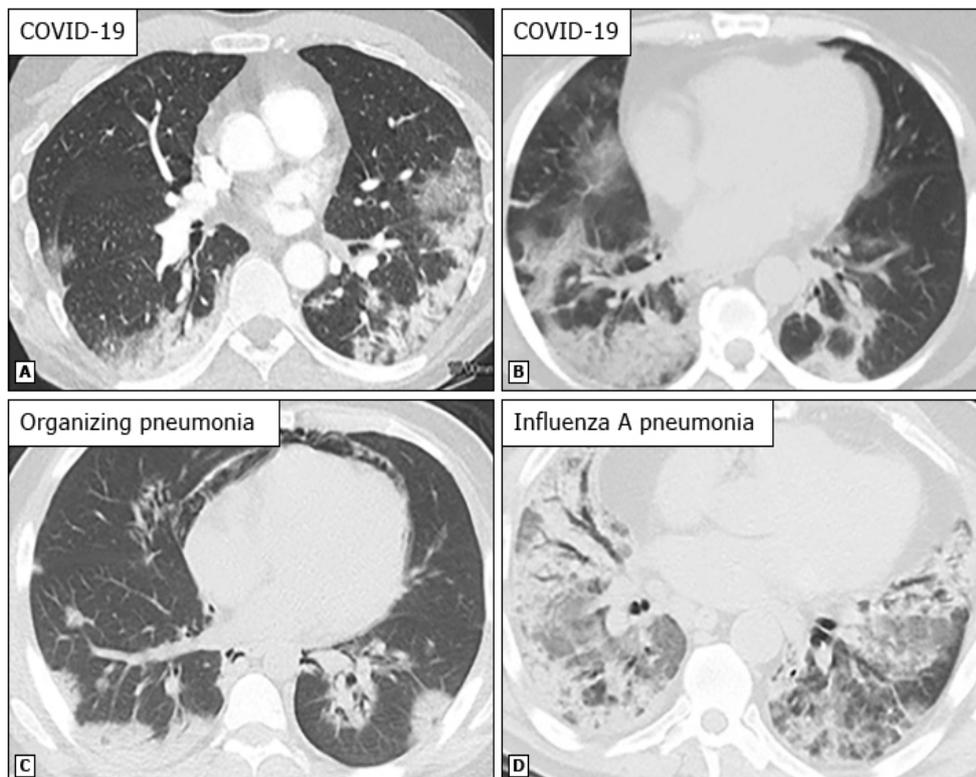


FIGURA 4. Caratteristiche tipiche dell'imaging TC di COVID-19 e altre malattie con reperti simili. Opacità "ground-glass" e consolidamento posteriore, periferico e arrotondeggiante nelle immagini assiali di quattro pazienti: COVID-19 (A, B), polmonite organizzata secondaria a dermatomiosite (C) e polmonite da influenza A (D).
Adattato da: Simpson S, Kay FU, Abbara S, et al. Radiological Society of North America Expert Consensus Document on Reporting Chest CT Findings Related to COVID-19: Endorsed by the Society of Thoracic Radiology, the American College of Radiology, and RSNA. *Radiology: Cardiothoracic Imaging* 2020

1.7 Gestione e trattamento

All'inizio della pandemia, la comprensione del COVID-19 e della sua gestione terapeutica è stata limitata, creando l'urgenza di mitigare questa nuova malattia virale con terapie sperimentali e riproponendo farmaci con potenziali effetti benefici. Da allora, grazie all'intenso impegno dei ricercatori clinici di tutto il mondo, sono stati compiuti progressi significativi, che hanno portato a una migliore comprensione non solo del COVID-19 e della sua gestione, ma anche allo sviluppo di nuove terapie e allo sviluppo di vaccini a una velocità senza precedenti grazie allo sforzo della comunità scientifica globale.

Attualmente sono disponibili diverse opzioni terapeutiche che includono farmaci antivirali (ad esempio, molnupiravir, paxlovid, remdesivir), anticorpi monoclonali anti-SARS-CoV2 (ad esempio, bamlanivimab/etesevimab, casirivimab/imdevimab), farmaci antinfiammatori (ad esempio, desametasone), agenti immunomodulatori (ad esempio, baricitinib, tocilizumab) sono disponibili con autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) rilasciata dalla FDA o in fase di valutazione per la gestione della COVID-19¹¹⁴.

L'utilità clinica di questi trattamenti è specifica e si basa sulla gravità della malattia o su determinati fattori di rischio. Il decorso clinico della malattia COVID-19 si presenta in due fasi, una fase iniziale in cui la replicazione del SARS-CoV-2 è massima prima o subito dopo la comparsa dei sintomi. I farmaci antivirali e i trattamenti a base di anticorpi sono probabilmente più efficaci in questa fase di replicazione virale. La fase successiva della malattia è guidata da uno stato iper-infiammatorio indotto dal rilascio di citochine e dall'attivazione del sistema di coagulazione che causa uno stato protrombotico²²².

1.7.1 Indicazioni al trattamento

In ambito ambulatoriale, si raccomanda il trattamento con una terapia specifica per il COVID-19 per gli adulti sintomatici che presentano malattia da lieve a moderata (cioè senza ipossia) e che sono ad aumentato rischio di progressione verso la malattia grave in base all'età avanzata, allo stato immunitario, all'anamnesi di vaccinazione contro la COVID-19 e alle comorbidità associate alla progressione.

In particolare, si raccomanda una terapia specifica per COVID-19 per i pazienti ambulatoriali sintomatici appartenenti alle seguenti categorie:

- Adulti di età ≥ 65 anni, indipendentemente dallo stato vaccinale o da altri fattori di rischio per la malattia grave. I soggetti con fattori di rischio (tabella 4) beneficeranno probabilmente di più del trattamento rispetto a quelli senza, perché il loro rischio di malattia grave può essere più elevato. Tuttavia, la sola età avanzata è probabilmente associata a un rischio di progressione sufficientemente elevato da giustificare una terapia specifica per la COVID-19.

- Adulti di qualsiasi età che presentano una condizione di immunocompromissione da moderata a grave (tabella 4), indipendentemente dallo stato di vaccinazione. Questi soggetti possono avere una risposta vaccinale subottimale e il beneficio atteso dal trattamento in questi soggetti è sostanziale. Adulti di qualsiasi età che presentano molteplici fattori di rischio per la progressione verso la malattia grave (tabella 1), indipendentemente dallo stato vaccinale.

- Adulti di età ≥ 50 anni che non sono vaccinati, indipendentemente dai fattori di rischio. In particolare, si raccomanda una terapia specifica per COVID-19 per coloro che non sono stati vaccinati e non hanno una storia di infezione precedente. I dati sul beneficio di queste terapie sono più solidi per le popolazioni non vaccinate.

Non viene utilizzata terapia specifica per COVID-19 per i soggetti che non soddisfano i criteri di eleggibilità, in particolare in individui sintomatici senza fattori di rischio per la progressione a malattia grave e in soggetti con infezione asintomatica da SARS-CoV2.

Se i pazienti sviluppano dispnea, si teme che abbiano una malattia di gravità almeno moderata, e questi pazienti spesso richiedono l'ospedalizzazione. I pazienti possono presentare infiltrati alla diagnostica per immagini del torace ed essere comunque considerati affetti da malattia moderata, ma la presenza di ipossiemia (saturazione di ossigeno $\leq 94\%$ con aria ambiente) e necessità di ossigenazione o di supporto ventilatorio indica una malattia grave.

Di seguito è riportato un riepilogo delle ultime potenziali opzioni terapeutiche proposte, autorizzate o approvate per l'uso clinico nella gestione del COVID-19.

1.7.2 Terapie antivirali

- **Molnupiravir** - è un agente antivirale orale ad azione diretta e ad ampio spettro che agisce sull'enzima RdRp ed è stato inizialmente sviluppato come possibile trattamento antivirale per l'influenza, gli alfavirus, compresi i virus dell'encefalite equina orientale, occidentale e venezuelana. Sulla base di una meta-analisi degli studi di fase 1-3 disponibili, è stato osservato che molnupiravir ha dimostrato una riduzione significativa dell'ospedalizzazione e della morte nella malattia COVID-19 lieve²³⁶. I risultati di uno studio di fase 3 in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo hanno riportato che il trattamento precoce con molnupiravir ha ridotto il rischio di ospedalizzazione o di morte negli adulti a rischio non vaccinati con Covid-19 lieve-moderato, confermato in laboratorio²³⁷.
- **Paxlovid** (ritonavir in combinazione con nirmatrelvir) - è una pillola orale di combinazione di due agenti antivirali che, da un'analisi ad interim dei dati di fase 2-3 che includeva 1219 pazienti, ha rilevato che il rischio di ricovero ospedaliero o di mortalità per tutte le cause correlato al COVID-19 era inferiore dell'89% nel gruppo paxlovid rispetto al placebo, se iniziato entro tre giorni dalla comparsa dei sintomi. Il 22 dicembre 2021, la FDA ha rilasciato un'autorizzazione all'uso di Paxlovid per i pazienti con COVID-19 da lieve a moderata²³⁸.
- **Remdesivir** - è un agente antivirale ad ampio spettro che ha precedentemente dimostrato in vitro un'attività antivirale contro il SARS-CoV-2²³⁹. Sulla base dei risultati di tre studi clinici randomizzati e controllati che hanno dimostrato la superiorità di remdesivir rispetto al placebo nell'abbreviare il tempo di guarigione negli adulti ricoverati con COVID-19 da lieve a grave, la Food Drug Administration (FDA) statunitense ha approvato remdesivir per l'uso clinico negli adulti e nei pazienti pediatrici (di età superiore ai 12 anni e di peso pari o superiore a 40 kg) per il trattamento di pazienti ospedalizzati con COVID-19²⁴⁰⁻²⁴². Tuttavia, i risultati dello studio SOLIDARITY dell'OMS, condotto in 405 ospedali di 40 Paesi e che ha coinvolto 11.330 pazienti con COVID-19 randomizzati a ricevere remdesivir (2750) o nessun farmaco (4088), hanno evidenziato che remdesivir ha avuto un effetto minimo o nullo sulla mortalità complessiva, sull'inizio della ventilazione meccanica e sulla durata della degenza²⁴³. Uno studio randomizzato in doppio cieco controllato con placebo, pubblicato di recente, ha riportato un rischio di ospedalizzazione o di morte inferiore dell'87% rispetto al placebo quando i pazienti a rischio non ospedalizzati con COVID-19 sono stati trattati con un ciclo di 3 giorni di remdesivir²⁴⁴. Non sono disponibili dati sull'efficacia del remdesivir contro le nuove varianti di SARS-CoV2; tuttavia, l'acquisizione di resistenza contro i virus mutanti è un problema potenziale e deve essere monitorato.

1.7.3 Anticorpi monoclonali

Un anticorpo monoclonale anti-SARS-CoV2 è un'opzione alternativa per la terapia specifica per il COVID-19 nei pazienti ambulatoriali sintomatici con rischio di progressione a malattia grave^{245,246}. Tuttavia, gli anticorpi monoclonali hanno un'attività variabile contro le diverse varianti di SARS-CoV2 e la selezione dell'agente deve considerare la suscettibilità delle varianti circolanti. Inoltre, gli anticorpi monoclonali richiedono una somministrazione parenterale e devono essere somministrati precocemente nel corso della malattia; questi fattori possono rendere complicata la somministrazione in molti contesti ambulatoriali.

- **Casirivimab e Imdevimab:** è un cocktail di anticorpi contenente due anticorpi IgG1 non competitivi (casirivimab e imdevimab) che hanno come bersaglio la RBD sulla proteina spike della SARS-CoV-2 e che hanno dimostrato di ridurre la carica virale in vivo, prevenendo le sequele patologiche indotte dal virus quando somministrati a scopo profilattico o terapeutico in primati non umani²⁴⁷. I risultati di un'analisi ad interim di 275 pazienti di uno studio in doppio cieco in corso che coinvolge pazienti non ospedalizzati affetti da COVID-19 e che sono stati randomizzati a ricevere placebo, 2,4 g di REGN-COV2 (casirivimab 1.200 mg e imdevimab 1.200 mg) o 4,8 g di REGN-COV2 (casirivimab 2.400 mg e imdevimab 2.400 mg) hanno riportato che il cocktail di anticorpi REGN-COV2 ha ridotto la carica virale rispetto al placebo. Questa analisi ad interim ha anche stabilito il profilo di sicurezza di questo cocktail di anticorpi, simile a quello del gruppo placebo²⁴⁶. I dati preliminari di uno studio di Fase 3 di REGN-COV (casirivimab/imdevimab) hanno rivelato una riduzione del 70% dei ricoveri o dei decessi nei pazienti non ospedalizzati affetti da COVID-19. Sono disponibili dati in vitro relativi all'effetto di REGN-COV2 sulle due nuove varianti di SARS-CoV-2 che destano preoccupazione (varianti B.1.1.7; B.1.351) e che rivelano un'attività conservata. Un recente studio preprint di Wilhelm et al. ha riportato che la variante SARS-CoV-2 Omicron era resistente a casirivimab e imdevimab nel loro studio in vitro²⁴⁸. La dose ad oggi raccomandata in Italia è di 600 mg di casirivimab e 600mg di imdevimab.
- **Bamlanivimab ed Etesevimab (LY-CoV555 o LY3819253 e LY-CoV016 o LY3832479)** - sono potenti anticorpi monoclonali neutralizzanti anti-spike. Esperimenti in vitro hanno rivelato che etesevimab si lega a un epitopo diverso da quello di bamlanivimab e neutralizza le varianti resistenti con mutazioni nell'epitopo legato da bamlanivimab. Nella fase 2 dello studio BLAZE-1, bamlanivimab/etesevimab è stato associato a una riduzione significativa della carica virale di SARS-CoV2 rispetto al placebo²⁴⁹. I dati della fase 3 di BLAZE-1 sono in attesa di pubblicazione, ma le informazioni preliminari indicano che la terapia ha ridotto il rischio di ospedalizzazione e di morte dell'87%. I dati in vitro disponibili sull'effetto di bamlanivimab/etesevimab sulle nuove varianti del SARS-CoV2 che destano preoccupazione (B.1.1.7; B.1.351) rivelano un'attività conservata²⁵⁰.
- **Tixagevimab-cilgavimab** - è approvato anche per la profilassi pre-esposizione e nel trattamento precoce di soggetti con SARS-CoV2 a rischio di progressione in forma grave. La combinazione di anticorpi monoclonali viene somministrata sotto forma di due iniezioni intramuscolari separate di tixagevimab (300 mg) e cilgavimab (300 mg). Queste dosi sono doppie rispetto a quelle originariamente autorizzate, a causa del timore di una ridotta attività neutralizzante nei confronti di Omicron; ai soggetti che hanno ricevuto la dose inferiore (150 mg di ciascun anticorpo) nei tre mesi precedenti si consiglia di ricevere un'ulteriore dose di 150 mg di ciascun anticorpo per raggiungere livelli equivalenti a quelli successivi alla dose superiore, mentre a coloro che hanno ricevuto la dose inferiore più di tre mesi prima si consiglia di ricevere nuovamente tixagevimab e cilgavimab alla dose completa di 300 mg di ciascun anticorpo.

L'autorizzazione per questa combinazione di anticorpi monoclonali si è basata sui dati provvisori di uno studio randomizzato condotto su oltre 5.000 adulti di 18 anni o più che non avevano ricevuto la vaccinazione COVID-19, non avevano una storia di precedente infezione da SARS-CoV-2 ed erano a rischio di malattia grave (a causa dell'età ≥ 60 anni o di comorbidità mediche) o di esposizione al SARS-CoV-2²⁵¹. Circa il 4% aveva una condizione di immunocompromissione. Una singola dose di tixagevimab-cilgavimab ha ridotto il rischio di infezione sintomatica del 77% rispetto al placebo per una mediana di tre mesi (0,2 contro 1,0% di tasso COVID-19; 95% CI 46-90% di riduzione del rischio relativo). L'effetto è stato simile tra i pazienti con follow-up fino a sei mesi. Tutti e cinque i casi di COVID-19 grave ed entrambi i decessi per COVID-19 si sono verificati nel gruppo placebo. In uno studio retrospettivo su riceventi di trapianti di organi solidi che avevano ricevuto almeno una dose di vaccino COVID-19, il tasso di infezione da SARS-CoV-2 è risultato inferiore tra i 222 che avevano ricevuto tixagevimab-imdevimab rispetto ai 222 controlli appaiati (5 contro 14%)²⁵². Lo studio con tixagevimab-cilgavimab è stato condotto prima della comparsa di Omicron e delle sue sottovarianti, che da allora sono predominanti nella maggior parte del mondo. L'efficacia contro le sottovarianti di Omicron è incerta. Alcuni studi in vitro suggeriscono che tixagevimab-cilgavimab mantiene un'attività neutralizzante contro Omicron (sottolinee BA.1, BA.2, BA.4 e BA.5), ma a livelli ridotti (ad esempio, in uno studio, 344 volte meno per BA.1 e 9 volte meno per BA.2 rispetto a Delta)^{33,253-256}. Come già menzionato, a causa di questi risultati è ora raccomandata una dose più elevata di tixagevimab-cilgavimab.

1.7.4 Farmaci Immunomodulanti

- **Corticosteroidi** – La malattia grave da SARS-CoV2 è associata a un danno polmonare legato all'infiammazione, guidato dal rilascio di citochine e caratterizzato da un aumento dei marcatori infiammatori. Durante la fase iniziale della pandemia, l'efficacia dei glucocorticoidi nei pazienti con COVID-19 non era ben descritta. Lo studio RECOVERY (Randomized Evaluation of Covid-19 Therapy), che ha incluso pazienti ospedalizzati con infezione da SARS-CoV-2 clinicamente sospetta o confermata in laboratorio, randomizzati a ricevere desametasone (n=2104) o trattamento standard (n=4321), ha dimostrato che l'uso di desametasone ha comportato una minore mortalità a 28 giorni nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica invasiva o a supporto di ossigeno, ma non in quelli che non ricevevano alcun supporto respiratorio²⁵⁷. Sulla base dei risultati di questo studio di riferimento, il desametasone è attualmente considerato lo standard di cura, da solo o in combinazione con il remdesivir, in base alla gravità della malattia, nei pazienti ospedalizzati che richiedono ossigeno supplementare o ventilazione meccanica non invasiva o invasiva.
- **Anakinra** - è un antagonista del recettore dell'interleuchina-1 approvato dalla FDA per il trattamento dell'artrite reumatoide. Il suo uso off-label nel COVID-19 grave è stato valutato in un piccolo studio caso-controllo basato sul rationale che la COVID-19 grave è guidata dalla produzione di citochine, tra cui l'interleuchina (IL)-1 β . Questo studio ha rivelato che tra i 52 pazienti che hanno ricevuto anakinra e i 44 pazienti che hanno ricevuto le cure standard, anakinra ha ridotto la necessità di ventilazione meccanica invasiva e la mortalità nei pazienti con COVID-19 grave²⁵⁸. Non sono disponibili dati sull'efficacia degli antagonisti del recettore dell'interleuchina-1 sulle tre nuove varianti di SARS-CoV-2 (B.1.1.7; B.1.351 e P.1). Data l'insufficienza dei dati relativi a questo trattamento, basato solo su serie di casi, non è attualmente raccomandato per il trattamento dell'infezione da COVID-19.
- **Tocilizumab** - è un anticorpo monoclonale anti-interleuchina-6 recettore alfa che è stato indicato per diverse malattie reumatologiche. I dati relativi all'uso di questo agente

sono contrastanti. Uno studio di controllo randomizzato che ha coinvolto 438 pazienti ospedalizzati con polmonite grave da COVID-19, di cui 294 sono stati randomizzati a ricevere tocilizumab e 144 a ricevere placebo, ha dimostrato che tocilizumab non si è tradotto in un miglioramento significativo dello stato clinico o in una riduzione della mortalità a 28 giorni rispetto al placebo²⁵⁹. I risultati di un altro studio randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, che ha coinvolto 243 pazienti con COVID-19 grave confermata, randomizzati a ricevere tocilizumab o placebo, hanno dimostrato che l'uso di tocilizumab non è stato efficace nel prevenire l'intubazione o il tasso di mortalità²⁶⁰. Gli studi REMAP-CAP e RECOVERY (non ancora pubblicati), due ampi studi randomizzati controllati, hanno mostrato un beneficio in termini di mortalità nei pazienti che presentavano uno scompenso respiratorio rapido²⁶¹.

- **Sarilumab** - è un antagonista del recettore dell'IL-6 che potenzialmente potrebbe avere un effetto simile a quello del tocilizumab sullo stato iperinflammatorio associato a COVID-19. Attualmente non esistono studi clinici pubblicati che supportino l'uso di siltuximab nella COVID-19 grave. Uno studio multinazionale di fase 3, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, della durata di 60 giorni, che ha valutato l'efficacia clinica, la mortalità e la sicurezza di sarilumab in 431 pazienti, non avrebbe mostrato un miglioramento significativo dello stato clinico o del tasso di mortalità²⁶². Un altro studio randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, sull'efficacia clinica e la sicurezza di sarilumab in pazienti adulti ricoverati con COVID-19 è attualmente in corso (NCT04315298).
- **Baricitinib** - è un inibitore selettivo orale delle Janus chinasi (JAK) 1 e 2 attualmente indicato per i pazienti affetti da artrite reumatoide (AR) da moderata a gravemente attiva. Il baricitinib è stato considerato un potenziale trattamento per COVID-19 in base al suo effetto inibitorio sull'endocitosi del SARS-CoV-2 in vitro e sulla via di segnalazione intracellulare delle citochine che causano lo stato iperinflammatorio a insorgenza tardiva che si traduce in manifestazione grave di malattia^{263,264}. Questo duplice effetto inibitorio lo rende un promettente farmaco terapeutico contro tutti gli stadi del COVID-19. Uno studio multicentrico osservazionale e retrospettivo su 113 pazienti ospedalizzati con polmonite da COVID-19 che hanno ricevuto baricitinib in combinazione con lopinavir/ritonavir (braccio baricitinib, n=113) o idrossiclorochina e lopinavir/ritonavir (braccio di controllo, n=78) ha riportato un miglioramento significativo dei sintomi clinici e del tasso di mortalità a 2 settimane nel braccio baricitinib rispetto al braccio di controllo. I risultati dello studio ACTT-2, uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, che ha valutato baricitinib più remdesivir in pazienti adulti ospedalizzati con COVID-19, hanno riportato che la terapia combinata di baricitinib più remdesivir è stata superiore alla sola terapia con remdesivir non solo nel ridurre i tempi di recupero, ma anche nell'accelerare il miglioramento clinico nei pazienti ospedalizzati con COVID-19, in particolare quelli che ricevevano un'integrazione di ossigeno ad alto flusso o una ventilazione non invasiva²⁶⁵. Baricitinib, in combinazione con remdesivir, è stato approvato per l'uso clinico in pazienti ospedalizzati con COVID-19 in base a una EUA rilasciata dalla FDA. L'efficacia di baricitinib da solo o in combinazione con remdesivir non è stata valutata nelle varianti della SARS-CoV-2 e ci sono dati limitati sull'uso di baricitinib con desametasone.

1.7.5 Gestione dell'ossigenazione e della ventilazione in COVID-19

I pazienti affetti da COVID-19 con insufficienza respiratoria associata devono essere monitorati attentamente con pulsossimetria continua. È necessario somministrare ossigeno supplementare tramite cannula nasale o maschera di Venturi per mantenere la saturazione di ossigeno (SpO₂) tra il 92 e il 96% (< 88-90% in caso di BPCO). Se c'è un miglioramento clinico e della saturazione di ossigeno, l'ossigeno supplementare deve essere continuato con una rivalutazione periodica. In assenza di miglioramento clinico o di peggioramento dei sintomi e/o della saturazione di ossigeno, si raccomanda di ricorrere a trattamenti non invasivi come la cannula nasale ad alto flusso (HFNC) o la ventilazione non invasiva a pressione positiva (NIPPV). L'insufficienza respiratoria acuta ipossiémica è la complicanza più comune nei pazienti adulti con COVID-19 e l'ossigenoterapia convenzionale non è utile per soddisfare la richiesta di ossigeno in questi pazienti. Questi pazienti devono essere gestiti con modalità di supporto respiratorio avanzate, come la cannula nasale ad alto flusso (HFNC), la ventilazione a pressione positiva non invasiva (NIPPV), l'intubazione endotracheale e la ventilazione meccanica invasiva (IMV) o l'ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO).

1.8 Prevenzione

Oltre all'importanza di imporre misure di salute pubblica e di controllo delle infezioni per prevenire o ridurre la trasmissione della SARS-CoV2, il passo cruciale per contenere questa pandemia è stata la campagna di vaccinazione. Gli sforzi straordinari dei ricercatori clinici di tutto il mondo hanno portato allo sviluppo di nuovi vaccini contro SARS-CoV-2 a una velocità senza precedenti. La vaccinazione attiva il sistema immunitario che porta alla produzione di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2.

- **Vaccino BNT162b2:** i soggetti di età pari o superiore a 16 anni che hanno ricevuto il vaccino BNT162b2 (a base di mRNA, BioNTech/Pfizer) in regime di due dosi, somministrato a distanza di 21 giorni l'uno dall'altro, hanno mostrato una protezione del 95% contro il COVID-19²⁶⁶. Sulla base dei risultati di questo studio di efficacia del vaccino, l'11 dicembre 2020 la FDA ha rilasciato un'autorizzazione all'uso del vaccino BNT162b2 per la prevenzione della COVID-19.
- **Vaccino mRNA-1273:** i soggetti randomizzati a ricevere due dosi di vaccino mRNA-1273 (a base di mRNA, Moderna) somministrate a distanza di 28 giorni l'una dall'altra hanno mostrato un'efficacia del 94%²⁶⁷. Sulla base dei risultati di questo studio sull'efficacia del vaccino, il 18 dicembre 2020 la FDA ha rilasciato un'autorizzazione all'uso del vaccino mRNA-1273 per la prevenzione della COVID-19.
- **Vaccino Ad26.COVS.2.S:** Un terzo vaccino Ad26.COVS.2.S per la prevenzione della COVID-19 ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio da parte dell'FDA il 27 febbraio 2021, sulla base dei risultati di uno studio che ha dimostrato che una singola dose di vaccino Ad26.COVS.2.S ha conferito un'efficacia del 73,1% nella prevenzione della COVID-19 nei partecipanti adulti²⁶⁸.

- **Vaccino ChAdOx1 nCoV-19:** L'analisi ad interim ha dimostrato un profilo di sicurezza accettabile e un'efficacia clinica del 70,4% contro la COVID-19 sintomatica dopo due dosi e una protezione del 64% contro la COVID-19 dopo almeno una dose standard²⁶⁹. Il vaccino ChAdOx1 nCoV-19 è stato approvato o ha ottenuto l'autorizzazione all'uso di emergenza per prevenire la COVID-19 in molti Paesi del mondo.
- **Vaccino NVX-CoV2373:** I risultati di uno studio, che ha valutato l'efficacia e la sicurezza del vaccino NVX-CoV2373 (Novavax), un vaccino ricombinante SARS-CoV-2 ingegnerizzato con nanoparticelle, hanno dimostrato che il vaccino NVX-CoV2373 è efficace nella prevenzione della COVID-19²⁷⁰. Una singola dose di NVX-CoV2373, che è un vaccino adiuvato con nanoparticelle di proteina spike ricombinante, ha dimostrato un'efficacia vaccinale del 92,6% (95% CI, 83,6-96,7) contro qualsiasi variante di interesse, in base ai risultati di uno studio condotto negli Stati Uniti e in Messico, che ha coinvolto più di 29.000 partecipanti²⁷¹.

Oltre ai vaccini sopra citati, altri vaccini, tra cui vaccini a base di proteine e vaccini inattivati, sono stati sviluppati internamente in India (Covaxin), Russia (Sputnik V) e Cina (CoronaVac) e sono stati approvati o hanno ottenuto l'autorizzazione all'uso di emergenza per prevenire la COVID-19 in molti Paesi del mondo.

Una terza dose (dose di richiamo) è stata inclusa nel programma di vaccinazione di vari Paesi, alcuni studi hanno infatti dimostrato un certo calo dell'immunità dopo la seconda dose con la possibilità di ristabilire livelli di protezione più elevati grazie alla somministrazione di una terza dose di richiamo^{272,273}.

1.9 Prognosi

La prognosi del COVID-19 dipende in larga misura da vari fattori, tra cui l'età del paziente, la gravità della malattia al momento della presentazione, le condizioni preesistenti, la rapidità di attuazione del trattamento e la risposta al trattamento. L'attuale stima dell'OMS del tasso di mortalità globale per la COVID-19 è del 2,2%. Tuttavia, il tasso di mortalità è influenzato da fattori quali l'età, le condizioni preesistenti e la gravità della malattia. I risultati di uno studio di coorte prospettico multicentrico europeo che ha incluso 4.000 pazienti gravemente malati di COVID-19 hanno riportato una mortalità a 90 giorni del 31%, con una mortalità più elevata nei pazienti anziani, diabetici, obesi e con ARDS grave²⁷⁴.

1.9.1 Mortalità

Una meta-analisi di 212 studi pubblicati, comprendenti 281.461 individui provenienti da 11 Paesi, ha riportato che il decorso grave della malattia è stato osservato in circa il 23% con un tasso di mortalità di circa il 6% nei pazienti infettati da COVID-19²⁷⁵. Diversi studi retrospettivi invece, hanno riportato una mortalità variabile per la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) correlata al COVID-19^{12,13,136,144,145,166,274,276-279}. Infatti, la mortalità per COVID-19 sembra essere determinata dalla presenza di ARDS grave e varia ampiamente dal 12 al 78%, con una media del 25-50%. Tuttavia, il decesso può avvenire per diverse altre condizioni, tra cui aritmia cardiaca, arresto cardiaco ed embolia polmonare. Dati limitati suggeriscono che tra i pazienti affetti da ARDS non c'è differenza di mortalità tra quelli con ARDS correlata a COVID-19 e quelli con ARDS non correlata a COVID-19²⁷⁹.

La mortalità potrebbe cambiare con il progredire della pandemia^{274,280-283}. In un'analisi dei pazienti durante una recrudescenza della COVID-19 a Houston, in Texas, la mortalità ospedaliera è stata inferiore durante il secondo picco rispetto al primo (5 contro 12%), ma la differenza nella mortalità in terapia intensiva non è stata significativa (23 contro 28%)²⁸⁴. In un'altra coorte francese di oltre 4000 pazienti gravemente malati, la mortalità è diminuita dal 42 al 25% in un periodo di quattro mesi durante la pandemia²⁷⁴. In un'analisi statunitense di 468 pazienti con malattia critica correlata a COVID-19 dal 1° marzo 2020 all'11 maggio 2020, la mortalità è diminuita dal 44 al 19%²⁸⁵. Un'altra analisi monocentrica statunitense di tre picchi consecutivi ha riportato, tra marzo 2020 e dicembre 2020, una riduzione simile tra il picco 1 e il picco 2 (29% contro 25%)²⁸⁶. Tuttavia, la mortalità è stata maggiore nel terzo picco (35%). I cambiamenti nella mortalità potrebbero essere dovuti a popolazioni di pazienti diverse, a un diverso carico di comorbidità, al carico di personale delle istituzioni e/o alla crescente esperienza nell'assistenza COVID-19. Tuttavia, i tassi riportati potrebbero non essere pienamente accurati non riflettendo accuratamente, le differenze nei modelli di pratica nel corso della pandemia (ad esempio, tempistica precoce rispetto a quella tardiva dell'intubazione, uso crescente di modalità non invasive).

1.9.2 Fattori di rischio associato a morte

In tutto il mondo, il principale fattore di rischio associato a prognosi infausta nei pazienti critici con COVID-19 è l'età avanzata (≥ 64 anni)^{13,145,166,274,278}. In uno studio condotto su oltre duemila pazienti in condizioni critiche, l'età ≥ 80 anni era associata a un rischio di morte 11 volte maggiore²⁸⁷. Altri fattori di rischio associati al decesso tra i pazienti critici sono i seguenti^{12,13,139,140,144,145,158,166,195,274,287-289}: lo sviluppo di ARDS, in particolare di ARDS grave, e la necessità di ventilazione meccanica; comorbidità (es. obesità, patologie cardiache e polmonari croniche, ipertensione, diabete, malattie renali croniche, terapia sostitutiva renale, cancro), elevati valori dei marcatori di infiammazione o di coagulazione (es. febbre, livello di D-dimero >1 microg/mL all'ammissione, prodotti di degradazione della fibrina elevati, tempi di tromboplastina parziale attivata e di protrombina prolungati); alterazione di alcuni esami ematochimici selezionati (es. peggioramento della linfopenia, neutrofilia, aumento della troponina); sesso maschile; gravi disfunzioni d'organo al momento del ricovero e in particolare la disfunzione ventricolare destra.

In contesti con risorse limitate, ai suddetti fattori di rischio si aggiungevano anche l'infezione da HIV (odds ratio [OR] 1,9) e il ritardo nel ricovero a causa di risorse ridotte (OR 2,0)²⁹⁰.

La rapidità della progressione dei sintomi non sembra predire un esito peggiore²⁹¹.

Mentre la febbre elevata è stata associata a una maggiore probabilità di sviluppare l'ARDS (hazard ratio [HR] 1,77, 95% CI 1,11-2,84), sembra essere associata a una minore probabilità di morte (HR 0,41, 95% CI 0,21-0,82)^{166,291}, un fenomeno che è stato osservato in precedenza anche in malattie critiche non correlate alla COVID-19.

Sono stati proposti diversi modelli prognostici, ma nessuno è chiaramente superiore né sembrerebbe predire con precisione il deterioramento clinico o la mortalità^{287,292}. Ad esempio, è stato dimostrato come il punteggio del SOFA (sequential organ failure assessment) score prima dell'intubazione non risulterebbe essere un buon predittore di morte nei pazienti con COVID-19²⁹³.

1.9.3 Durata della degenza

La durata della degenza in terapia intensiva e della ventilazione meccanica è più lunga nei pazienti con ARDS correlata a COVID-19 rispetto a quelli non correlati a COVID-19, con un numero consistente di pazienti COVID-19 che rimangono intubati per almeno una o due settimane^{288,294,295}. In uno studio retrospettivo di 148 pazienti con COVID-19, il tempo medio di interruzione della ventilazione meccanica è stato di 33 giorni e la durata della degenza di 55 giorni²⁹⁶. Tuttavia, il numero di giorni liberi dalla ventilazione meccanica e la durata della

degenza in terapia intensiva potrebbero essere stati sicuramente migliorati a seguito dell'introduzione di terapie dirette efficaci per il COVID-19²⁹⁷.

1.9.4 Altre Complicanze

I pazienti affetti dalla malattia COVID-19 sono anche a maggior rischio di sviluppare complicazioni protrombotiche come PE, TVP, MI, ictus ischemico e trombosi arteriosa¹¹⁴. Il coinvolgimento del sistema cardiovascolare provoca aritmie maligne, cardiomiopatia e shock cardiogeno.

Complicazioni gastrointestinali come ischemia intestinale, transaminite, emorragia gastrointestinale, pancreatite, sindrome di Ogilvie, ischemia mesenterica e ileo grave sono spesso riscontrate nei pazienti critici con COVID-19²⁹⁸.

L'insufficienza renale acuta è la manifestazione extrapolmonare più comune del COVID-19 ed è associata a un aumentato rischio di mortalità²⁹⁹.

Una meta-analisi di 14 studi che hanno valutato la prevalenza della coagulazione intravascolare disseminata (CID) nei pazienti ospedalizzati con COVID-19 ha riportato che la CID è stata osservata nel 3% (95%: 1%-5%, $P < 0,001$) dei pazienti inclusi. Inoltre, è stato osservato che la CID è associata a una malattia grave ed è un indicatore prognostico negativo³⁰⁰.

Dati più recenti sono emersi riguardo al prolungamento dei sintomi nei pazienti guariti dall'infezione da COVID-19, definiti "sindrome post-acuta da COVID-19". Un ampio studio di coorte condotto su 1773 pazienti 6 mesi dopo l'ospedalizzazione con COVID-19 ha rivelato che la maggior parte di essi presentava almeno un sintomo persistente: affaticamento, debolezza muscolare, difficoltà di sonno o ansia. I pazienti con malattia grave avevano anche un rischio maggiore di problemi polmonari cronici³⁰¹.

Uno studio di coorte retrospettivo che ha incluso 236.379 pazienti ha riportato una notevole morbilità neurologica (emorragia intracranica, ictus ischemico) e psichiatrica (disturbi d'ansia, disturbi psicotici) 6 mesi dopo la diagnosi di COVID-19³⁰².

Infezioni fungine invasive secondarie, come l'aspergillosi polmonare associata alla COVID-19 e la mucormicosi rino-cerebro-orbitale, sono state segnalate sempre più spesso come complicazioni nei pazienti che si sono ripresi dalla COVID-19. I fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni fungine secondarie includono condizioni di comorbidità come il diabete non controllato, la linfopenia associata e l'uso eccessivo di corticosteroidi^{210,212}.

Capitolo 2

Microbiota e Covid-19

Le infezioni del tratto respiratorio sono responsabili di 4 milioni di decessi all'anno in tutto il mondo. È ormai assodato che la salute e numerose patologie umane dipendono dalle interazioni tra il sistema immunitario e una popolazione microbica, chiamata microbiota. Esistono relazioni simbiotiche tra l'ospite e il microbiota che colonizza la cute e le superfici mucose, come il tratto gastrointestinale e respiratorio³⁰³.

La principale comunità microbica commensale, nota come microbiota intestinale, si trova nell'intestino, un apparato con la maggiore superficie mucosale e interazioni con gli stimoli esterni. Il microbiota intestinale interagisce continuamente con l'ospite per preservare l'omeostasi attraverso la regolazione delle principali vie di segnalazione (ad esempio, vie immunitarie, metaboliche, neurologiche ed endocrine) e la modulazione dello stato epigenetico^{304,305}.

Il potenziale di regolazione del microbiota intestinale non si limita all'intestino, ma coinvolge diversi organi, come cervello, fegato, reni e polmoni. Esistono diverse vie bidirezionali, tra cui le vie intestino-cervello, intestino-fegato, intestino-rene e intestino-polmone, che danno origine alla comunicazione tra organi, attraverso il ruolo chiave svolto dal microbiota³⁰⁶⁻³⁰⁹. Vari aspetti del microbiota nell'asse intestino-polmone che possono essere considerati come potenziali strategie sfruttabili per prevenire, controllare e trattare le infezioni respiratorie, anche la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19).

2.1 Il microbiota intestinale

Il tratto gastro-intestinale umano ospita circa 10^4 - 10^5 batteri per millimetro di contenuto nell'intestino tenue e 10^{11} batteri per grammo di contenuto del colon³¹⁰. In una persona sana, il microbiota intestinale comprende più di 100 phyla batterici e la maggior parte dei batteri appartiene a *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, con i phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che costituiscono oltre il 90% dell'intero microbiota intestinale³¹¹. I microrganismi e il loro materiale genetico combinato costituiscono il microbioma intestinale, che supera il genoma umano di circa 150 volte³¹². La proporzione dei vari phyla rimane quasi stabile e unica per un individuo, anche se si può osservare uno spostamento durante un cambiamento dello stato di salute. Ad esempio, è stato osservato che il microbioma intestinale degli anziani si allontana dai Firmicutes per passare ai Proteobacteria e agli Alistipes³¹³. Il microbiota intestinale esiste in una relazione simbiotica con il suo ospite. Facilita la sintesi delle vitamine e la fermentazione dei carboidrati e di altri nutrienti non digeriti e contribuisce all'apporto di nutrienti essenziali come gli acidi grassi a catena corta (SCFA) alle cellule epiteliali del colon. Inoltre, regola anche la permeabilità della mucosa e fornisce un deterrente contro i microbi patogeni. Inoltre, il microbiota svolge un ruolo indispensabile nel mantenimento dell'omeostasi intestinale, modulando le risposte immunitarie locali e sistemiche dell'ospite³¹⁴. Il microbiota protegge l'intestino (a) agendo come competitore contro il legame dei microbi patogeni, (b) neutralizzando i patogeni con i loro metaboliti antimicrobici, (c) mantenendo il sistema immunitario locale in uno stato di vigilanza permanente e (d) regolando l'immunità innata e adattativa.

In una persona sana, la proporzione dei vari phyla rimane per lo più quasi stabile e unica per un individuo³¹³.

Uno stato di squilibrio è descritto come "disbiosi intestinale", una condizione caratterizzata da un'alterazione dell'abbondanza o della composizione del microbiota. La disbiosi intestinale può verificarsi con l'invecchiamento, gli effetti della dieta, i farmaci, le infezioni gastrointestinali e

le alterazioni anatomiche. Uno stato significativamente disbiotico può predisporre alle malattie del tratto gastrointestinale, come l'enterocolite da *Clostridioides difficile*, che è associata all'uso prolungato e ricorrente di antibiotici ad ampio spettro³¹⁵. Poiché il microbiota intestinale modula il sottile equilibrio tra risposte sistemiche pro- e antinfiammatorie, uno stato disbiotico è stato associato anche a malattie sistemiche non gastrointestinali, come le neoplasie³¹⁶, il diabete mellito di tipo 2³¹⁷, la steatoepatite non alcolica³¹⁸, le malattie coronariche³¹⁹, le malattie neurodegenerative³²⁰ e la depressione³²¹.

2.1.1 Ruolo del microbiota intestinale nell'infezione da virus respiratori

Sebbene le interazioni immuno-correlate tra il microbiota residente nell'intestino e quello del tratto respiratorio non siano ancora state esplorate, l'impatto del microbiota intestinale nei pazienti affetti da COVID-19 può essere estrapolato concettualmente esaminando le evidenze esistenti nelle infezioni da altri virus respiratori.

Evidenze da SARS-CoV1

Molte malattie respiratorie virali sono comunemente accompagnate da sintomi gastrointestinali. Studi precedentemente condotti durante l'epidemia di sindrome respiratoria acuta grave (SARS) del 2002 hanno dimostrato che la diarrea era un sintomo comune e si verificava nel 16%-73% dei pazienti. Il Coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-1) era noto per infettare non solo le cellule epiteliali polmonari, ma anche le cellule immunitarie, scatenando un'intensa risposta immunitaria con un aumento delle citochine Th2³²². È stato ipotizzato che gli elevati livelli di citochine pro-infiammatorie circolanti alterassero il microbiota intestinale e compromettessero l'integrità intestinale. Il conseguente "leaky" intestinale ha permesso la traslocazione di prodotti batterici e antigeni nella circolazione, esacerbando ulteriormente la malattia³²³. A causa della natura bidirezionale dell'asse intestino-polmoni, un'alterazione del microbiota intestinale aumenta ulteriormente le risposte immunitarie respiratorie, con il probabile risultato di perpetuare la risposta infiammatoria sistemica³²⁴.

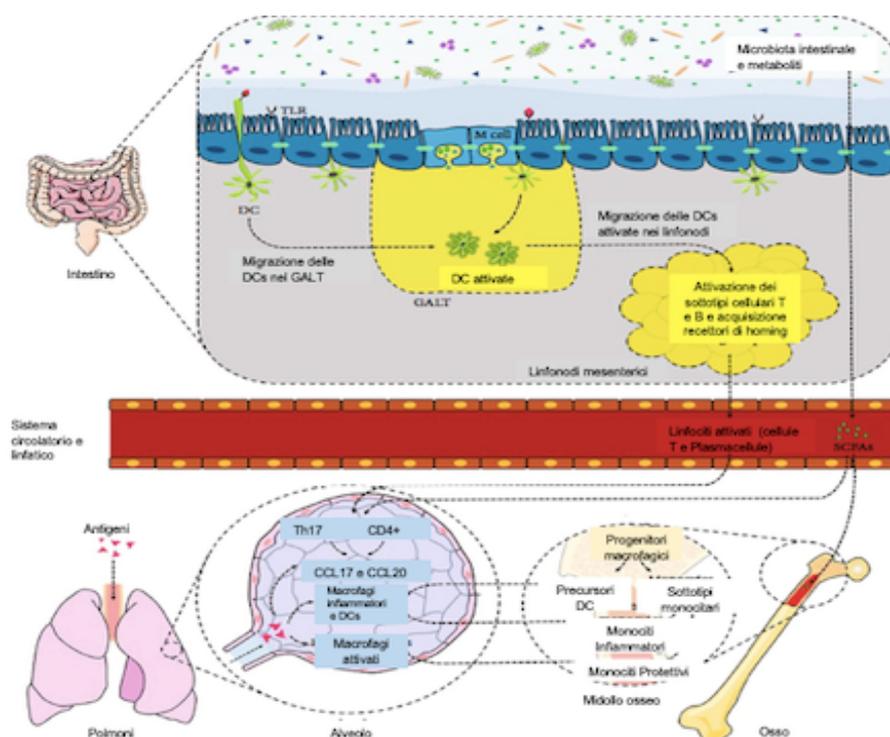


FIGURA 5. Relazione tra il microbiota intestinale e l'immunità polmonare: l'interazione tra i batteri commensali intestinali e l'instaurazione dell'immunità polmonare è mediata da vari fattori, tra cui PAMP, PRR, SCFA, integrità intestinale e cellule immunitarie della lamina propria. In uno stato normale, le DC vengono continuamente prelevate dal lume attraverso l'attività delle cellule M, l'estensione dei dendriti e la funzione della barriera intestinale, che determinano la traslocazione di batteri/PAMP. Dopo il prelievo delle DC, queste cellule migrano verso il GALT e poi il MLN per regolare la differenziazione e l'homing dei linfociti (cellule T e B) in base alle citochine rilasciate rispetto alla composizione del microbiota intestinale. Le cellule T e B attivate si distribuiscono nei polmoni attraverso la circolazione.

Evidenze su altri virus respiratori comunitari

Utilizzando un modello murino, Deriu et al. hanno dimostrato che l'infezione virale respiratoria dovuta all'influenza determina una disbiosi intestinale che predispone all'infezione secondaria da Salmonella attraverso gli interferoni di tipo I circolanti³²⁵. Analogamente, Wang et al. hanno dimostrato un'inflammatione intestinale indiretta durante infezione da virus influenzale in un modello murino, scatenata attraverso un'inflammatione mediata dal microbiota dipendente dalle cellule Th17³²⁶. Diversi studi hanno riportato disbiosi intestinale dopo un'infezione virale respiratoria^{327,328}. Groves et al. hanno dimostrato che la disbiosi intestinale, sotto forma di un aumento dei Bacteroidetes e di una diminuzione dell'abbondanza dei phyla *Firmicutes*, si è verificata in modelli di topi con infezioni da virus respiratorio sinciziale e influenzale, ma non in quelli vaccinati con virus influenzali vivi attenuati³²⁹.

L'infezione da virus respiratorio sinciziale può anche causare disbiosi nel microbiota polmonare, modulando le risposte immunitarie locali all'interno del parenchima polmonare e a livello sistemico. A causa delle difficoltà di campionamento del microbiota polmonare, solo pochi studi hanno esaminato il ruolo dei patogeni respiratori nell'alterare il microbiota polmonare. Molyneaux et al. hanno riportato un aumento della proporzione di *Proteobacteria* e *Haemophilus influenzae* potenzialmente patogeni nel microbiota del tratto respiratorio inferiore in pazienti infettati da rhinovirus con broncopneumopatia cronica ostruttiva³³⁰. Utilizzando un modello murino inoculato con il virus dell'influenza H1N1 per via intranasale, Gu et al. hanno dimostrato un cambiamento di classe batterica nel microbiota polmonare, che è persistito anche durante il periodo di convalescenza³³¹. Nonostante le limitazioni degli studi disponibili, è emerso un tema comune che mostra un legame tra l'infezione da virus respiratori e l'alterazione del microbiota intestinale e del tratto respiratorio, con la presenza di inflammatione del tratto gastro intestinale.

2.2 Sintomi gastrointestinali nei pazienti con Covid-19

Nel tratto respiratorio, il SARS-CoV-2 infetta le cellule alveolari legandosi ai recettori dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE-2). È interessante notare che questi recettori sono abbondantemente espressi anche sulla superficie degli enterociti³³², dove svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi del microbiota e dell'inflammatione della mucosa³³³.

Diversi autori hanno anche riportato il rilevamento di frammenti di RNA della SARS-CoV-2, ma non del virus intero, in campioni di feci^{334,335}. Uno studio di Lamers et al. ha inoltre dimostrato che il SARS-CoV-2 è in grado di infettare le cellule enterocitarie in un modello di organoide intestinale umano³³⁶. Purtroppo, a causa della scarsità di studi autoptici e delle restrizioni pragmatiche sugli esami endoscopici del tratto gastrointestinale, i dati a sostegno di questa ipotesi in vivo sono limitati. Rimane inoltre sconosciuto come il SARS-CoV-2 possa sopravvivere all'ambiente gastrico acido per infettare direttamente gli enterociti. Nel complesso, non è chiaro se i sintomi gastrointestinali della COVID-19 siano il risultato di un'infezione primaria del GIT o derivino da altri meccanismi indiretti menzionati di seguito.

Sta di fatto che oltre ai sintomi respiratori e alla febbre, nei pazienti affetti da COVID-19 sono stati osservati anche sintomi gastrointestinali. Uno studio di Redd et al. ha riportato dolori addominali (14,5%), nausea (26,4%), diarrea (33,7%) e vomito (15,4%) in pazienti provenienti dagli Stati Uniti³³⁷. In un altro studio su 204 pazienti COVID-19, il 50,5% (103 pazienti) presentava sintomi gastrointestinali. Tra questi 103 pazienti, il 78,6% mostrava inappetenza, il 34% diarrea, il 3,9% vomito e l'1,9% dolore addominale. In uno studio di coorte molto più ampio, che ha coinvolto 1099 pazienti COVID-19 provenienti da 552 ospedali diversi distribuiti in oltre 30 province, solo il 3,8% dei pazienti ha manifestato diarrea¹⁸⁰. Questi risultati

suggeriscono che il virus potrebbe essere presente durante il decorso della malattia nel tratto gastrointestinale, causando infezione (Fig. 6).

2.2.1 Shedding fecale nei pazienti con Covid-19

Diversi studi di coorte che hanno riportato uno shedding virale fecale dei pazienti COVID-19 e la rilevazione dell'RNA della SARS-CoV-2 nel materiale fecale^{335,338}. I ricercatori hanno cercato di valutare il periodo di diffusione virale nei campioni di feci e hanno notato la diffusione virale anche in pazienti asintomatici. Ad esempio, l'RNA del SARS-CoV-2 è stato rilevato in un campione di feci di un bambino asintomatico 17 giorni dopo l'esposizione al virus³³⁹. Alcuni studi hanno riportato tuttavia la difficoltà nell'isolamento del virus dai campioni di feci. Ad esempio, Wölfel et al. hanno rilevato RNA virale in campioni fecali, ma i tentativi di isolare il virus non hanno avuto successo, probabilmente a causa della natura lieve dell'infezione⁸⁹. Una carica virale inferiore a 106 copie per millilitro spesso ostacola l'isolamento virale³⁴⁰. La carica virale varia anche molto da un campione all'altro, compresi i campioni fecali, sierici e respiratori^{89,136,341}. Tuttavia, la comprensione della correlazione tra la disbiosi e la carica virale nei campioni dei pazienti rimane essenziale per far progredire le strategie terapeutiche incentrate sul ripristino del microbiota.

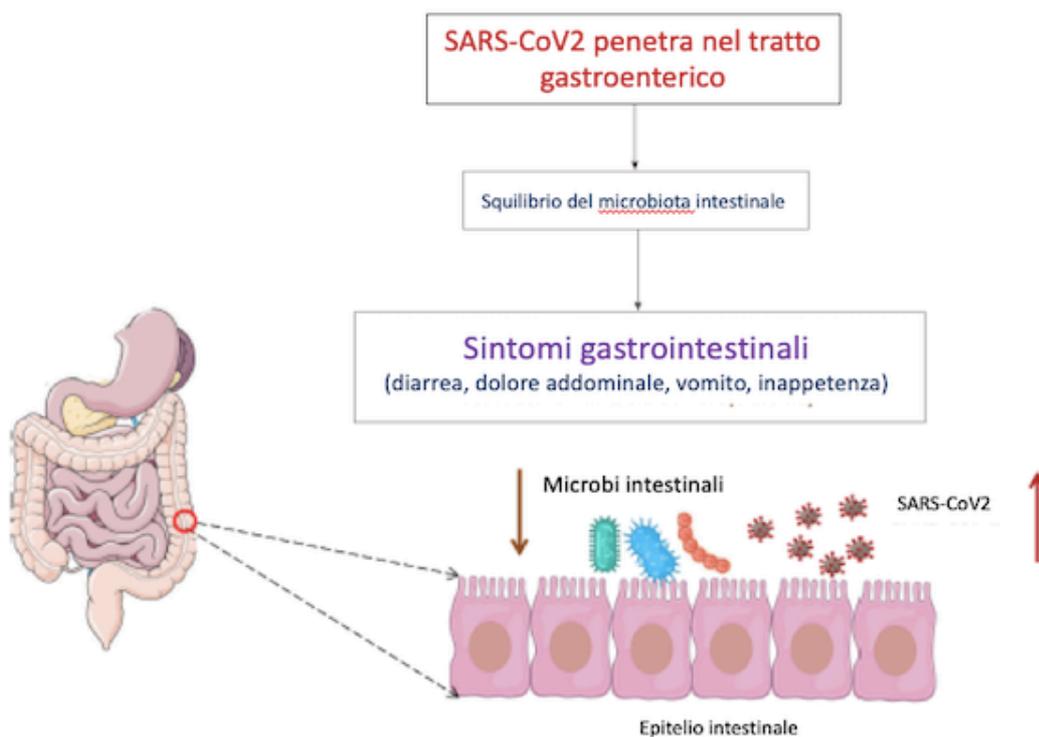


FIGURA 6. Schema illustrativo dell'ingresso nell'organismo della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2, le cause dello squilibrio del microbiota intestinale che contribuisce alla manifestazione dei sintomi gastrointestinali nei pazienti affetti da coronavirus nel 2019. Adattato da: Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Dhama K, Lee SS. Altered gut microbiota patterns in COVID-19: Markers for inflammation and disease severity. *World J Gastroenterol* 2022; 28(25): 2802-2822.

2.3 Composizione alterata del microbiota intestinale nei pazienti con Covid-19

Le infezioni da COV-2 hanno portato a cambiamenti nell'ecologia del microbiota intestinale dei pazienti (rispetto a quello osservato nei controlli). Questi cambiamenti sono influenzati dalle risposte immunitarie suscitate durante il COVID-19. Diversi studi hanno rivelato la crescita di microrganismi insoliti e l'impoverimento dei microbi intestinali comuni (popolazioni batteriche, virali e fungine). Per comprendere la gravità della malattia nei pazienti con COVID-19, è stata analizzata la composizione del microbiota intestinale di 100 pazienti in due coorti ospedaliere. Sono stati raccolti campioni di feci da 27 dei 100 pazienti. La composizione del microbioma intestinale è stata caratterizzata utilizzando il DNA totale estratto dai campioni di feci. Gli autori hanno dimostrato che il numero di commensali intestinali e di Bifidobatteri era basso e correlato a diversi fattori di gravità della malattia, come le alte concentrazioni di citochine infiammatorie e di proteina C-reattiva (CRP). Questi dati suggeriscono che la composizione del microbiota possa essere associata alla gravità della malattia³⁴². Un altro studio ha effettuato il profiling dell'RNA e del DNA mediante il sequenziamento del viroma utilizzando il materiale fecale di pazienti COVID-19. Il materiale fecale di 98 pazienti è stato analizzato per comprendere la gravità della malattia e la sua potenziale associazione con il viroma intestinale. Lo studio ha dimostrato che la gravità della COVID-19 è inversamente correlata ai virus intestinali e che i pazienti più anziani sono più inclini ad andare incontro a manifestazioni gravi di COVID-19³⁴³. Sono state studiate anche alterazioni del microbioma fungino durante infezione da SARS-CoV2. L'analisi ha mostrato profili microbici eterogenei, con un arricchimento di generi fungini come *Aspergillus* e *Candida*³⁴⁴. Inoltre, è stata dimostrata l'abbondanza di simbionti tra i pazienti COVID-19, tra cui *Clostridium ramosum*, *Coprobacillus* e *Clostridium hathewayi*, direttamente correlati alla gravità della malattia. Al contrario, *Faecalibacterium prausnitzii*, anch'esso abbondante tra i pazienti, era inversamente correlato con la gravità della malattia³⁴⁴. Analogamente, in uno studio di Yeoh et al, i campioni di feci di 27 pazienti sono stati correlati con i marcatori ematici e le citotossine infiammatorie. Lo studio ha concluso che diverse manifestazioni cliniche di COVID-19 potrebbero essere associate al microbioma intestinale e che questo possa esser collegato all'infiammazione da COVID-19³⁴². Un microbiota intestinale equilibrato implica una maggiore efficacia dell'immunità polmonare³⁴⁵, come si è visto in topi germ-free i quali presentavano una minore clearance dei patogeni polmonari³⁴⁶. Anche le infezioni virali possono portare a un'alterazione del microbiota intestinale, con conseguente un aumento delle Enterobacteriaceae nei polmoni e a una riduzione dei lattococchi e dei lattobacilli nel microbioma dell'intestino, evidenziato in modelli animali. È ormai noto inoltre che molte malattie multifattoriali sono collegate alla disbiosi intestinale, tra cui malattie autoimmuni, metaboliche, infiammatorie, neurodegenerative e neoplastiche. L'immunità innata e adattativa è responsabile del controllo della colonizzazione del microbiota intestinale attraverso meccanismi che includono la produzione di peptidi antimicrobici e anticorpi IgA. Un microbiota disbiotico può influenzare attivamente la sua colonizzazione alterando le funzioni dell'immunità intestinale innata e adattativa. La disbiosi è stata associata a molte malattie umane correlate all'immunità, ma in molti casi resta da stabilire se la disbiosi sia una causa o una conseguenza della malattia³⁴⁷. Un piccolo rapporto proveniente dalla Cina ha rivelato in pazienti affetti da COVID-19 livelli più bassi di bifidobatteri e lattobacilli, entrambi considerati ceppi probiotici³⁴⁸. Uno studio ha inoltre evidenziato la downregulation dell'espressione dei recettori ACE2 nei pazienti con infezione da SARS-CoV2 in corso³⁴⁹. L'espressione del trasportatore di amminoacidi B0AT1, che controlla l'assorbimento intestinale del triptofano è proprio regolata dall'ACE2³⁵⁰, e l'espressione di mRNA di peptidi antimicrobici attraverso la via mTOR è regolata dal triptofano³⁵¹. Di conseguenza, l'assorbimento intestinale di triptofano diminuisce a causa della downregulation dell'ACE2 e si riduce la secrezione di

antimicrobici, con conseguente aumento della sopravvivenza dei patogeni e della disbiosi intestinale.

È stato inoltre condotto uno studio pilota che ha esaminato l'analisi metagenomica del microbioma fecale di 15 pazienti con COVID-19 rilevando che i pazienti presentavano importanti cambiamenti nel microbioma fecale rispetto ai controlli. È stato inoltre riscontrata una diminuzione dei microrganismi commensali benefici e un aumento dei patogeni opportunistici. Anche dopo l'attenuazione dei sintomi respiratori e l'eliminazione del SARS-CoV-2 nelle secrezioni respiratorie, livelli più bassi di organismi simbiotici e la disbiosi intestinale persistevano. Lo studio ha anche rilevato che al basale, 23 taxa di batteri sono risultati essere associati alla gravità del COVID-19 e appartenevano principalmente al phylum *Firmicutes* (15 su 23). Il genere *Coprobacillus*, le specie *Clostridium hathewayi* e *Clostridium ramosum* erano i principali gruppi batterici che presentano una correlazione positiva con la gravità della malattia. Entrambe le specie di clostridi erano associate infezioni anche sistemiche^{352,353} e *Coprobacillus* ha dimostrato di avere effetto regolatorio nei confronti del recettore ACE-2³⁵⁴. *Faecalibacterium prausnitzii* e *Alistipes onderdonkii* correlavano negativamente con la gravità del COVID-19 secondo lo studio sopra descritto. Gli *Alistipes* sono coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria intestinale, mentre *Faecalibacterium prausnitzii* è considerato dotato di proprietà antinfiammatorie. Durante la durata della malattia e nel periodo di ospedalizzazione, è stato riscontrato che in tutti i campioni fecali, 14 specie batteriche erano associate alla presenza di shedding fecale negli individui affetti da SARS-CoV-2. Tra queste, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides ovatus* e *Bacteroides massiliensis* hanno mostrato una significativa correlazione negativa con la carica fecale di SARS-CoV-2 nei campioni raccolti³⁵², e tutte sono associate alla diminuzione dell'espressione di ACE-2 nel colon³⁵⁴. Lo studio sopracitato mostrava che varie specie sono up-regolate e potrebbero essere coinvolte in una maggiore espressione di ACE-2 o al contrario che altre specie controllano negativamente l'espressione dell'ACE-2 nei soggetti affetti da COVID-19. Pertanto, la disbiosi intestinale potrebbe essere associata a una maggiore gravità di malattia rispetto ai soggetti normali. Un altro studio che ha analizzato 30 pazienti ha riportato una diminuzione della diversità batterica, un tasso più elevato di aumento di patogeni opportunisti come *Actinomyces*, *Rothia*, *Streptococcus* e *Veillonella*, oltre che una diminuzione degli organismi benefici nei pazienti affetti da SARS-Cov-2³⁵⁵.

Evidenze sempre più numerose suggeriscono che i pazienti con COVID-19 soffrono di un'alterazione del microbiota intestinale durante e dopo la malattia. Sia l'infiammazione sistemica che il potenziale replicativo del SARS-CoV-2 nell'intestino possono infatti contribuire alla disbiosi.

2.3.1 Alterazioni nella biosintesi dei componenti biologici nell'intestino in corso di Covid-19

Oltre alle alterazioni nella composizione del microbiota intestinale, in alcuni pazienti sono state osservate alterazioni funzionali durante l'infezione da SARS-CoV-2. Il microbiota intestinale contribuisce a diverse vie biosintetiche, come la biosintesi degli aminoacidi, il metabolismo dei carboidrati, la biosintesi de novo dei nucleotidi e la glicolisi. Ciò potrebbe essere dovuto all'abbondanza di batteri sintetizzatori di acidi grassi a catena corta (SCFA), presenti in maniera abbondante nei campioni COVID-19 con sintomi lievi e nei campioni non COVID-19³⁵⁶. In uno studio che utilizzava modelli di primati non umani, sono state effettuate analisi della diversità β e profilazione del gene 16SrRNA per comprendere la composizione del microbiota intestinale durante l'infezione da SARS-CoV-2. Lo studio ha rivelato cambiamenti sostanziali nella composizione e nel metabolismo del microbiota intestinale con una riduzione della concentrazione di SCFA e una differenza nelle concentrazioni di acidi biliari. Lo studio ha anche rilevato alterazioni nei metaboliti del triptofano durante l'infezione da SARS-CoV-2 nei

modelli animali³⁵⁷. I ricercatori hanno osservato una prolungata compromissione della lisoleucinabiosintesi e degli SCFA a causa di alterazioni del microbioma intestinale di pazienti con COVID-19

2.4 Asse intestino-polmoni

Il microbiota intestinale può modulare la fisiologia dell'ospite, in funzione della sua composizione e dei suoi derivati (ad esempio, metaboliti e altri componenti). In uno stato simbiotico, il microbiota intestinale rafforza lo stato di salute attraverso interazioni locali e sistemiche benefiche con l'ospite, in particolare regolando l'immunità innata e adattativa e fornendo una difesa critica contro la colonizzazione patogena nell'intestino e in altri organi (ad esempio, i polmoni), creando così un asse intestino-polmoni^{358,359}. Pertanto, l'alterazione della composizione del microbiota intestinale (disbiosi), che può derivare da cambiamenti nella dieta o dal consumo di antibiotici, influisce negativamente sulla posizione del microbiota polmonare, sull'immunità e sulla fisiopatologia e può predisporre a malattie respiratorie³⁶⁰. È stato riportato che una minore diversità nella composizione del microbiota intestinale, con una riduzione significativa dei batteri produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA), comporta un aumento del rischio di asma e fibrosi cistica (FC) nei bambini³⁶¹. A questo proposito, alcuni studi hanno dimostrato che la funzione polmonare e l'immunità potrebbero essere influenzate dalle fibre fermentabili presenti nella dieta, che influiscono sulla composizione del microbiota intestinale e sul suo profilo metabolico, in particolare sugli SCFA. Una dieta ad alto contenuto di fibre riduce clinicamente la mortalità per malattie respiratorie attraverso la modulazione di mediatori infiammatori come IL-8, IL-6 e proteina C-reattiva (CRP)^{362,363}. Inoltre, è stato riportato che il latte fermentato contenente batteri lattici è in grado di recuperare le cellule natural killer (NK) che sono ridotte, ad esempio, dal fumo³⁶⁴.

Esiste un'associazione tra la somministrazione precoce di antibiotici e lo sviluppo di asma e malattie allergiche causate da un'alterazione della composizione del microbiota³⁶⁵. Inoltre, l'alterazione della composizione del microbiota intestinale causata dal consumo di antibiotici contribuisce a ridurre le difese polmonari contro agenti patogeni respiratori come *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e il virus dell'influenza A attraverso la compromissione della resistenza alla colonizzazione e dell'immunità polmonare³⁶⁶⁻³⁶⁸.

Il tratto respiratorio è colonizzato da un microbiota a bassa densità, che ospita phyla come *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*³⁶⁹. Inoltre, *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* sono generi dominanti nel microbiota polmonare sano³⁷⁰. L'equilibrio tra migrazione ed eliminazione dei batteri nei polmoni e il loro tasso di proliferazione determinano la composizione del microbiota polmonare. Inoltre, è stato riportato che i cambiamenti nel microbiota polmonare possono influenzare il microbiota intestinale attraverso la circolazione sistemica³⁷¹.

Il microbiota intestinale ha effetti regolatori locali e sistemici sul sistema immunitario innato e adattativo, grazie alla presenza di quasi il 70% delle cellule immunitarie nel tratto gastrointestinale, soprattutto nella lamina propria³⁵⁹. Questa interazione è regolata dalla funzione di barriera intestinale, che coinvolge lo strato epiteliale, la mucosa e i mediatori immunomodulanti. Lo strato epiteliale è costituito da cellule epiteliali intestinali specializzate con funzioni diverse, come gli enterociti assorbenti (per l'assorbimento dei nutrienti e il mantenimento dell'integrità epiteliale), le cellule di Paneth (per la secrezione di peptidi antimicrobici come l' α -defensina), le cellule caliceali (per la secrezione di mucina e di peptidi trefoil), le cellule M (per la secrezione di Ig-A e la presentazione di antigeni alle cellule dendritiche (DC)) e le cellule entero-endocrine (per la produzione di ormoni come il peptide glucagone-simile 1 e 2). Queste cellule sono collegate tra loro da proteine chiamate tight junctions (ad esempio, occludina, zonula occludens (ZO) e molecole di adesione giunzionale (JAM)) per creare un'interfaccia intestinale dinamica e complessa (barriera intestinale) per la regolazione dell'interazione microbiota-ospite. La disregolazione dell'espressione e della

localizzazione delle tight junctions, dello spessore della mucina, della proliferazione e del rinnovamento del rivestimento epiteliale può portare a un aumento della permeabilità della barriera intestinale³⁷². La composizione del microbiota intestinale, i metaboliti e i componenti immunogenici, noti come microbe-associated molecular patterns (MAMP), controllano sia la funzione della barriera intestinale sia lo stato infiammatorio (Fig. 5)³⁷³. Pertanto, la disbiosi altera la funzione di barriera dell'intestino e induce l'iperpermeabilità dell'epitelio di rivestimento (che è anche considerato un induttore di disbiosi), portando a un'augmentata attivazione dei recettori del sistema immunitario innato, chiamati recettori di riconoscimento dei pattern (PRR), che sono espressi da cellule immunitarie e non. Inoltre, favorisce la differenziazione delle cellule Th e Th17 rispetto alla differenziazione delle cellule T regolatorie (Treg) attraverso il prelievo di DC dal lume alla lamina propria³⁷⁴. Le elevate risposte proinfiammatorie, derivanti da questo evento, sono considerate il punto di partenza dell'induzione e dello sviluppo di vari disturbi intra ed extraintestinali (Fig. 5)^{305,373}. Inoltre, è stato riportato l'effetto regolatorio del microbiota intestinale sulla popolazione di cellule T extraintestinali, che contribuisce al controllo dell'immunità sistemica. Diversi studi su modelli animali hanno dimostrato che un ceppo specifico del microbioma intestinale influisce sulla differenziazione delle sottopopolazioni di cellule T. Ad esempio, l'espansione delle cellule T CD4+, delle cellule Treg e delle cellule Th17 è stata attribuita alla colonizzazione rispettivamente di *Bacteroides fragilis*, Clostridi e batteri filamentosi segmentati (SFB) in topi germ-free³⁷⁵⁻³⁷⁷.

L'homing tessuto-specifico dei linfociti, mediato da chemochine, può essere determinato dalla funzione delle DC, che dipende dalla composizione del microbiota intestinale. Le DC vengono continuamente attivate dal microbiota e dai MAMP di derivazione patogena. Migrano verso i linfonodi drenanti, dove inducono l'attivazione e la differenziazione delle cellule T³⁷⁸. La chemochina (motivo C-C) ligando 20 (CCL20) è espressa da vari tessuti (ad esempio, dalle cellule epiteliali dell'intestino e dei polmoni a livello basale) e aumenta in seguito all'attivazione dei recettori toll-like (TLR) e ai segnali proinfiammatori. L'attivazione di CCR6 da parte di CCL20 induce l'homing di cellule T CD4+ e DC nell'asse intestino-polmone³⁷⁹.

Il microbiota intestinale svolge un ruolo determinante nella regolazione delle plasmacellule produttrici di IgA dalle cellule B attivate e differenziate, che rilasciano specificamente anticorpi e modellare l'immunità mucosale. Le cellule B sensibilizzate nella lamina propria (placche di Peyer) dagli antigeni inalati e dal microbiota intestinale possono raggiungere il tratto respiratorio per produrre IgA specifiche e traslocare sulla superficie mucosale. Come già detto quindi la composizione del microbiota intestinale è un fattore chiave nella funzione di barriera intestinale, regolando le interazioni tra antigeni e sistema immunitario^{380,381}. Pertanto, la relazione simbiotica conservata del microbiota intestinale con l'immunità rafforza il sistema immunitario polmonare contro i patogeni respiratori batterici e virali. Batteri intatti e frammenti microbici possono diffondersi attraverso il sistema linfatico intestinale verso la circolazione sistemica e i polmoni. Pertanto, la clearance batterica dei macrofagi alveolari, il reclutamento dei neutrofili e i fattori antibatterici, derivati dall'epitelio del bronco, sembrano dipendere dalla composizione del microbiota intestinale e dai suoi derivati³⁸². Inoltre, l'interazione tra dieta e microbiota intestinale determinerebbe l'immunità, che si riflette nella fisiologia polmonare³⁸³. In generale, la dieta è un fattore chiave nella composizione del microbiota intestinale e nel profilo degli SCFA. Ad esempio, la saturazione degli acidi grassi nella dieta può influenzare l'immunità luminale, poiché gli acidi grassi saturi e insaturi sono considerati rispettivamente agonisti e antagonisti dei TLR e hanno un impatto sulla composizione del microbiota intestinale³⁸⁴.

Inoltre, gli SCFA, prodotti principalmente dalle fibre alimentari attraverso la fermentazione batterica, sono molecole multitasking, associate al mantenimento dell'omeostasi immunitaria attraverso vari meccanismi: (i) rafforzamento dell'integrità dell'epitelio intestinale; (ii) aumento del livello delle goblet cells che producono mucina; (iii) aumento della produzione di IgA intestinali; (iv) miglioramento della sopravvivenza e della riparazione delle cellule intestinali attraverso l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3; (v) attivazione della segnalazione di macrofagi e DC da parte dei recettori accoppiati a proteine G (GPR109A) per la produzione di

interleuchina-10 (IL-10); e (vi) induzione della differenziazione delle cellule Treg Foxp3 intestinali attraverso il rilevamento di GPR43³⁸⁵⁻³⁸⁸.

È stato riportato il ruolo epigenetico degli SCFA (butirrato) nella regolazione dell'infiammazione intestinale, che induce la sovraespressione dell'attività dell'istone deacetilasi (HDAC), seguita dall'induzione dell'espressione delle cellule Treg Foxp3+ del colon³⁸⁹. Gli SCFA preservano la comunità batterica intestinale desiderata attraverso la beta-ossidazione degli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa nei mitocondri^{390,391}. In aggiunta, il microbiota intestinale e i suoi SCFA hanno effetti di regolazione dell'emopoiesi nel midollo osseo. Gli SCFA circolanti possono penetrare nel midollo osseo e influenzare l'immunità polmonare nelle malattie allergiche delle vie aeree e nelle infezioni respiratorie (ad esempio, l'infezione da virus influenzale) attraverso la differenziazione dei precursori delle DC, dei macrofagi e dei progenitori delle DC (MDP)³⁹². In condizioni infiammatorie, come le infezioni virali, gravi danni tissutali sono indotti da risposte immunitarie incontrollate, come l'aumento della differenziazione dei monociti infiammatori in DC infiammatorie e macrofagi, che possono scatenare processi patologici nei polmoni³⁹³.

Uno studio sull'effetto del microbiota intestinale sull'emopoiesi del midollo osseo e sull'immunità polmonare efficace ha dimostrato che le diete ad alto contenuto di fibre e SCFA influenzano l'emopoiesi del midollo osseo aumentando il livello dei sottotipi di monociti di pattugliamento attenuando così i danni tissutali e aumentando il numero di macrofagi attivati nelle vie aeree che partecipano alla protezione e alla riparazione dei tessuti. Inoltre, gli SCFA migliorano la funzione delle cellule T effettrici CD8+ contro l'infezione influenzale alterando il metabolismo delle cellule T³⁹⁴.

La desaminotirosina (DAT) è un altro metabolita microbico, prodotto dal metabolismo dei flavonoidi e degli aminoacidi. Questo metabolita è correlato all'attività dell'IFN di tipo I, che svolge un ruolo chiave nell'immunità virale. *Clostridium orbiscindens*, un membro del microbiota intestinale, può produrre DAT dai flavonoidi con conseguente effetto protettivo verso l'infezione influenzale e una riduzione della mortalità nei topi infettati dal virus dell'influenza³⁹⁵. Oltre ai metaboliti del microbiota intestinale, sono in notevole crescita gli studi sulle vescicole extracellulari (EVs), che possono essere derivate dal microbiota intestinale come nuovi mediatori sistemici. In generale, le EV sono particelle di dimensioni nanometriche, contenenti MAMP, enzimi idrolitici e acidi nucleici, che possono diffondersi nell'organismo per regolare le funzioni dell'ospite, in particolare le risposte immunitarie³⁹⁶. Nel complesso, la composizione del microbiota intestinale, può determinare l'immunità polmonare modificando le risposte immunitarie innate e adattative. Pertanto, vi sono aspetti importanti dell'asse microbiota intestino-polmone che possono essere considerati bersagli promettenti nella prevenzione, nel controllo e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2.

2.5 Asse Intestino-Encefalo-Polmoni

Come l'asse intestino-polmoni, anche la comunicazione tra il microbioma e l'asse intestino-cervello è stata riconosciuta e rimane un tema attuale³⁹⁷⁻³⁹⁹. Diversi studi hanno illustrato il ruolo dell'asse microbioma-intestino-cervello in diversi disturbi neurologici⁴⁰⁰. L'interazione tra il cervello e l'intestino è bidirezionale, e coinvolge diverse vie, tra cui metaboliti batterici, comunicazioni neuroanatomiche, neurotrasmettitori e ormoni⁴⁰¹. Il nervo vago è principalmente coinvolto in questa comunicazione e molte delle molecole coinvolte (neurotrasmettitori/ormoni) sono prodotte nel tratto gastrointestinale. Durante la comunicazione tra neurotrasmettitori e ormoni, questi possono interagire con i recettori del nervo vago, trasmettendo le informazioni al cervello⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Molti ormoni possono anche attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) e influenzare direttamente il SNC. Inoltre, anche le vie neuroendocrine che operano attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) associate allo stress influenzano la BBB. L'asse HPA dello stress è associato al rilascio da parte della corteccia surrenalica di glucocorticoidi, come il cortisolo. Il cortisolo è associato a un aumento della permeabilità intestinale e della motilità gastrointestinale, influenzando così anche il microbiota

intestinale^{401,404,405}. L'asse stress-HPA può anche portare all'infiammazione e ad un'alterata produzione di metaboliti di origine batterica, soprattutto SCFA^{401,404}. Pertanto, una comprensione approfondita dell'asse intestino-cervello potrebbe aiutare lo sviluppo di approcci terapeutici attraverso la modulazione della composizione microbica intestinale. Il coinvolgimento dei polmoni (asse intestino-cervello-polmoni) si verifica quando l'infiammazione e la neurodegenerazione nel tronco cerebrale dovute al COVID-19 impediscono la trasmissione nervosa, interrompendo le vie antinfiammatorie e le normali funzioni respiratorie e gastrointestinali. Recentemente, i polmoni sono stati associati al crosstalk tra le componenti dell'asse microbiota-intestino-cervello, e questo asse è stato messo in evidenza anche durante il COVID-19^{401,406}. Le alterazioni distrettuali e la traslocazione microbica che ne consegue, sembrano essere fattori associati a prognosi peggiore di malattia. Per quanto sopra espresso l'asse intestino-cervello-polmone durante l'infezione da COVID-19 può offrire spunti per lo sviluppo terapeutico⁴⁰⁶.

2.6 Ipossia nel covid-19 e microbiota intestinale

Il rilascio anomalo di citochine (cytokine storm) e le risposte infiammatorie possono essere associati all'ipossia in caso di COVID-19 grave. La replicazione virale nei polmoni porta a una tempesta di citochine, distruggendo la normale funzione polmonare e causando ipossiemia, cioè bassi livelli di ossigeno nel sangue. L'Hypoxia-induciblefactor-1 α (HIF-1 α) è un fattore di trascrizione che regola funzioni cellulari come la proliferazione cellulare e l'angiogenesi. In condizioni di ipossia, HIF-1 α induce la produzione di citochine come IL-6 e TNF- α ⁴⁰⁷. Esistono altre cause che contribuiscono a ipossia, tra cui l'infiltrazione polmonare e la trombosi. Il SARS-CoV2 induce una polmonite che causa atelettasia, con conseguenti bassi livelli di ossigeno nell'organismo⁴⁰⁸.

Inoltre, SARS-CoV2 provoca danni mitocondriali, produzione di specie reattive dell'ossigeno e di HIF-1 α , favorendo ulteriormente le infezioni virali e l'infiammazione⁴⁰⁹. Nell'ambito delle sue normali funzioni metaboliche, il microbiota intestinale produce metaboliti neurotrofici, neurotrasmettitori, peptidi e SCFA, i cui livelli vengono alterati a causa del COVID-19. Gli SCFA, come il butirato conferiscono neuroprotezione. La modulazione delle specie microbiche intestinali (responsabili della produzione di tali metaboliti) da parte di SARS-CoV altera la sensibilità all'ipossia, con un impatto negativo sul sistema nervoso centrale⁴¹⁰. Pertanto, si può quindi ipotizzare un'associazione tra microbiota intestinale e ipossia nei pazienti COVID-19, che potrebbe essere legata non solo a danno virale diretto ma anche ad un alterato asse intestino-encefalo-polmoni.

2.7 Implicazioni cliniche del microbiota intestinale nel covid-19

Sebbene in numero limitato, gli studi condotti finora hanno dimostrato in modo coerente la disbiosi intestinale nei pazienti con COVID-19. Un'implicazione clinica più importante consiste nel capire se e come il microbiota intestinale predisponga a vari gradi di gravità del COVID-19.

Potenziale ruolo del microbiota intestinale nel COVID-19 asintomatico/subclinico e lieve

Come accennato in precedenza, lo spettro clinico della COVID-19 varia da asintomatico a grave⁴¹¹. Una recente revisione sistematica ha dimostrato che circa un terzo dei pazienti rimane clinicamente asintomatico dopo l'infezione da SARS-CoV-2¹³⁰. Tuttavia, rimane la possibilità di un processo infiammatorio subclinico. In una revisione sistematica che ha coinvolto 231

pazienti asintomatici affetti da COVID-19, quasi due terzi (63%) presentavano alterazioni polmonari alla tomografia computerizzata (TC)⁴¹². A prescindere dalle sottili alterazioni infiammatorie, un sottogruppo di pazienti potrebbe non manifestare l'intensa risposta infiammatoria che fa presagire una malattia grave. Poiché questa eterogeneità nella gravità clinica sembrava essere meno legata ad un'eventuale esistenza di ceppi meno virulenti di SARS-CoV-2 o alla protezione dall'immunità adattativa data la nuova natura del virus, la risposta immunitaria dell'ospite rimaneva il fattore più probabile nel determinare la gravità della malattia. Non è chiaro se un modello specifico di microbiota intestinale possa proteggere gli individui dall'instaurarsi di un grave stato infiammatorio quando vengono infettati dal SARS-CoV-2. Kumar et al. hanno evidenziato un potenziale legame tra il microbiota ambientale di una popolazione e la gravità delle manifestazioni della malattia da SARS-CoV2. Con dati provenienti da 122 Paesi diversi, è stata osservata una minore mortalità associata alla COVID-19 nei Paesi con una percentuale più alta di popolazione rurale (che alluderebbe a una maggiore diversità microbica intestinale), una percentuale più alta di popolazione residente in baraccopoli e una più bassa qualità dell'acqua e i servizi igienici⁴¹³. Sebbene tali dati osservazionali possano essere soggetti a fattori di confondimento, questi risultati offrono alcune indicazioni sul ruolo potenziale del microbiota intestinale sul carico di malattia della COVID-19.

Potenziale ruolo del microbiota intestinale nel COVID-19 grave

È sempre più evidente che essere anziani e avere uno stato infiammatorio cronico (dovuto a condizioni mediche croniche) predispone a uno stato pro-disbiotico^{414,415}. È improbabile che sia una coincidenza che i tassi più elevati di morbilità e mortalità da COVID-19 siano stati osservati anche negli anziani, nei soggetti con condizioni mediche croniche sottostanti e tra i pazienti immunosoppressi con tumori⁴¹⁶⁻⁴¹⁸. La gravità della malattia è probabilmente dipendente dall'ospite e guidata dalla risposta infiammatoria. Nei campioni autoptici di pazienti con COVID-19 grave, sono state osservate cellule infiammatorie nei polmoni⁴¹⁹, suggerendo un'intensa risposta infiammatoria⁴¹⁸. Inoltre, alcuni studi hanno riportato livelli plasmatici elevati di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 (IL-1), l'IL-6 e il TNF-alfa^{420,421}, nel COVID-19 grave. Nei pazienti inclini alla disbiosi intestinale, ulteriori fattori infiammatori possono far pendere l'ago della bilancia verso un intestino con un'aumentata permeabilità, dando luogo a un circolo di feedback infiammatorio che si autoperpetua. In particolare, due piccoli studi hanno mostrato una correlazione diretta tra la COVID-19 grave e la disbiosi intestinale^{342,422}. Altri due studi hanno dimostrato che i pazienti con COVID-19 grave presentano sintomi gastrointestinali più pronunciati, oltre a livelli più elevati di calprotectina nelle feci (un indicatore dell'infiammazione gastrointestinale e dell'integrità della mucosa)^{340,423}. Ciò supporta il concetto di un crosstalk immunologico tra polmoni e intestino, presumibilmente moderato dal microbiota intestinale³¹⁶.

Parte II

Studi sperimentali

Capitolo 3

Sfide nella gestione dell'infezione da SARS-CoV2: Il ruolo della terapia batterica orale come strategia terapeutica complementare per evitare la progressione del COVID-19.

Questo lavoro nasce da medici in "trincea" durante le prime fasi della lotta contro l'infezione da COVID-19 in Italia. L'urgenza della pandemia ha spostato l'equilibrio tra l'attesa di prove prima dell'impiego di terapia e la creazione di evidenze durante l'assistenza ordinaria ai pazienti, a favore di questa seconda strategia. La Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha concesso un'autorizzazione di emergenza per la prescrizione dell'idrossiclorochina⁴²⁴. L'OMS, il CDC e l'FDA non hanno preso posizione sull'uso del tocilizumab nel COVID-19, anche se la Commissione nazionale cinese per la salute ne raccomandava l'uso nei pazienti affetti da COVID-19, ma solo in presenza di livelli elevati di IL-6⁴²⁵. Inoltre, i medici italiani hanno utilizzato una varietà di approcci empirici per gestire il COVID-19, in un metodo che se vogliamo, possiamo definire "learn by doing"⁴²⁶. È stato urgente determinare quali fossero i migliori interventi contro il COVID-19, ma in assenza di studi clinici che ne guidino la gestione, la mancata raccolta dei dati relativi all'uso di terapie off-label sarebbe stata un'opportunità mancata.

Comprendere il processo invasivo del SARS-COV-2 è essenziale: sappiamo che i punti di ingresso del virus nell'organismo, come i recettori ACE2, sono enzimi legati alle cellule intestinali. Le cellule della mucosa intestinale (enterociti) potrebbero quindi essere un serbatoio per i coronavirus⁴²⁷. Nella fase acuta, solo il 10% dei pazienti affetti da malattia da coronavirus 19 (COVID-19) presenta il DNA del virus nel sangue, ma quasi il 50% di essi lo espelle nelle feci. La forma infettiva del virus è stata addirittura identificata più volte, suggerendo che la via orofecale può rappresentare una modalità di contaminazione⁴²⁷. Ricercatori cinesi hanno studiato i cambiamenti del microbiota nei pazienti deceduti per infezione da COVID-19. Il sequenziamento del loro microbiota ha rivelato una diminuzione significativa di bifidobatteri e lattobacilli, le principali famiglie di batteri simbiotici, e un aumento di batteri opportunisti come *Corynebacterium* o *Ruthenibacterium*⁴²⁷. La disbiosi intestinale come già espresso in precedenza ha un impatto anche sul sistema immunitario polmonare⁴²⁸ e quindi potrebbe rappresentare un fattore di rischio aggiuntivo per lo sviluppo di distress respiratorio indotto da SARS-CoV2. Alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri hanno un ruolo protettivo contro il virus dell'influenza, il rhinovirus, il virus respiratorio sinciziale, l'adenovirus e il pneumovirus^{429,430}. In questo capitolo è riportata una "istantanea", la prima, su 70 pazienti ricoverati presso il Dipartimento di Malattie Infettive tra il 9 marzo e il 4 aprile 2020. Un gruppo di pazienti è stato trattato con idrossiclorochina, Tocilizumab e antibiotici da soli o in combinazione, mentre ad un secondo gruppo di soggetti è stata somministrata una batterioterapia orale in aggiunta alla terapia farmacologica standard.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare il possibile ruolo di una batterioterapia orale specifica come strategia terapeutica complementare per evitare la progressione del COVID-19.

3.1 Popolazione studiata, impostazione e raccolta dei dati

I pazienti valutati in questo studio sono stati ricoverati presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Policlinico Umberto I, "Sapienza" Università di Roma, Italia, tra il 9 marzo, 2020 e il 4 aprile 2020 (unità di cura sub-intensiva per COVID-19). L'approvazione per lo studio è stata ottenuta dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I.

Tutti i pazienti si trovavano a casa prima di recarsi al Dipartimento di Emergenza e poi da lì esser trasferiti presso il nostro Dipartimento. I tamponi orofaringei e nasofaringei per la diagnosi di COVID-19 sono stati eseguiti in duplice copia per la ricerca dei geni E e S del SARS-CoV-2 mediante Real-Time PCR.

Tutti i pazienti erano positivi al COVID-19 e presentavano i seguenti criteri clinici: febbre: > 37,5°C, necessità di ossigenoterapia non invasiva e coinvolgimento polmonare alla TAC superiore al 50%. Sono quindi stati diagnosticati con COVID-19 sintomatico, che tuttavia al momento della valutazione non richiedeva l'intubazione endotracheale e ventilazione meccanica invasiva. L'ossigenoterapia è stata somministrata tramite maschera di Venturi nei pazienti con respirazione spontanea; se l'ipossiemia persisteva, veniva somministrata pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP). La dispnea è stata definita come "un'esperienza soggettiva di disagio respiratorio che consiste in di sensazioni qualitativamente distinte che variano in intensità"⁴³¹. La diarrea acuta è stata definita come feci con un aumento del contenuto di acqua, del volume o della frequenza che dura <14 giorni⁴³². La TAC ad alta risoluzione è stata utilizzata per identificare il coinvolgimento polmonare in base al protocollo ufficiale di diagnosi e trattamento (6° edizione) dichiarato dalla Commissione Nazionale per la Salute della Cina. I reperti TC tipici della COVID-19 erano (1) opacità a vetro smerigliato, (2) consolidamento, (3) pattern reticolare, (4) pattern "crazy paving"⁴³³. I pazienti con grave ipossiemia acuta dovuta alla polmonite da COVID-19 e che necessitavano di una ventilazione meccanica invasiva sono stati trasferiti all'Unità di Terapia Intensiva (UTI) del Policlinico Umberto I. Poiché al momento dello studio non vi erano terapie codificate o linee guida per il trattamento medico del COVID-19, i pazienti sono stati trattati con pazienti sono stati trattati con idrossiclorochina (HCQ) 200mg bid, antibiotici (ABX) (azitromicina 500mg) e Tocilizumab (TCZ) al dosaggio di 8mg/kg (fino a un massimo di 800 mg per dose) con un intervallo di 12 ore per due volte, eventualmente più il supporto di ossigeno. In aggiunta ai trattamenti di cui sopra, i pazienti scelti in maniera randomica hanno iniziato la batterioterapia orale dal 13 marzo. Per ogni paziente, sono stati calcolati al basale: il Charlson Comorbidity index (CCI)⁴³⁴, il fabbisogno di ossigeno e i valori di laboratorio comprendenti alanina aminotransferasi (ALT), l'aspartato aminotransferasi (ALT), l'emoglobina (Hb), pH, bicarbonati (HCO₃), acido lattico e pressione arteriosa dell'anidride carbonica (PaCO₂), La pressione parziale di ossigeno arterioso (PaO₂), la frazione di ossigeno inspirato (FiO₂), la scomparsa dei sintomi associati a COVID-19, gli eventi avversi e il numero di pazienti trasferiti in terapia intensiva sono stati raccolti a 24 ore, 48 ore, 72 ore e 7 giorni dall'inizio della batterioterapia orale e dall'inizio del ricovero per tutti i pazienti indipendentemente dai trattamenti assunti.

3.1.1 Batterioterapia orale

La formulazione somministrata in questo studio conteneva: *Streptococcus thermophilus* DSM 32345, *L. acidophilus* DSM32241, *L. helveticus* DSM 32242, *L. paracasei* DSM 32243, *L. plantarum* DSM 32244, *L. brevis* DSM 27961, *B. lactis* DSM 32246, *B. lactis* DSM 32247. Ormendes SA, Losanna, Svizzera, che ha fornito il prodotto Sivomixx® (SivoBiome Rin USA) è responsabile della standardizzazione del prodotto in termini di contenuto enzimatico, profilo biochimico e immunologico. La batterioterapia orale prevedeva l'utilizzo di 2.400 miliardi di batteri al giorno. La formulazione è stata somministrata in tre dosi uguali al giorno.

3.1.2 Analisi statistica

Non sono stati eseguiti calcoli sulla dimensione del campione. Le variabili categoriali sono state confrontate utilizzando il test χ^2 e mostrate come frequenze assolute e percentuali. Il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato per verificare la normalità della distribuzione delle variabili continue. Nel caso in cui non fossero distribuite normalmente, è stata eseguita una trasformazione logaritmica secondo la trasformazione di BoxCox con $-0,25 \leq l \leq 0,25$. Per le variabili continue normalmente distribuite, i valori medi tra due gruppi sono stati confrontati con il test di Student e indicati come media \pm SD (deviazione standard); per i dati non normalmente distribuiti, è stato utilizzato il test di Mann-Whitney e indicati come mediana (25°-75°). L'analisi longitudinale dei dati relativi all'insufficienza respiratoria rispetto al gruppo "non trattato vs. trattato" è stata eseguita con un General Linear Mixed Model con la procedura GLIMMIX considerando la distribuzione binaria e il logit come funzione di collegamento. La correzione Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) è stata utilizzata per tenere conto dei test di ipotesi multiple quando necessario. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS v.9.4 e JMP v. 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.2 Risultati

I dati relativi a 70 soggetti positivi al test per SARS-CoV-2 (età mediana, 59 anni, IQR 50-70) sono stati raccolti nel periodo 9 marzo-4 aprile 2020. Nessuno dei pazienti aveva recentemente viaggiato in Cina, Corea del Sud o Iran. I pazienti non sono stati in grado di confermare se avessero avuto contatti con persone infette da COVID-19 e non sono stati precisi nel ricordare la durata esatta dei sintomi prima del ricovero in ospedale. La percentuale di donne (29, 41,4%) era inferiore rispetto a quella dei maschi (41, 58,6%). La sintomatologia dei pazienti al momento del ricovero è stata: febbre (66, 94,3%), tosse (54, 77,1%), dispnea (44, 62,9%), cefalea (11, 15,7%), astenia (15, 21,4%), mialgia (4, 5,7%), diarrea (33, 47,1%), mentre 56 (80,0%), presentavano da 1 a 6 comorbidità. Un gruppo di 28 soggetti ha ricevuto la batterioterapia orale (OB+), mentre un altro gruppo di 42 individui che non ha ricevuto la batterioterapia orale (OB-) è stato il gruppo di confronto. La tabella 5 mostra le caratteristiche dei pazienti al momento del ricovero. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra il gruppo OB+ e quello OB- rispetto a sesso, età, AST, ALT, Hb, indice di massa corporea (BMI) e CCI al basale. Non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi anche per i parametri respiratori e per la percentuale di soggetti che presentavano diarrea, febbre, tosse, dispnea, cefalea, astenia e mialgia. Inoltre, tutti i pazienti presentavano segni clinici e radiologici compatibili con polmonite da COVID-19 e necessitavano di assistenza respiratoria in ambito ospedaliero, ma non di supporto rianimatorio. I due gruppi di pazienti erano omogenei per quanto riguarda la proporzione di soggetti che necessitavano di un supporto di ossigeno non invasivo, erogato tramite maschera di Venturi, in respirazione spontanea o tramite pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP).

In particolare, al momento del ricovero, una percentuale significativamente più alta di pazienti con insufficienza respiratoria era presente nel gruppo trattato con batterioterapia orale rispetto a quello OB- (OB- 11/42, 26,2%; OB+ 14/28, 50%; $p = 0,042$). Inoltre, tutti i pazienti arruolati erano classificabili nello stadio III (polmonite grave COVID-19) della classificazione sindromica proposta dalla Società Italiana di Anestesia e Rianimazione (SIAARTI) (12). Per quanto riguarda le terapie farmacologiche, i due gruppi non si sono differenziati per numero, tipo e combinazioni di farmaci somministrati durante il periodo di ricovero (tabella 6). Il tempo mediano dalla diagnosi all'inizio della somministrazione della batterioterapia orale è stato di 1 giorno (min 0-max 2) e la durata del trattamento è stata di 14 giorni per tutti i pazienti.

Tabella 5. Caratteristiche dei gruppi di pazienti ottenute sulla base della somministrazione di batterioterapia.

Caratteristiche	OB + (N 28)		OB- (N 42)		p-value
	Oss.	Valori	Oss.	Valori	
Età (anni)	28	59 ±14.4	42	60.5±14.2	0.66
Sesso maschile	28	17 (60.7)	42	24 (57.1)	0.77
BMI (kg/m)	27	24.7±3.4	42	23.4±3.5	0.13
ALT (U/Lt)	27	22.7±10.5	42	30.5±22.2	0.16
AST /U/Lt)	27	37±33.5	42	40.5±33	0.56
Hb (g/dl)	27	13 (12-14)	42	13 (12-14)	0.58
CCI	28	2 (1-3)	41	2 (1-3)	0.64
Sintomi					
Febbre	28	27 (96.4)	42	39 (92.9)	0.53
Tosse	28	22 (78.6)	42	32 (76.2)	0.82
Dispnea	28	20 (71.4)	42	24 (57.1)	0.23
Astenia	28	6 (21.4)	42	9 (21.4)	1.0
Cefalea	28	3 (10.7)	42	8 (19.0)	0.35
Mialgie	28	2 (7.1)	42	2 (4.8)	0.67
Diarrea	28	14 (50.0)	42	19 (45.2)	0.70
Parametri Respiratori					
FiO2 %	27	31 (21-43)	39	21 (21-35)	0.17
sO2%	24	99 (97-99)	36	99 (97-100)	0.89
pH	26	7.5 (7.4-7.5)	35	7.5 (7.4-7.5)	0.71
HCO3- (mmol/L)	26	25.47 ±3.37	33	25.58±2.74	0.89
Lattati (mmol/L)	26	0.9±0.4	34	0.9±0.3	0.74
pO2 (mmHg)	27	89 (76-103)	39	86 (77-97)	0.73
pCO2 (mmHg)	26	36 (32-39)	36	36 (34-39)	0.40
Supporto di ossigeno					
Maschera venturi	28	25 (89.3)	42	38 (90.5)	0.87
CPAP	28	3 (10.7)	42	3 (7.1)	0.60

La somministrazione della terapia batterica orale è stata associata alla scomparsa della diarrea in tutti i pazienti entro 7 giorni. È interessante notare che un'ampia percentuale di soggetti OB+ (6/14, 42,9%) ha risolto la diarrea entro 24 ore e la quasi totalità (13/14, 92,9%) entro 3 giorni (Figura 7A). Anche gli altri segni e sintomi - febbre, astenia, cefalea, mialgia e dispnea - considerati cumulativamente, hanno presentato un andamento simile, più evidente a partire dal secondo giorno di batterioterapia (Figura 1B). In particolare, meno della metà dei pazienti non trattati con batterioterapia ha registrato la scomparsa della diarrea o degli altri sintomi entro 7 giorni. Per quanto riguarda l'esito respiratorio, applicando il modello misto lineare generale con la procedura GLIMMIX, abbiamo osservato una differenza significativa nell'evoluzione dell'esito respiratorio tra il gruppo OB+ e quello OB- ($p < 0,001$). Dopo 7 giorni di trattamento, il modello calcolato ha mostrato un rischio significativamente ridotto di 8 volte di evolvere in un'insufficienza respiratoria, ad es, con necessità di supporto rianimatorio, ventilazione in posizione prona o ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO) per i pazienti supplementati con la batterioterapia rispetto ai soggetti OB- (Figura 8). Il prolungamento dell'intervallo QT, le anomalie epatiche e renali e l'immunosoppressione sono stati monitorati attentamente, anche per la propensione all'aumento dell'intervallo QT nei pazienti trattati con azitromicina. Non sono stati registrati eventi avversi. I pazienti trattati con Tocilizumab hanno riferito un senso di astenia dopo la somministrazione del farmaco e una riduzione della

pressione sanguigna, che non ha richiesto alcun trattamento medico. Al 4 aprile 2020, sebbene in maniera non statisticamente significativa, il gruppo OB- ha mostrato una maggiore prevalenza di pazienti trasferiti in terapia intensiva per effettuare ventilazione meccanica (OB- vs. OB+; 2/42, 4,8% vs. 0/28, 0,0%) o deceduti (OB- vs. OB+; 4/42, 9,5% vs. 0/28, 0,0%). La prevalenza osservata di pazienti deceduta nel gruppo di controllo è risultata in linea con quella (media \pm SD 9,4 \pm 1,7%;) registrata in Italia nel periodo 9 marzo-4 aprile 2020 (13). Tutti i pazienti trattati con batterioterapia orale sono sopravvissuti alla malattia COVID-19 e nessuno ha richiesto la ventilazione meccanica invasiva e il ricovero in terapia intensiva.

Tabella 6. Terapie farmacologiche somministrate ai gruppi di soggetti sulla base della somministrazione di batterioterapia.

	OB + (N 28)		OB- (N 42)		p-value
	Oss.	Valori	Oss.	Valori	
Terapie somministrate n°(%)					
HCO	28	25 (89.3)	42	40 (95.2)	0.34
TCZ	28	7 (25)	42	16 (38.1)	0.25
ABX	28	11 (39.3)	42	21 (50)	0.38
Terapie somministrate n°(%)					0.16
Nessuna	28	2 (7.1)	42	1 (2.4)	
1 farmaco	28	13 (46.4)	42	11 (26.2)	
2 farmaci	28	9 (32.1)	42	24 (57.1)	
3 farmaci	28	4 (14.3)	42	6 (14.3)	
Combinazioni di farmaci n°(%)					
HCO/TCZ/ABX	28	4 (14.3)	42	6 (14.3)	1.0
HCO/TCZ	28	2 (7.1)	42	9 (21.4)	0.11
HCO/ABX	28	6 (21.4)	42	15 (35.7)	0.20
TCZ/ABX	28	1 (3.6)	42	0 (0)	0.22

Un $p \leq 0,05$ è stata considerata statisticamente significativa. ABX, antibiotici; HCO, idrossiclorochina; IRQ, intervallo interquartile; Obs., numero di osservazioni disponibili per ogni gruppo; TCZ, Tocilizumab

3.3 Discussione e Conclusione

I risultati hanno evidenziato una peggiore sopravvivenza e un rischio maggiore di trasferimento in terapia intensiva per i pazienti che non erano stati trattati con batterioterapia. Inoltre, il rischio stimato di sviluppare un'insufficienza respiratoria durante il corso della malattia era di otto volte inferiore nel gruppo trattato con batterioterapia orale rispetto a quello non trattato. Per quanto riguarda gli altri segni e sintomi associati a COVID-19, cioè diarrea, febbre, tosse, dispnea, astenia, mialgia, un miglioramento significativo è stato già evidente dopo 24-48 ore dall'inizio della batterioterapia. Esistono potenziali comunicazioni anatomiche e percorsi complessi che coinvolgono l'asse intestino-polmone (GLA)⁴³⁰. Il sistema linfatico mesenterico è il percorso tra i polmoni e l'intestino, attraverso il quale i batteri, i loro frammenti e/o i loro metaboliti possono attraversare la barriera intestinale per raggiungere la circolazione sistemica e influenzare la risposta immunitaria polmonare^{345,363,435}. I metaboliti intestinali influenzano in modo significativo non solo l'immunità locale intestinale, ma anche altri organi attraverso il sistema linfatico e circolatorio. Ad esempio, gli acidi grassi a catena corta (SCFA) prodotti principalmente dalla fermentazione batterica della fibra alimentare, agiscono nei polmoni come segnale per attenuare le risposte infiammatorie e allergiche^{383,436}. I topi con carenza di recettori per gli SCFA mostrano un aumento delle risposte infiammatorie in modelli sperimentali di asma³⁶³. Le cellule umane possiedono sistemi di difesa anti-ossidativa per la loro protezione contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate dai virus; tuttavia, le infezioni virali spesso inibiscono tale risposta⁴³⁷. Non c'è motivo di credere che questo non sia vero anche per il COVID-19. Abbiamo ipotizzato che nei pazienti infetti da COVID-19, una formulazione batterica con il profilo biochimico e immunologico "appropriato" potrebbe innescare diverse funzioni biologiche protettive. I ceppi batterici presenti nel prodotto somministrato aumentano

la produzione del fattore nucleare eritroide 2p45 (Nrf2) e del suo bersaglio Eme ossigenasi-1 (HO-1)⁴³⁸. Queste molecole esercitano un'attività antivirale attraverso la riduzione dello stress ossidativo. Nrf2 e HO-1 hanno una significativa attività antivirale contro un'ampia varietà di virus, tra cui il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il virus dell'influenza, il virus respiratorio sinciziale, il virus della Dengue e il virus dell'Ebola. In particolare, le proprietà benefiche dell'espressione di HO-1 è stata descritta per virus che producono malattie polmonari. I topi che sovraesprimono HO-1 nei polmoni mostrano una minore infiltrazione di cellule infiammatorie nei polmoni e una minore apoptosi delle cellule epiteliali respiratorie, rispetto ai topi di controllo. Pertanto, l'espressione di HO-1 previene una risposta immunitaria esacerbata in questo tessuto e il conseguente danno⁴³⁹. La raccolta dei dati clinici, l'esame e l'assistenza dei pazienti affetti da COVID-19 sono impegnativi per il rischio di trasmissione del virus. La nostra iniziativa mirava a modulare l'asse intestino-polmone, facilitare la gestione del paziente e possibilmente determinare l'esito dell'infezione polmonare.

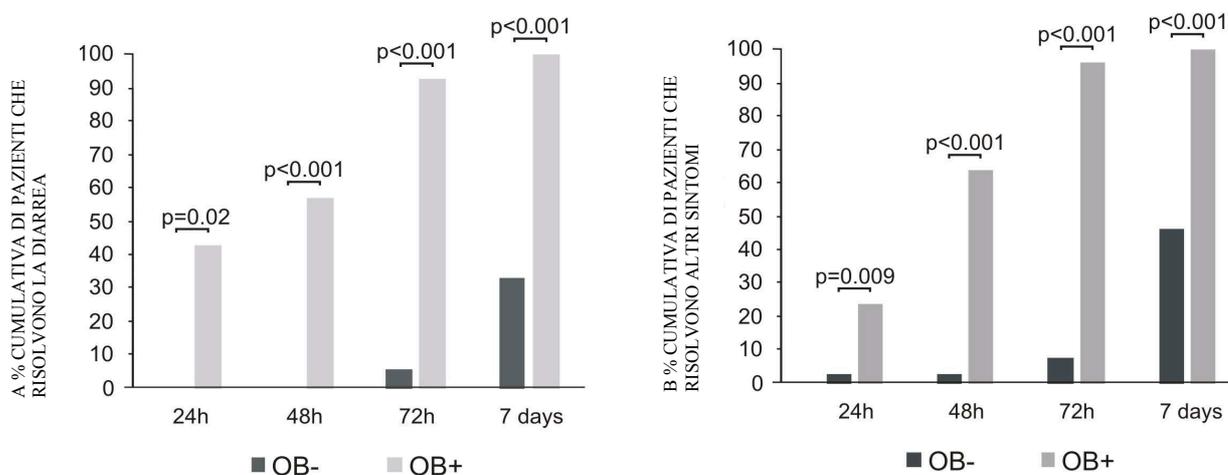


FIGURA 7. I diagrammi a barre con codice colore basati sulla somministrazione di probiotici mostrano la scomparsa della diarrea (A) e degli altri sintomi (B) in diversi punti temporali. È stata inoltre utilizzata la correzione FDR di Benjamini Hochberg per tenere conto dei test di ipotesi multipli.

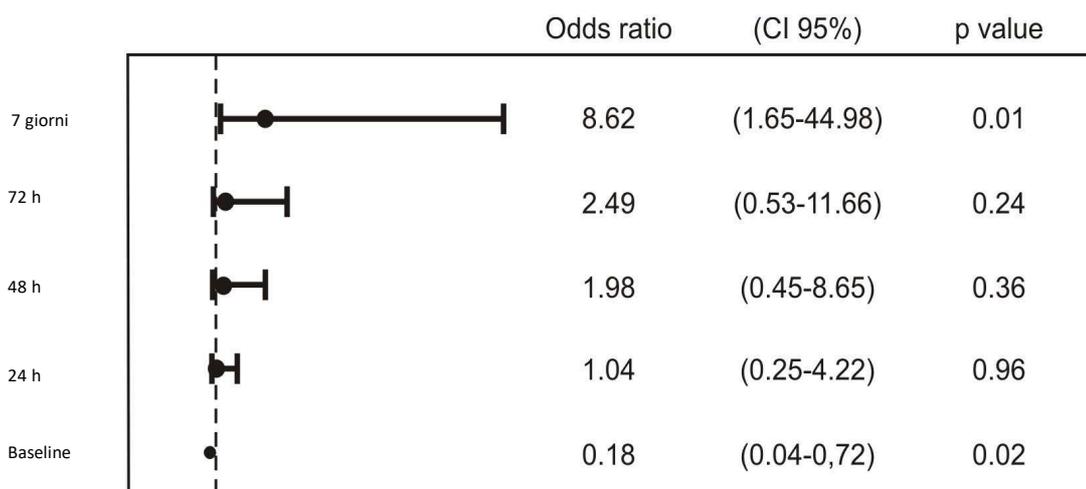


FIGURA 8. Analisi dei dati longitudinali per la variabile respirazione in relazione al gruppo "OB- vs. OB+" eseguita con GLIMMIX. Per ogni punto temporale sono stati riportati l'oddsratio, l'intervallo di confidenza al 95% e la significatività statistica.

Capitolo 4

Terapia batterica orale in pazienti con COVID-19: Uno studio retrospettivo di coorte

La polmonite e i sintomi gastrointestinali come manifestazioni cliniche predominanti della COroNaVIrusDisease-19 (COVID-19) non sono casuali⁴⁴⁰. Sia il polmone che l'intestino esprimono il recettore ACE2, attraverso il quale SARS-CoV-2 può entrare nelle cellule. Nell'intestino, dove i recettori ACE2 sono abbondantemente presenti, i coronavirus possono moltiplicarsi rapidamente. Uno studio recente ha rilevato che l'infezione dura generalmente più a lungo nei pazienti con COVID-19 che hanno avuto in precedenza problemi gastrointestinali⁴⁴¹. Gli anziani o i soggetti con diabete mellito (DM), ipertensione, malattie cerebrovascolari e malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO) hanno un rischio maggiore di morte per infezione grave^{442,443}. Le co-morbilità sopra menzionate presentano un denominatore comune: la disbiosi intestinale. Le alterazioni della composizione del microbiota intestinale e la perdita di specie batteriche intestinali chiave potrebbero essere un fattore facilitante per una risposta immunitaria disregolata contro il SARS-CoV-2⁴⁴⁴. Pertanto, l'integrazione con microbi benefici del tratto gastrointestinale di individui infetti da SARS-CoV-2 non sembra illogica. Nel precedente lavoro abbiamo riportato i risultati di uno studio "real life" che analizzava gli effetti di una batterioterapia orale come supporto al trattamento standard di cura in pazienti ricoverati per polmonite da SARSCoV2 e sintomi gastrointestinali associati⁴⁴⁵. In particolare, abbiamo osservato che il trattamento combinato può indurre, entro 72 ore, la remissione della diarrea e di altri sintomi rispetto a meno della metà dei pazienti che hanno ricevuto la sola terapia migliore disponibile (BAT). Inoltre, il rischio stimato di sviluppare un'insufficienza respiratoria era otto volte inferiore nei pazienti che ricevevano anche la batterioterapia orale. Abbiamo successivamente esteso la nostra osservazione ed in questo capitolo sono riportati i risultati di uno studio più ampio "real life" sull'uso complementare di una specifica batterioterapia orale (Sivomixx®, un prodotto multistain contenente cinque ceppi di lattobacilli, due di bifidobatteri e un ceppo di *Streptococcus thermophilus*) in una coorte di individui infettati da SARS-CoV2 e sottoposti a BAT. In questo studio abbiamo comparato il tasso di mortalità grezza, la necessità di ricovero in unità di terapia intensiva (ICU) e la durata del ricovero, in pazienti con polmonite grave da COVID-19 che hanno ricevuto la migliore terapia disponibile (BAT) rispetto a pazienti trattati con BAT e supplementati con terapia batterica orale. Sono stati valutati i pazienti ricoverati nei reparti del Dipartimento di Malattie Infettive del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma, Italia, dal 6 marzo al 26 aprile 2020.

4.1 Materiali e metodi

La diagnosi di SARS-CoV-2 è stata definita come un tampone orofaringeo e nasofaringeo positivo per COVID-19. È stata eseguita in duplicato per i geni E e S della SARS-CoV-2 mediante Real-Time PCR (RT-PCR). La popolazione studiata comprendeva soggetti di età superiore ai 18 anni. Tutti i pazienti ricoverati hanno ricevuto regimi terapeutici che comprendevano idrossiclorochina (200 mg due volte al giorno per 7 giorni), azitromicina (500 mg una volta al giorno per 7 giorni), lopinavir-ritonavir (400/100 mg due volte al giorno) o darunavir-cobicistat (800/150 mg una volta al giorno) per 14 giorni ed eparina a basso peso molecolare per la profilassi della trombosi venosa profonda, come raccomandato all'epoca dalla

Società Italiana di Malattie Infettive. Tocilizumab (8mg/kg fino a un massimo di 800mg per dose con un intervallo di 12 ore per due volte) è stato somministrato in caso di livelli sierici elevati di IL-6 o in caso di peggioramento significativo del quadro respiratorio anche in caso di assenza del dosaggio di IL-6. I pazienti ricoverati in reparto in caso di sintomi intestinali hanno ricevuto, oltre alla BAT, anche una supplementazione con terapia batterica orale. La formulazione commerciale utilizzata era composta da *Streptococcus thermophilus* DSM 32245, *Bifidobacterium lactis* DSM 32246, *Bifidobacterium lactis* DSM 32247, *Lactobacillus acidophilus* DSM 32241, *Lactobacillus helveticus* DSM 32242, *Lactobacillus paracasei* DSM 32243, *Lactobacillus plantarum* DSM 32244 e *Lactobacillus brevis* DSM 27961 (Sivomixx®). La formulazione è stata somministrata in tre dosi uguali al giorno, per un totale di 2.400 miliardi di batteri al giorno. La fonte dei dati per l'analisi delle informazioni sui pazienti è stata ricavata dalle cartelle cliniche elettroniche del Sistema Informativo Elettronico Ospedaliero. Le variabili considerate per lo studio comprendevano: (1) età, sesso, data di ammissione e di dimissione dall'ospedale, durata della degenza (LOS); (2) malattie cardiovascolari (CV), malattie polmonari croniche, malattie renali croniche (CKD), ipertensione, asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), diabete mellito, immunodeficienza, cancro (definito come attivo o passato/risolto).

Abbiamo utilizzato Charlson score per predire la mortalità a 1 anno per pazienti con diverse condizioni di comorbidità. Il CURB (Confusione - urea - frequenza respiratoria - pressione sanguigna, CURB-65 (Confusione-Urea-Respirazione respiratoria, pressione arteriosa, età > 65 anni), l'expandend CURB-65 (Confusione – urea - frequenza respiratoria - pressione sanguigna, età >65 anni, lattato deidrogenasi, piastrine e albumina) e Pneumonia Severity Index (PSI) sono stati utilizzati per definire la gravità della polmonite. Per predire inoltre la progressione del COVID-19 abbiamo preso in considerazione il CALL score (Comorbidità-Età-Linfociti-Lattato Deidrogenasi).

4.1.1 Analisi Statistica

Le analisi statistiche sono state condotte con il software Statistical package for social science (SPSS), versione 22 (IBM SPSS, Chicago, III). I dati continui sono stati presentati come mediane (IQR, 25°-75°) e la presenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi è stata valutata con il test U non parametrico di Mann-Whitney. Le variabili dicotomiche sono state descritte come semplici frequenze e percentuali (%) e poi confrontate con il test del chi-quadro per i due gruppi. È stata eseguita un'analisi multivariata di regressione graduale aggiustata per diversi fattori potenziali di confondimento, con Età > 65 anni, Linfociti < 1.000 in 1 µL di sangue, piastrine < 150-103/mm³, albumina < 32 g/dL, eventi CV, terapia BAT e terapia batterica orale come variabili dipendenti. Abbiamo eseguito un'analisi di sopravvivenza standard, seguendo i partecipanti dall'inizio del ricovero alla dimissione o al decesso. La sopravvivenza libera da eventi nel follow-up è stata rappresentata graficamente dalla curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier, utilizzando l'analisi di regressione di Cox multivariata, compresi i fattori di confusione con covariate fisse al basale. L'effetto del trattamento è stato mostrato utilizzando un odds ratio (OR) con un IC del 95%. I principali fattori confondenti sono stati identificati come l'età, Proteina C-reattiva (CPR), indice di comorbidità di Charlson, CURB, CURB-65, PSI, Call, numero di linfociti e numero di piastrine e sono le cause più probabili dell'assegnazione al trattamento e del rischio di esito. Un p-value < 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

4.2 Risultati

I dati utilizzati provengono dai pazienti ricoverati nei reparti del Dipartimento di Malattie Infettive dal 6 marzo al 26 aprile, con diagnosi di infezione da SARS-CoV-2. Sono stati inclusi duecento pazienti. Sono stati inclusi duecento pazienti; le caratteristiche demografiche e cliniche dell'intera popolazione arruolata sono riportate nella Tabella 7. Non siamo in grado di riportare la durata dei sintomi prima del ricovero in ospedale. Tuttavia, siamo certi che il

ricovero sia avvenuto entro pochi giorni dall'insorgenza dei sintomi respiratori, dal momento che nella Regione Lazio è presente un efficiente servizio sanitario gratuito. La durata mediana del ricovero è stata di 15 giorni [IQR, (10-27)]. Dei 200 pazienti, 112 hanno ricevuto BAT, mentre per 88 soggetti la BAT è stata abbinata alla batterioterapia orale. Le caratteristiche dei due gruppi sono riportate nella Tabella 8. La batterioterapia orale è stata iniziata dopo una mediana di 1 giorno (min 0, max 2) dal ricovero in ospedale. I due gruppi erano comparabili per l'indice di comorbidità di Charlson e la gravità della polmonite correlata alla SARS-CoV-2. Le concentrazioni di CRP sono risultate significativamente più elevate rispetto a quelle di altri gruppi. Le concentrazioni di CRP erano significativamente più alte inizialmente nel gruppo trattato con BAT e batterioterapia. Nello stesso gruppo, la LDH era significativamente più bassa ($p = 0,012$). Nei soggetti trattati solo con con BAT, l'albumina era più bassa rispetto al gruppo trattato con BAT e batterioterapia.

Tabella 7. Caratteristiche demografiche e cliniche dell'intera popolazione arruolata.

Parametri	Media (\pm SD)	Mediana (IQR 25-75%)	Numeri (%)
Sesso, Maschi/Femmine	-	-	113(57) / 87(43)
Età	63 (± 15)	63 (54-75)	-
	Maschi 62 (± 15)		
	Femmine 64 (± 16)		
Leucociti	6,261.5 ($\pm 2,766.4$)	5,660 (4,420-7,205)	-
Neutrofili (mmc)	4,606.7 ($\pm 2,641.8$)	4,050 (2,795-5,664)	-
Neutrofili (%)	70.8 8 (± 13.1)	72.3 (63.3-81)	-
Linfociti mmc)	1,083.4 (± 649.2)	920 (670.0-1,330)	-
Linfociti (%)	19.2 (± 10.6)	16.8 (11.5-29)	-
Proteina C reattiva (mg/L)	98,855.8 ($\pm 121,164.2$)	53,165.0 (16,937.5-140,025)	-
D-dimero (mg/dl)	1,312 ($\pm 1,200.0$)	878.0 (495.5-1547)	-
Albumina (mg/dl)	36.9 (± 5.7)	37.5 (33-42)	-
LDH (U/l)	333.0 (± 168.5)	288.0 (226.5-391)	-
Piastrine (mmc)	225,087 ($\pm 91,487$)	208,000 (161,250-262,500)	-
Durata dell'ospedalizzazione	20 ($\pm 13,8$)	15 (10-27)	-
Charlson index	2.6 (± 2.2)	2.0 (1-4)	-
CURB-65	1.1 (± 0.8)	1.0 (0-2)	-
EXP CURB-65	2.2 8 ± 1.4)	2.0 (0-3)	-
PSI	73.4 (± 29.6)	70.0 (51-89)	-
CALL	8.7 (± 2.6)	9.0 (7-11)	-
Morte	-	-	44 (22)

4.2.1 Mortalità ridotta nei pazienti trattati con BAT più batterioterapia orale

L'endpoint primario era la mortalità ospedaliera grezza in regime di ricovero, valutata in ciascun gruppo di trattamento. La mortalità grezza cumulativa è stata del 22% (44 pazienti). Dieci pazienti (11%) sono deceduti nel gruppo di pazienti trattati con BAT più batterioterapia orale contro 34 (30%) soggetti nel gruppo di pazienti gestiti solo con BAT ($p < 0,001$). La riduzione significativa del rischio di morte presente per i pazienti trattati sia con BAT che con batterioterapia orale è stata riconfermata dopo l'aggiustamento per età, punteggio Charlson e CURB, CURB-65, PSI e Call con un OR di 0,28 (95% CI, 0,13-0,6, $p = 0,001$). Il calcolo di Kaplan-Meier non ponderato ha mostrato l'effetto benefico della combinazione di BAT e batterioterapia orale sul parametro probabilità di morte (log rank $p = 0,035$ Figura 9). All'analisi multivariata, l'età > 65 anni, la CRP $> 41,8$ mg/L, le piastrine < 150.000 mmc e gli eventi CV sono stati associati all'aumento del rischio di mortalità. La batterioterapia orale è stata una variabile indipendente associata a un rischio ridotto di morte (Figura 10).

Tabella 8. Popolazione stratificata in due gruppi sulla base della terapia: BAT o BAT più terapia batterica orale

Parametri	BAT (n-112)			BAT + terapia batterica orale (n -88)			p-value
	Media (±SD)	Mediana (IQR 25-75%)	Numeri (%)	Media (±SD)	Mediana (IQR 25-75%)	Numeri (%)	
Sesso Maschi/Femmine	-	-	64 (57)/48(43)	-	-	49(56)/39(44)	0.978
Età	64 (±16)	63 (55-75)	-	62(±15)	63(52-72)	-	0.289
Età>65 anni	-	-	53 (479)	-	-	38(43)	0.448
Linfociti <1,000 (mmc)	-	-	60 (54)	-	-	49(56)	0.898
PLT <150,000 (mmc)	-	-	16 (14)	-	-	22(25)	0.718
Albumina <32 (mg/dl)	-	-	20 (18)	-	-	7(8)	0.024
PCR >41.8 (mg/L)	-	-	64 (57)	-	-	40(45)	0.055
Leucociti (mmc)	6,306 (±2,624)	5,740 (4,570-7,450)	-	6,206(±2,944)	5,590(4,327-7,155)	-	0.803
Neutrofili (mmc)	4,716 (±2,525)	4,100 (2,990-5,689)	-	4,473(±2,785)	3,785(2,692-5,592)	-	0.528
Neutrofili (%)	72 (±12.7)	73 (65.80)	-	69(±13.5)	68(61-79)	-	0.076
Linfociti (mmc)	1,013 (±517)	920 (640-1,300)	-	1,168(±775)	923(687-1,350)	-	0.111
Linfociti (%)	18 (±9.9)	16 (12-24)	-	20(±11.4)	18(11-28)	-	0.162
PCR (mg/L)	11,645 (±133,032)	63,540 (22,375-160,770)	-	77,257(±101,404)	34,900(12,375-113,970)	-	0.020
D-dimero (mg/dl)	1,444 (±1,1990)	1,268 (627-3,147)	-	1,193(±1,212)	788(484-1,770)	-	0.188
Albumina(mg/dl)	35.9(±5.8)	37 (32-40)	-	38.1(±5.4)	39.0(34-42)	-	0.008
LDH (U/L)	359(±1,923)	310 (242.3-419.3)	-	300.8(±126)	272.0(211-379)	-	0.012
Charlson index	2.7 (±2.3)	2 (1-4)	-	2.3(±2.0)	2(1-4)	-	0.313
BMI	23(±3)	-	-	24(±2.0)	-	-	0.130
CURB-65	1(±1)	1(0-2)	-	1(±1)	1(0-2)	-	0.395
EXP CURB-65	2 (±1)	2(1-3)	-	2(±1)	2(1-3)	-	0.108
PSI	76(±31)	73 (54-91)	-	71(±28)	69(49-86)	-	0.211
CALL	9(±3)	9 (7-11)	-	9(±3)	9(7-11)	-	0.869
Durata dell'ospedalizzazione	18(±13)	14 (8-23)	-	23(±149)	20(11-31)	-	0.012
Ricovero in ICU	-	-	24 (19)	-	-	16 (18)	0.847
Storia di malattia CV	-	-	0 (0)	-	-	0(0)	1.000
Morte	-	-	34 (30)	-	-	10(11)	<0.001
Batteriemia (BSI)	-	-	14 (13)	-	-	7(8)	0.211
Sovrainfezioni polmonari	-	-	9 (8)	-	-	8(9)	0.904
Infezioni Fungine	-	-	2 (2)	-	-	0(0)	0.158

4.2.2 Ricovero in ICU

Un grave peggioramento delle condizioni cardio-respiratorie è stato il motivo del trasferimento del paziente in terapia intensiva. Questi pazienti avevano un numero inferiore di piastrine e linfociti e un valore più alto di PCR rispetto ai pazienti rimasti nel reparto di accettazione. La necessità di cure in terapia intensiva è stata del 21,4% (24/112) nel gruppo BAT e del 18,1% (16/88) nel gruppo BAT + terapia batterica orale. I pazienti che hanno ricevuto BAT + terapia batterica orale avevano un rischio simile di trasferimento in terapia intensiva rispetto alla popolazione che riceveva solo BAT (calcolato con il modello di regressione di Cox non aggiustato: OR, 1,3, 95% CI 0,8-2,4, p = 0,270, vs. OR, 1,0, 95%CI 0,6-2,5, p = 0,554). Questi dati sono stati supportati da varie analisi volte a controllare i fattori confondenti come età, CRP, Charlson Comorbidity Index, exp CURB-65, CURB-65, PSI, Call, numero di linfociti, numero di piastrine e l'effetto del trattamento. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda l'incidenza di superinfezioni batteriche e fungine in terapia intensiva. I pazienti trattati con BAT hanno avuto un'ospedalizzazione di 14 (IQR, 8-23) giorni rispetto ai 20 (IQR, 11-31) giorni registrati per i pazienti sottoposti a BAT + terapia batterica orale (p < 0,001).

4.2.3 Profilo di sicurezza

Tutti i pazienti sono stati monitorati per il prolungamento dell'intervallo QT durante il trattamento con idrossiclorochina e azitromicina, oltre che per il profilo biochimico. Alcuni pazienti hanno riferito lievi disturbi gastrici, non attribuibili singolarmente a nessuno dei farmaci somministrati. Non sono stati registrati episodi di batteriemia attribuibili ai ceppi batterici presenti nel prodotto utilizzato per la batterioterapia.

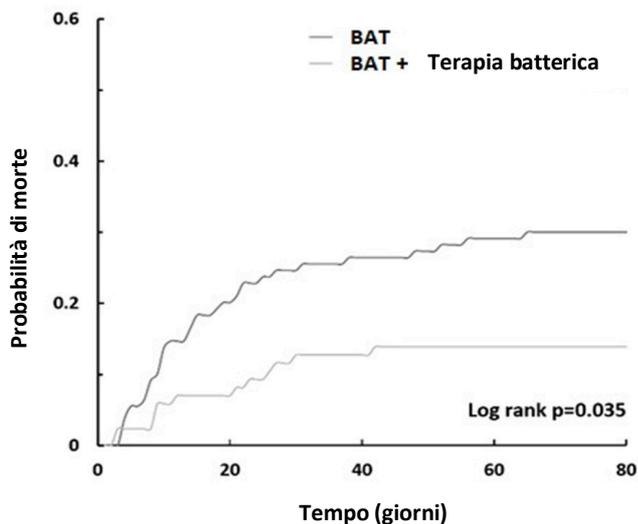


FIGURA 9. Probabilità di morte. Curve di Kaplan-Meier che mostrano il trattamento con BAT rispetto a BAT e batterioterapia orale.

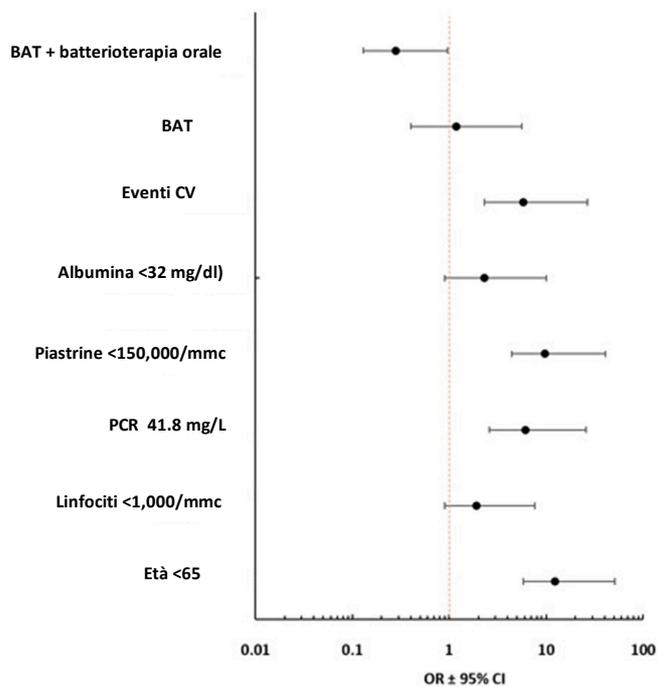


FIGURA 10. Analisi multivariata con Forest plot e intervallo di confidenza al 95%.

4.3 Discussione e conclusione

I soggetti anziani, i pazienti immunocompromessi e le persone con comorbidità come il diabete di tipo 2, malattie cardiache e i disturbi vascolari presentano esiti peggiori in corso di COVID-19⁴⁴⁶. È interessante notare che la disbiosi è generalmente associata proprio a questi pazienti e agli anziani. Diversi metaboliti batterici e frammenti batterici possono variare la risposta immunitaria nei polmoni (il cosiddetto asse "intestino-polmone"). L'ipotesi attuale è che microrganismi benefici del tratto digestivo possano giocare un ruolo significativo nel determinare il decorso della malattia COVID-19^{447,448}. Dato che il microbiota intestinale è adattabile e regolabile con la dieta, è possibile utilizzare soluzioni dietetiche personalizzate come complemento alle attuali terapie di routine contro la COVID-19. Possiamo raggiungere questo obiettivo somministrando ceppi selezionati di lattobacilli e bifidobatteri per potenziare l'immunità ed esercitare attività antivirali. I ceppi batterici presenti nel prodotto fornito in questo studio, aumentano la produzione sia del fattore nucleare eritroide 2p45 correlato al fattore 2 (Nrf2) e del suo bersaglio Eme ossigenasi-1 (HO-1)^{438,445}. Tali molecole esercitano un'attività antivirale la limitazione dello stress ossidativo. Nrf2 e HO-1 hanno una significativa attività antivirale nei confronti di un'ampia varietà di virus, tra cui il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il virus dell'influenza, il virus respiratorio sinciziale, il virus della dengue e il virus dell'Ebola. Le proprietà benefiche dell'espressione di HO-1 sono state segnalate per i virus che causano malattie polmonari^{439,449,450}. In tutto il mondo, si stima che il tasso di mortalità per SARS-CoV-2 sia di circa il 6-7%. Diversi studi descrittivi indicano un aumento del tasso di mortalità nei pazienti ospedalizzati, dal 10 al 30%. In questo studio, la mortalità riscontrata è stata del 22%, a causa dell'elevata prevalenza di comorbidità nei pazienti con COVID-19 ricoverati nel nostro istituto. I predittori di mortalità del nostro studio includevano età ≥ 65 anni, CRP ($>41,8$ mg/L), piastrine (<150.000 mmc), linfociti (<1.000 mmc) e problemi cardiovascolari.

In un precedente lavoro, abbiamo riportato un drastico miglioramento della sintomatologia extrapolmonare dopo 3 giorni di batterioterapia e un rischio minore di ventilazione meccanica⁴⁴⁵. In questo lavoro si conferma che pochi giorni dopo la batterioterapia, la probabilità di sopravvivenza è significativamente migliorata. Inoltre, il trattamento combinato BAT e batterioterapia è complessivamente associato a una significativa riduzione della mortalità rispetto al gruppo BAT (10 = 11% vs. 34 = 30%; $p < 0,001$). Non siamo in grado di definire se l'effetto positivo osservato di una specifica batterioterapia orale possa essere spiegato da un effetto diretto sul microbiota intestinale o da un'attività antivirale o da entrambi. In ogni caso, come precedentemente riportato, la somministrazione di batterioterapia orale potrebbe modulare l'asse intestino-polmone e possibilmente migliorare l'esito dell'infezione polmonare, grazie al suo profilo biochimico e immunologico. Le limitazioni di questo studio sono principalmente legate al fatto che si tratta dei risultati delle osservazioni di un singolo centro, non è un lavoro prospettico e non è stato ideato in cieco. L'unica spiegazione plausibile per l'ospedalizzazione più prolungata dei pazienti trattati con batterioterapia è una migliore sopravvivenza (18 giorni di BAT vs 23 giorni di BAT + batterioterapia; $p = 0,012$). Un'altra limitazione significativa è rappresentata dal fatto che i pazienti hanno ricevuto una formulazione batterica specifica con particolari attività antinfiammatorie e antivirali. Pertanto, i risultati non sono direttamente trasferibili a diverse preparazioni batteriche⁴⁵¹⁻⁴⁵³. I due gruppi di pazienti arruolati erano sostanzialmente comparabili per quanto riguarda le caratteristiche cliniche, ma non per i livelli di CRP, LDH e albumina; tuttavia, l'aumento dei livelli di CRP e LDH (osservato nel gruppo trattato con BAT + batterioterapia) suggerisce una malattia più grave - legata al danno polmonare - e una prognosi peggiore, ma non è considerato un fattore prognostico principale⁴⁵⁴. Infine, i livelli di albumina erano più bassi nei soggetti trattati solo con BAT rispetto all'altro gruppo, tuttavia, secondo studi precedenti, solo quando l'albumina è al di sotto di un range specifico, cioè <35 g/L, i rischi di trombosi venosa e arteriosa aumentano^{118,430,455,456}. I nostri studi suggeriscono un possibile ruolo della batterioterapia orale nella gestione dei pazienti ricoverati per polmonite da COVID-19: in particolare, la riduzione della progressione verso la malattia grave e una minore mortalità sono state evidenziate nei soggetti in cui la BAT è associata alla terapia batterica orale.

Capitolo 5

Effetto “oxygen sparing” della terapia batterica orale in corso di COVID-19

In un precedente studio su 200 pazienti, abbiamo dimostrato che i soggetti trattati con una formulazione specifica di batteri (SLAB51) avevano una probabilità di sopravvivenza significativamente più alta⁴⁵⁷. Inoltre, abbiamo riportato che il rischio di sviluppare un'insufficienza respiratoria per un paziente si riduce di otto volte somministrando SLAB51 in aggiunta alla terapia di routine (RUT)⁴⁴⁵. Il presente lavoro si proponeva di approfondire l'azione a breve termine di SLAB51 nell'alleviare le condizioni respiratorie nei soggetti che presentavano un'infezione da SARS-CoV-2. A tal fine, abbiamo esaminato la risposta alla terapia di SLAB51. A tal fine, abbiamo esaminato la risposta di due gruppi di pazienti, uno trattato con RUT e uno con RUT e batterioterapia ventiquattro ore dopo la somministrazione iniziale del prodotto. Abbiamo dimostrato che SLAB51 contiene batteri dotati di attività arginina deaminasi (ADI), che catalizza l'idrolisi della L-arginina in citrullina e ammoniaca. L'ADI inibisce la sintesi arginina-dipendente di ossido nitrico (NO). Questo gas è una molecola di segnalazione per la risposta immunitaria infiammatoria dell'intestino e modula la vasodilatazione intestinale. Inoltre, l'ADI, riducendo l'arginina, può esercitare un'attività antivirale contro alcuni virus, tra cui SARS-CoV-2, e diminuire le caratteristiche di danno polmonare iperinflammatorio dei pazienti con COVID-19 grave^{419,458}.

5.1 Materiali e metodi

Questo studio è un'analisi prospettica di pazienti adulti (>18 anni) con infezione da SARS-CoV-2 supportati con ossigenoterapia e ricoverati tra ottobre 2020 e dicembre 2020 presso il Policlinico Umberto I, Università "Sapienza", Roma, Italia. I pazienti inclusi nello studio sono stati ospitati in due diversi reparti dedicati alla gestione della COVID-19: nel primo reparto è stata adottata una strategia clinico-terapeutica che comprendeva la terapia utilizzata di routine associata alla supplementazione della batterioterapia SLAB51 (gruppo RUT+OB), mentre nel secondo reparto è stata somministrata solo la RUT (Figura 11). I due reparti avevano caratteristiche simili per quanto riguarda la tipologia di pazienti ricoverati e le competenze del personale sanitario. I criteri di inclusione erano pazienti di età superiore a 18 anni, una diagnosi di COVID-19, la necessità di un supporto di ossigeno e una TAC che confermava la diagnosi di polmonite correlata alla SARS-CoV-2. Tutti i pazienti con diagnosi clinica di COVID-19 sono stati sottoposti a una TC ad alta risoluzione/senza contrasto del torace al momento del ricovero in ospedale. Per tutti gli esami sono stati utilizzati due scanner TC multidetettore (Somatom Sensation 16 e Somatom Sensation 64; Siemens Healthineers). I radiologi, esperti in imaging toracico, hanno eseguito l'analisi delle immagini TC valutando la localizzazione e la distribuzione della malattia e i risultati della TC del torace. È stato calcolato un punteggio TC semiquantitativo per ciascuno dei 5 lobi, considerando l'estensione del coinvolgimento anatomico, come segue: 0, nessun coinvolgimento; 1, <5% di coinvolgimento; 2, 5-25% di coinvolgimento; 3, 26-50% di coinvolgimento; 4, 51-75% di coinvolgimento; e 5, >75% di coinvolgimento. Il punteggio TC globale risultante era la somma di ogni singolo punteggio lobare (da 0 a 25). Le fonti per i dati dei pazienti sono state le cartelle cliniche archiviate nel sistema informativo elettronico dei reparti coinvolti. Le variabili considerate comprendevano: (1) dati anamnestici, (2) storia clinica passata (comorbidità) e (3) storia clinica attuale, trattamento e dati di laboratorio. L'endpoint primario dello studio era la valutazione delle

differenze nella pressione parziale dell'ossigeno (pO₂), nell'emoglobina ossigenata (O₂Hb) e nella percentuale di emoglobina satura di ossigeno (SaO₂) al basale (T₀) e dopo 24 ore dall'inizio della terapia (T₁) nei due gruppi per confermare/rifiutare precedenti osservazioni. Il test dei gas ematici arteriosi (ABG) è stato eseguito utilizzando il sangue prelevato dall'arteria radiale, mentre sono state registrate anche la frazione di ossigeno inspirato (FiO₂) e la quantità di ossigeno fornito (L/min). In caso di raggiungimento dell'outcome primario, l'endpoint secondario era valutare se il miglioramento dei parametri di ossigenazione del sangue arterioso nei pazienti trattati con batterioterapia fosse dovuto all'azione di SLAB51 nell'intestino. In alcuni pazienti, un campione di sangue è stato ottenuto dopo 5-6 ore dalla somministrazione della batterioterapia per valutare quanto presto il fenomeno si stesse verificando.

La diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 è stata definita come un tampone orofaringeo e nasofaringeo positivo, eseguito in duplice copia, per la ricerca dei geni E e S del SARS-CoV-2 mediante reazione a catena della polimerasi inversa (RT-PCR).

I pazienti sono stati trattati con RUT come suggerito dalle linee guida provvisorie della Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali (SIMIT) e dell'Agenzia Italiana di Medicina (AIFA). In dettaglio: Desametasone (6 mg al giorno per 10 giorni) più eparine a basso peso molecolare (dosaggio profilattico) ± azitromicina (500 mg al giorno); Remdesivir, come da linee guida AIFA. La batterioterapia (SLAB51) è stata somministrata in tre dosi uguali al giorno per un totale di 2400 miliardi di batteri al giorno. SLAB51 contiene *Streptococcus thermophilus* DSM 32245, *Bifidobacterium lactis* DSM32246, *Bifidobacterium lactis* DSM 32247, *Lactobacillus acidophilus* DSM 32241, *Lactobacillus helveticus* DSM 32242, *Lactobacillus paracasei* DSM32243, *Lactobacillus plantarum* DSM 32244 e *Lactobacillus brevis* DSM 27961 (Sivomixx800®, Ormendes SA, Losanna, Svizzera). Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati supportati da ossigenoterapia somministrata tramite maschere Venturi in pazienti con respiro spontaneo.

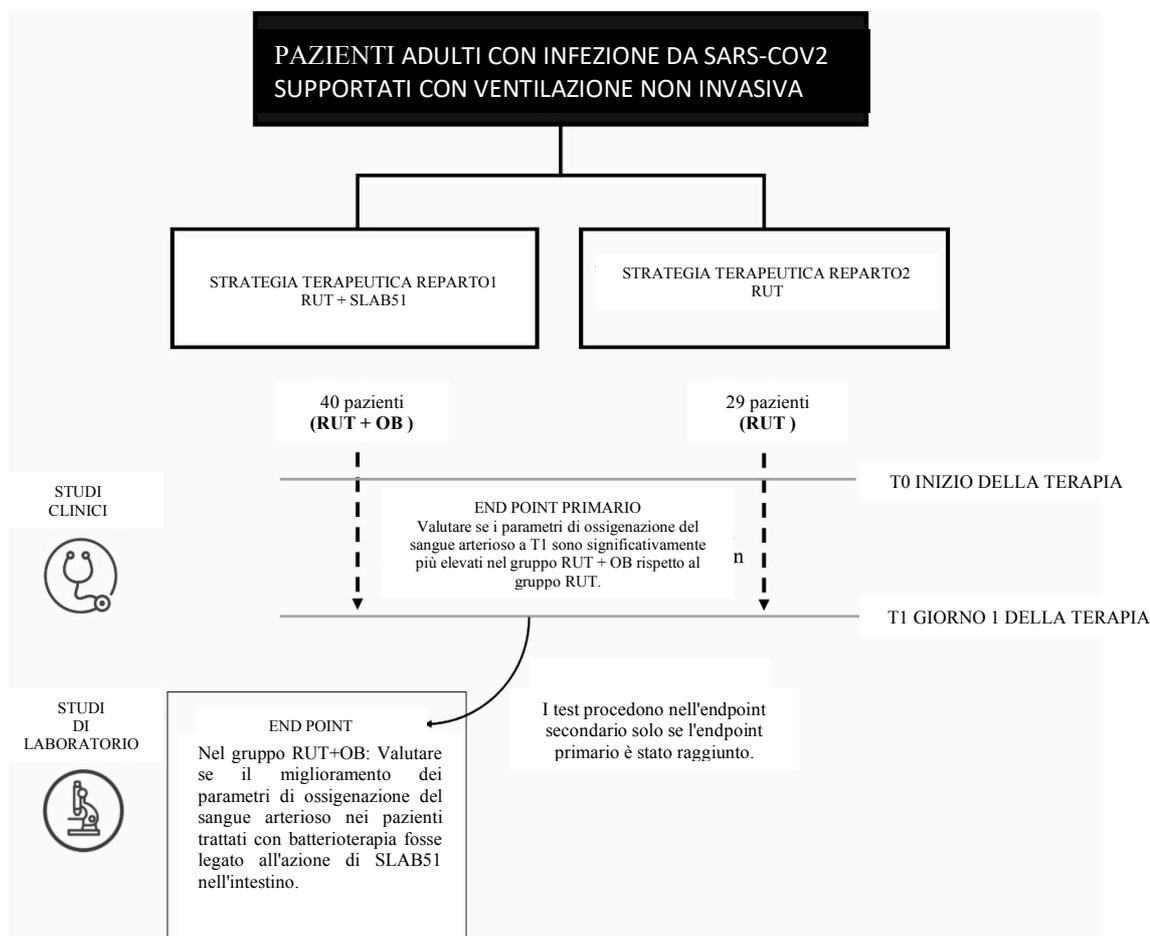


FIGURA 11. Presentazione schematica del disegno dello studio.

5.1.1 Test dell'arginina deaminasi (ADI)

SLAB51 è stato sospeso alla concentrazione di 133 109 CFU in 10 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS, EuroClone, West York, UK). L'attività dell'ADI è stata analizzata in base alla quantità di citrullina formata dall'arginina, misurando i cambiamenti di colore dovuti ai prodotti formati dalla diacetil-mono-ossima, come precedentemente descritto⁴⁵⁹.

5.1.2 Linea cellulare, condizioni di coltura e trattamento

Le linee cellulari CaCo-2 derivate dall'adenocarcinoma del colon umano, acquistate da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), sono state mantenute in coltura in DMEM integrato con il 10% di FCS, l'1% di aminoacidi non essenziali, 1 mM di piruvato di sodio e 2 mM di L-glutammina, 100 U/mL di penicillina e 100 g/mL di streptomicina (EuroClone, West York, UK). Dopo aver raggiunto l'80% di confluenza, le cellule sono state seminate in una piastra sterile per colture tissutali a 12 pozzetti (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a 40.000 cellule/cm² e lasciate aderire per una notte. Le cellule sono state poi trattate per 24 ore con o senza l'inibitore dell'ossido nitrico sintasi 2 (NOS2) N-(3-(aminometil) benzil) acetamidina (1400 W) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (100 M), inibitore ADI, formamidina cloridrato (Sigma-Aldrich) (10 mM) o SLAB51 (107 CFU/mL, sospeso alla concentrazione di 133 109 CFU in 10 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (EuroClone, West York, Regno Unito). Dove specificato, un campione di SLAB51 è stato preincubato per 30 minuti con o senza formamidina (100 mM). Non è stata registrata alcuna influenza significativa sulla vitalità cellulare rispetto alle cellule di controllo dopo il trattamento con SLAB51, 1400W e formamidina, come valutato dal saggio Trypan blue.

5.1.3 Estrazione dell'RNA totale ed espressione di NOS2 mediante RT-PCR

L'RNA totale delle cellule CaCo-2 è stato estratto con il reagente TRIzol secondo il protocollo del produttore. L'RNA per il controllo positivo NOS2 è stato ottenuto da cellule macrofaghe murine RAW 264.7 (Sigma-Aldrich) trattate con IFN- 100 ng/mL e LPS1 g/mL. Il controllo negativo è stato rappresentato da cellule Jurkat derivate da leucemia T umana acuta (ATCC). La RT-PCR è stata eseguita come precedentemente descritto⁴⁶⁰. Tutti i reagenti per la PCR e la soluzione colorante per acido nucleico EuroSafe sono stati acquistati da EuroClone. I primer sono stati acquistati da IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). La reazione di RT-PCR è stata eseguita con il termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA). La quantificazione della PCR è stata eseguita mediante densitometro (UVItec Limited BTS-20 M, Cambridge, Regno Unito) e l'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software ImageJ. I primer utilizzati per l'amplificazione di NOS2 e beta-actina erano i seguenti: NOS2 FOR50-CTGACGGGAGATGAGCTC- 30; NOS2 REV50-AGTCGTGCTTGCCATCACTC- 30; -actina FOR50-AGCGGGAAATCGTGCGTG-30; -actina REV50-CAGGGTACATGGTGTGCC-30.

5.1.4 Test del livello di nitrito

L'attività enzimatica di NOS2 è stata valutata misurando i livelli di nitrito mediante la nitrato -reduttasi e la reazione di Griess attraverso un saggio colorimetrico (Nitrite Assay kit, Sigma-Aldrich Co., Milano, Italia) nei surnatanti delle cellule CaCo-2, trattate come descritto, secondo le istruzioni del produttore.

5.1.5 Analisi Statistica

Non è stato effettuato il calcolo della dimensione del campione. Le variabili categoriche sono state confrontate utilizzando il test Chi quadro con correzione di continuità di Yates e mostrate

come frequenze assolute e percentuali. Per le variabili continue è stato utilizzato il bilaterale Mann–Whitney U test per determinare le differenze statisticamente significative tra i gruppi a ogni punto temporale considerato, mentre per ogni gruppo è stato utilizzato il test di Wilcoxon per valutare le differenze significative tra punti temporali consecutivi. Per i livelli di nitrito, è stato utilizzato il test non parametrico Kruskal-Wallis seguito dal test post hoc di Dunn per valutare la significatività statistica tra le condizioni testate. In ogni caso, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software statistico R 4.0.3.

5.2 Risultati

I dati sono stati raccolti e confrontati tra i pazienti COVID-19 positivi che hanno ricevuto la RUT più ossigeno (29; 42%) e i soggetti che sono stati trattati anche con la batterioterapia orale (40; 58%) più ossigeno. Le principali caratteristiche di entrambi i gruppi di pazienti sono riassunte nella Tabella 9.

Tabella 9. Popolazione stratificata in due gruppi in base alla terapia: RUT o RUT più batterioterapia orale

Parametri	RUT (N°=29)		RUT + OB (N°=40)		p-value
	Mediana (IQR)	N°(%)	Mediana (IQR)	N°(%)	
Età (anni)	70(60-77)		61 (51-74.3)		0.09
Sesso (Maschile)		25(86.2)		22 (55)	0.01
BMI (kg/m ³)	20 (20-22)		20 (18.8-22)		0.47
ALT (U/L)	25 (18-40)		30 (23.5-45)		0.17
AST (U/L)	21 (19-38)		26 (18-36.3)		0.95
Score TC	16.5 (15-18)		16.5 (15-18)		0.91
Charlson index	3 (1-4)		1 (1-5)		0.24
Terapia					
Antivirali (Remdesivir)		10 (34.4)		8 (20)	0.28
Antibiotici		25 (86.2)		29 (97.5)	0.19

Tranne che per il sesso, al basale i due gruppi determinati sulla base della somministrazione di SLAB51 erano omogenei per tutte le variabili considerate che comprendono le terapie farmacologiche SARS-CoV-2, i livelli di pO_2 , il rapporto pO_2/FiO_2 e la quantità di ossigeno somministrato (mediana; IQR RUT 4; 1-6 L/min; RUT+OB 1,5; 1-6 L/min, $p = 0,31$). Dopo 24 ore dalla prima dose di SLAB51, il gruppo RUT+OB ha mostrato valori significativamente più elevati del rapporto pO_2/FiO_2 ($p = 0,002$) e della pO_2 ($p = 0,01$) rispetto al gruppo RUT, evidenziando un miglioramento delle condizioni (Figura 12a, b). Per quanto riguarda i valori di FiO_2 , all'inizio del periodo di osservazione i due gruppi erano omogenei mentre, all'endpoint delle 24 ore, si sono registrati livelli di FiO_2 significativamente più elevati per il gruppo RUT rispetto a quello RUT+OB ($p = 0,002$) (Figura 12c). L'analisi dei livelli di O_2Hb e SaO_2 ha dato risultati in linea con quelli precedentemente descritti per la pO_2 e il rapporto pO_2/FiO_2 , con valori significativamente più elevati registrati per il gruppo RUT+OB rispetto al gruppo che ha ricevuto solo la terapia standard (O_2Hb , $p = 0,006$; SaO_2 , $p = 0,038$) (Figura 12e,f). In particolare, dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, il gruppo a cui è stato somministrato SLAB51 ha presentato livelli di ossigenazione del sangue migliori rispetto al gruppo che ha ricevuto solo la terapia standard, nonostante il gruppo RUT abbia registrato un aumento significativamente maggiore della quantità di ossigeno fornita nel tempo ($p = 0,002$) (Figura 12d). Infine, i due gruppi sono risultati omogenei per quanto riguarda i livelli di glicemia, lattati ed ematocrito sia all'inizio del trattamento sia nelle 24 ore successive (Figura 12g-i). Siamo riusciti a ottenere anche i dati relativi a 6 ore dall'inizio dei trattamenti in alcuni soggetti trattati con RUT o RUT+OB. Il rapporto pO_2/FiO_2 , la pO_2 , la SaO_2 e l' O_2Hb sono migliorati nel gruppo RUT+OB e sono rimasti invariati o peggiorati nel gruppo RUT. Il registro ospedaliero ci ha permesso di vedere l'evoluzione della malattia nei pazienti trattati con RUT o RUT + OB

durante il loro ricovero nelle settimane successive. Quattro (13,8%) pazienti trattati con RUT sono stati trasferiti in terapia intensiva a causa del peggioramento delle condizioni respiratorie. Inoltre, uno di questi pazienti è morto. Solo un paziente (2,5%) trattato con RUT e batterioterapia orale ha sviluppato un quadro clinico che ha richiesto il trasferimento in Terapia Intensiva, e nessun soggetto di questo gruppo è morto.

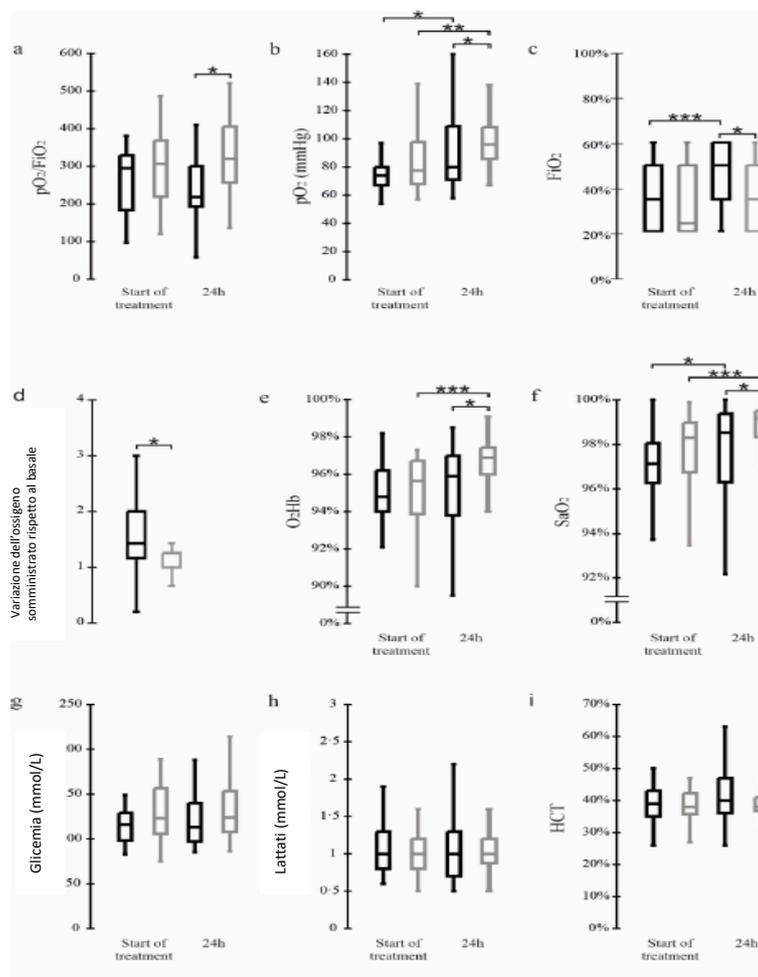


FIGURA 12. Risultati delle emogas. Grafici box plot che mostrano la distribuzione dei valori di (a) rapporto PO_2/FiO_2 , (b) pO_2 , (c) FiO_2 , (d) Variazione dell'ossigeno somministrato rispetto al basale, (e) O_2Hb , (f) SaO_2 , (g) glicemia, (h) lattati e (i) HTC ottenuti tramite analisi di laboratorio di routine. Dove presente, è stata riportata la significatività statistica tra i gruppi RUT e RUT+OB in ciascun punto temporale e per ciascun gruppo nel tempo. *: p 0,05; **: p 0,001; ***: p 0,0001.

L'attività enzimatica dell'ADI, espressa come $nmol/100 L$ di citrullina, è stata innanzitutto analizzata a diverse concentrazioni del campione SLAB51 con un'incubazione di un'ora. I risultati hanno mostrato che l'attività dell'ADI era proporzionale alla quantità di SLAB51, come mostrato nella Figura 13a. Il test è stato ripetuto con una concentrazione fissa di sospensione batterica ($6 \cdot 10^7 CFU/100 L$) e valutato a intervalli di 10 minuti, evidenziando così che l'attività ADI dei batteri interi era stabile e lineare nel tempo di dosaggio; è interessante notare che la capacità dell'enzima di convertire l'arginina in citrullina era rilevabile già a pochi minuti (Figura 13b). Abbiamo poi testato la capacità di SLAB51 di inibire l'attività di NOS2, utilizzando cellule CaCo-2 derivate da adenocarcinoma del colon umano, che esprimono costitutivamente alti livelli di NOS2 come dimostrato dall'analisi RT-PCR (Figura 14a), confermando così precedenti reports [11]. Il rilascio di NO nelle cellule CaCo-2 dopo 24 ore è stato misurato come livelli di nitriti (μM) nel terreno di coltura ed espresso come percentuale dei livelli di nitriti rispetto al controllo (Figura 14b). L'esposizione a 1400 W, uno dei più potenti e selettivi

inibitori di NOS2, è stata utilizzata per controllare positivamente l'inibizione di NOS2 nel nostro modello sperimentale. Come previsto, 1400 W ha ridotto significativamente i livelli di nitrito⁴⁶¹. Il trattamento con SLAB51 ha ridotto il rilascio di NO a un livello paragonabile a quello di 1400 W 24 ore. Per indagare il potenziale coinvolgimento dell'ADI nella capacità dello SLAB51 di inibire l'attività di NOS2, è stata utilizzata la formamidina, un inibitore specifico dell'ADI⁴⁶². La preincubazione di SLAB51 con formamidina ha completamente neutralizzato la capacità di SLAB51 di inibire la produzione di NO, riportando il valore dei nitriti al livello di controllo. La sola esposizione delle cellule alla formamidina non ha influito sui livelli di nitrito, escludendo che la questa possa influenzare direttamente l'attività di NOS2.

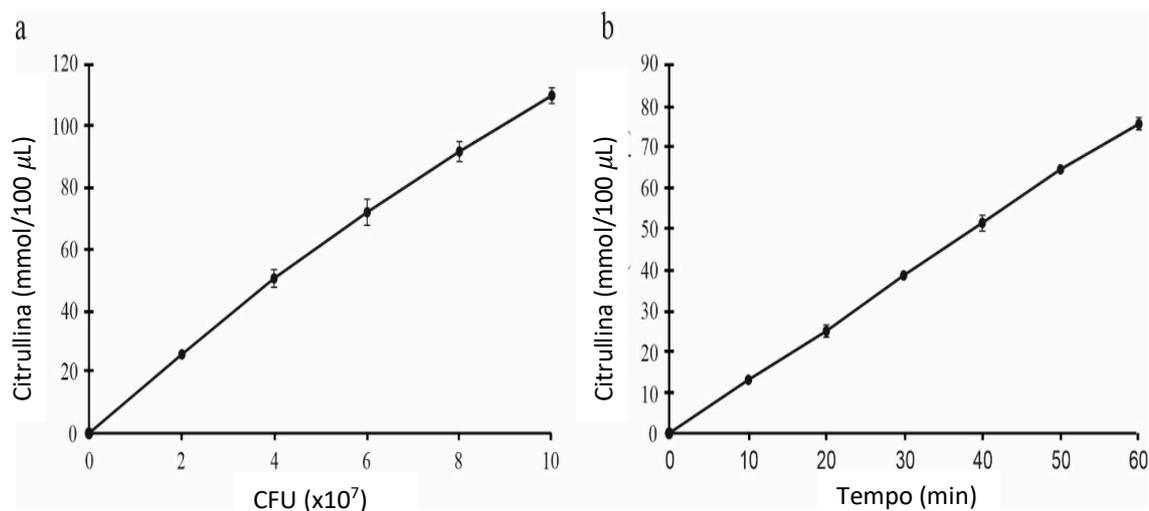


FIGURA 13. Attività ADI nel campione SLAB51. (a) Livelli di citrullina (nmol/100 µL) dopo 1 ora di incubazione con diverse quantità di sospensione di SLAB51 ($\times 10^7/100 \mu\text{L}$); (b) cinetica dell'attività ADI di SLAB51 a 6×10^7 CFU/100 µL. I dati sono espressi come la media di due misurazioni \pm SD.

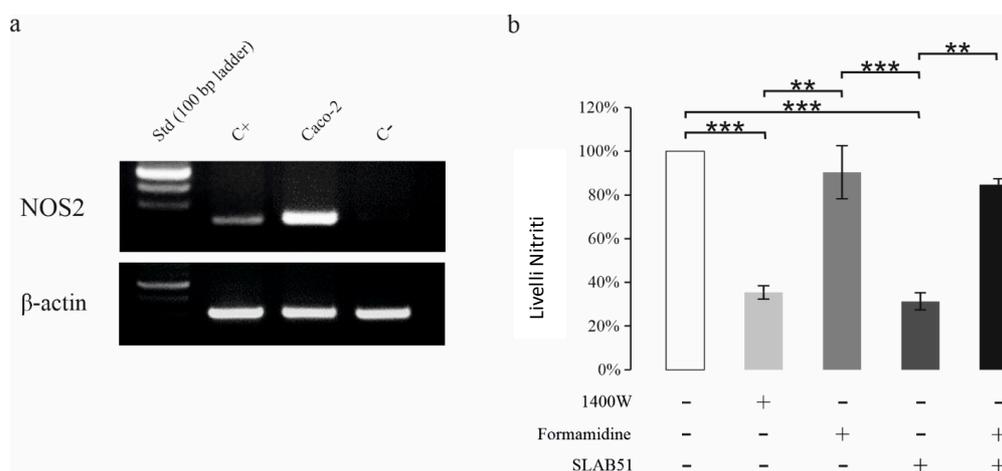


FIGURA 14. Effetto di SLAB51 sulla produzione di NO nelle cellule CaCo-2. Le cellule CaCo-2 esprimevano sostanzialmente alti livelli di NOS2 come mostrato nella RT-PCR rappresentativa (a). C+: controllo positivo (cellule RAW stimulate con IFN- γ + LPS); C- = controllo negativo (cellule Jurkat). I livelli di nitrito sono stati determinati nei summatanti di cellule CaCo-2 trattate per 24 ore (b) con o senza l'inibitore NOS2 1400 W (100 µM), l'inibitore ADI formamidina (10 mM) o SLAB51 (107 CFU) preincubato per 30min con o senza formamidina. I valori sono espressi come percentuale dei livelli di nitrito rispetto al controllo (media \pm SD). Per l'analisi comparativa dei gruppi di dati, è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis seguito dal test post hoc di Dunn (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.3 Discussione

Il COVID-19 è caratterizzato da manifestazioni estremamente variabili, che vanno dalla completa assenza di sintomi alla polmonite grave e alla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS)⁴⁶³. In queste condizioni cliniche, la ventilazione meccanica può diventare una scelta necessaria. L'obiettivo è quello di fornire all'organismo quanto più ossigeno possibile, in modo che cervello, cuore e reni mantengano la loro efficienza in attesa che i polmoni guariscano. Purtroppo, una ventilazione meccanica prolungata può esacerbare la disfunzione polmonare. L'eccessiva distensione dovuta a volumi di corrente elevati aumenta la pressione delle vie aeree, mentre un'inadeguata pressione positiva di fine espirazione può causare lesioni polmonari indotte dal ventilatore. Il danno della barriera alveolo-capillare attiva mediatori e cellule infiammatorie che possono aumentare ulteriormente il biotrauma dei pazienti con COVID-19, soprattutto se anziani e con malattie d'organo preesistenti. Pertanto, è chiaro che ogni opportunità di evitare la ventilazione meccanica deve essere presa in considerazione⁴⁶⁴. Il nostro gruppo ha già evidenziato come l'uso della batterioterapia orale possa avere un ruolo come terapia adiuvante nella gestione dei soggetti con COVID-19^{445,457}. I dati presentati in questo lavoro confermano la sua utilità in due gruppi di pazienti inizialmente comparabili in termini di parametri clinici, respiratori e di laboratorio. Dopo 24 ore dall'inizio della batterioterapia, il gruppo trattato con SLAB51 presentava una migliore ossigenazione del sangue rispetto al gruppo che riceveva solo RUT, come evidenziato dall'analisi dei valori di pO₂, O₂Hb e SaO₂. Questo miglioramento del parametro dell'ossigenazione si è accompagnato alla sensazione di benessere riferita da diversi pazienti integrati con SLAB51. In particolare, sebbene il gruppo trattato solo con RUT abbia ricevuto una quantità di ossigeno significativamente maggiore durante il periodo di osservazione di 24 ore, alla fine ha presentato un'ossigenazione del sangue sostanzialmente inferiore a quella osservata per il gruppo RUT+OB. La quantità di ossigeno assorbita è limitata principalmente dalla capacità limitata di scambio gassoso degli alveoli danneggiati, combinata con il numero ridotto di cellule alveolari effettivamente funzionanti nei polmoni compromessi COVID-19. Di conseguenza, i valori significativamente più bassi del rapporto pO₂/FiO₂ registrati, a 24 ore, per il gruppo RUT confermano la tendenza a un peggioramento dell'ipossiemia quando viene somministrata solo la terapia standard.

Gli studi pubblicati suggeriscono che il recupero del danno polmonare associato al COVID-19 è lento e che, nei pazienti gravi, i disturbi polmonari possono persistere per molto tempo anche dopo la dimissione ospedaliera^{301,465}. I soggetti arruolati nel nostro studio avevano un coinvolgimento polmonare TC del 50%. La Figura 15 mostra le immagini esemplificative della TC relative a due pazienti scelti a caso all'interno dell'intera popolazione analizzata. Il miglioramento dei parametri di ossigenazione entro poche ore dalla somministrazione di SLAB51 suggerisce che questo prodotto modula il consumo ematico di ossigeno nell'intestino. Un minor consumo di ossigeno da parte delle cellule intestinali potrebbe tradursi in una maggiore disponibilità di ossigeno per gli altri organi. La superficie stimata del tratto gastrointestinale è di circa 250-300 m² e, in condizioni normali, la mucosa intestinale riceve tra il 10% e il 35% della produzione cardiaca totale⁴⁶⁶. I nostri saggi in vitro hanno evidenziato che i batteri dello SLAB51 sono caratterizzati da un'elevata attività dell'ADI e sono associati a una significativa riduzione a breve termine dell'NO prodotto da cellule che imitano gli epitelii intestinali. L'ADI catalizza la scissione della L-arginina in citrullina e ammoniaca e inibisce la sintesi arginino-dipendente di NO (Figura 16). L'ossido nitrico è uno dei principali regolatori della vasodilatazione della mucosa intestinale^{466,467}. L'aumento dei livelli di NO è stato associato all'inibizione dei fattori inducibili dall'ipossia (HIF) attraverso un meccanismo di consumo di ossigeno precedentemente determinato⁴⁶⁸. La disbiosi intestinale riportata nei pazienti con infezione da COVID-19 potrebbe alterare la produzione di NO a livello dell'epitelio intestinale⁴²². È noto che la sovrapproduzione di NO porta alla morbilità e alla morte degli animali in modelli sperimentali di infezione da virus influenzale caratterizzati da uno stato di iper-infiammazione polmonare⁴⁶⁹.

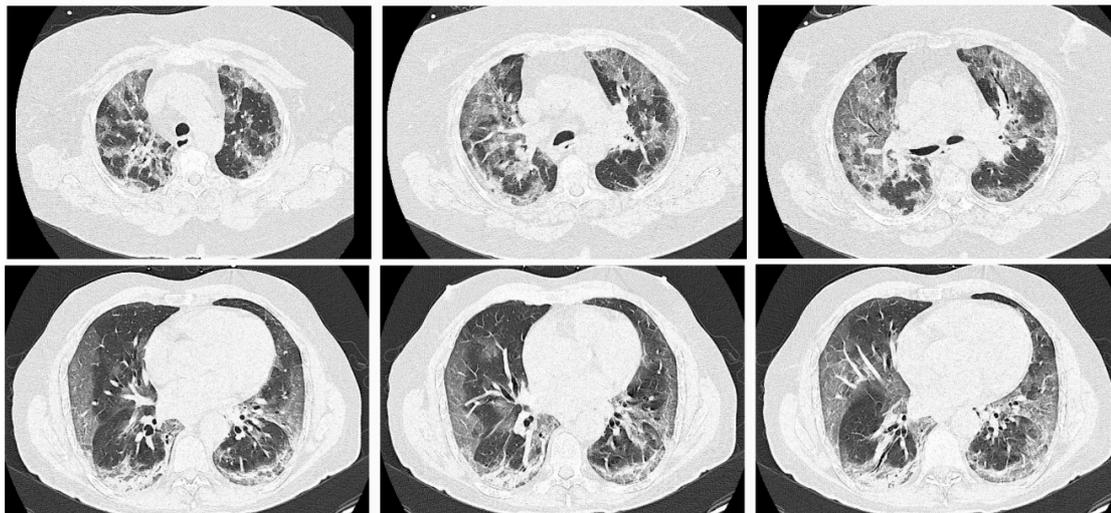


FIGURA 15. Immagini della TAC polmonare di pazienti COVID-19 arruolati nello studio.

In questo contesto, ipotizziamo che la somministrazione di SLAB51 possa produrre un'inibizione rilevante dell'attività NOS2 che, limitando l'afflusso di sangue e l'utilizzo di ossigeno nell'intestino, aumenterebbe la quantità di O₂ disponibile nel sangue arterioso per cervello, reni e cuore. In particolare, nei pazienti con infezione da virus dell'epatite C (HCV) e carcinoma epatocellulare, il trattamento con arginina deiminasi pegilata (ADI-PEG 20) ha indotto una riduzione dell'NO⁴⁷⁰. Anche se l'inibizione dell'attività di NOS2 nel modello cellulare CaCo2 rappresenta una prima importante evidenza sui meccanismi molecolari che supportano un ridotto consumo di O₂ nell'intestino, per confermare il nostro risultato sono necessarie ulteriori analisi in vitro su altre cellule. La nostra ipotesi è che SLAB51 attivi un effetto di "risparmio di ossigeno (oxygen sparing)" rilevabile all'emogasanalisi e clinicamente rilevante. Non abbiamo valutato il numero di batteri che raggiungono i diversi distretti intestinali dopo la somministrazione di SLAB51 né i cambiamenti della flora fecale. Tuttavia, riteniamo che l'effetto "oxygen sparing" di SLAB51 possa esplicitarsi già dai primi distretti intestinali, dove è presente solo una quantità limitata di microrganismi, rendendo possibile l'azione di SLAB51 senza l'interferenza e la competizione delle massicce popolazioni batteriche presenti nel colon⁴⁷¹.

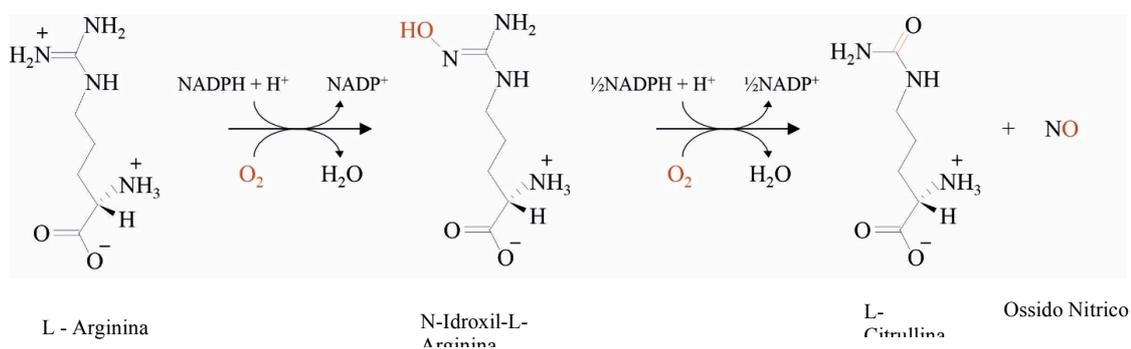


FIGURA 16. Reazione biochimica che descrive l'attività catalitica della NOS nella formazione di NO. La reazione consuma 1-5 moli di NADPH e 2 moli di ossigeno.

5.4 Conclusione

Un numero consistente di soggetti infetti da SARS-CoV-2 necessita di ricovero ospedaliero per lesioni che interessano più del 50% dei polmoni. Nei pazienti con COVID-19, con l'aggravarsi del danno alveolare, diventa più difficile per l'organismo assorbire l'ossigeno. A seconda di vari cofattori come l'età, lo stile di vita, il diabete, le malattie cardiovascolari, ecc. la riduzione degli scambi gassosi si accompagna a un progressivo danneggiamento degli organi, facilitando in alcuni casi la progressione della malattia fino all'exitus. SLAB51 contiene ADI, utile per contrastare l'infezione virale e attenuare lo stato infiammatorio associato a COVID-19. In attesa che il polmone recuperi le sue funzioni, l'effetto "oxygen sparing" di SLAB51 potrebbe essere utile nella corsa al tempo per mantenere l'ossigenazione a livelli sufficienti e ridurre la necessità di ricoveri in terapia intensiva. Ulteriori studi dovranno confermare i nostri risultati e allo stesso tempo sottolineiamo che la riproducibilità dei risultati ottenuti è legata alle condizioni sperimentali descritte e non è estendibile "apriori" a probiotici diversi da quello utilizzato in questo studio⁴⁵¹.

Capitolo 6

Ruolo della terapia batterica orale nel ridurre l'insorgenza della fatica cronica nei pazienti con COVID-19

Fin dall'inizio, la COVID-19 si è dimostrata una sindrome respiratoria aggressiva, in grado di degenerare in polmonite, ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), insufficienza multiorgano e morte. Infine, l'aumento massiccio di nuovi casi nel tempo ha evidenziato la presenza di sintomi cronici post-SARS-CoV-2 dopo la risoluzione della fase infettiva della malattia. Una caratteristica distintiva del "long COVID"⁴⁷² è il malessere post-esercizio, un peggioramento dei sintomi in seguito a uno sforzo fisico o mentale che si verifica entro 12-48 ore dallo sforzo e richiede un periodo di recupero prolungato⁴⁷³⁻⁴⁷⁶. Il quadro clinico dei pazienti con long COVID che riferiscono affaticamento è simile a quello osservato nei soggetti con encefalopatia mialgica/sindrome da stanchezza cronica (ME/CFS), ad esempio, possono presentare diversi mesi di profondo esaurimento, prestazioni scarse sul lavoro e problemi di memoria a breve termine.

Tutte le ipotesi attuali, come la disfunzione mitocondriale, la disregolazione del sistema immunitario, l'alterato metabolismo dell'ossido nitrico, l'alterazione ipotalamo-ipofisi-surrene e la predisposizione genetica, prendono in considerazione il ruolo del microbiota intestinale. Malessere addominale, nausea, diarrea e vomito sono clinicamente evidenti in circa il 50% dei pazienti affetti da COVID-19³⁴⁰. Questi segni e sintomi medici sono più frequenti nei soggetti infettati dal virus con un microbioma alterato a causa di condizioni preesistenti come malattie croniche, infiammazioni, trattamenti farmacologici ed età⁴⁴⁴. I livelli di batteri con proprietà probiotiche (ad esempio, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*⁴⁷⁷) e di altri simbionti benefici sono più bassi nei pazienti COVID-19 ospedalizzati. Al contrario, i patogeni opportunistici (ad esempio, *Streptococcus*, *Rothia* e *Actinomyces*) sono più numerosi^{355,422}. In particolare, questi cambiamenti possono persistere dopo la risoluzione dei sintomi respiratori e di solito sono correlati alla gravità del COVID-19. Abbiamo già dimostrato e pubblicato i benefici della batterioterapia orale per i pazienti affetti da COVID-19 durante la degenza ospedaliera "quo ad vitam"^{445,451,457,478,479}, in questo capitolo è presentato un lavoro volto a valutare l'effetto del nostro approccio terapeutico nel migliorare la qualità della vita dei pazienti guariti dalla malattia.

6.1 Materiali e metodi

Abbiamo condotto il nostro studio presso la Divisione di Malattie Infettive, Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Policlinico Umberto I di Sapienza Università di Roma (Italia), includendo 58 pazienti ricoverati dal 1° marzo al 30 aprile 2020 con COVID-19 confermata e dimessi a domicilio. Tutti i pazienti ricoverati hanno ricevuto regimi terapeutici comprendenti uno o più dei seguenti antimicrobici: idrossiclorochina (200 mg due volte al giorno per 7 giorni), azitromicina (500 mg una volta al giorno per 5 giorni), terapia antivirale comprendente lopinavir-ritonavir (400/100 mg due volte al giorno), ordarunavir-cobicistat (800/150 mg una volta al giorno) per 14 giorni. È stata somministrata eparina a basso peso molecolare per la prevenzione della trombosi venosa profonda, come raccomandato all'epoca

dalla Società Italiana di Malattie Infettive. Tocilizumab (8 mg/kg fino a un massimo di 800 mg per dose con un intervallo di 12 ore per due volte) è stato somministrato in caso di IL-6 sierica elevata o di peggioramento significativo del quadro respiratorio in caso di indisponibilità del dosaggio dell'IL-6. La fonte dei dati per l'analisi delle informazioni sui pazienti è stata ricavata dalle cartelle cliniche elettroniche del Sistema Informativo Ospedaliero. Le variabili considerate per lo studio comprendevano: (1) età, sesso, data di ammissione e dimissione dall'ospedale, durata del ricovero, (2) malattia cardiovascolare (CV). Abbiamo utilizzato Carlson index per prevedere la mortalità a 1 anno di un paziente con una serie di condizioni di comorbidità. Tra tutti i partecipanti, un gruppo di 24 soggetti ha ricevuto la batterioterapia orale (OB) durante l'intero periodo di ricovero (T1) [mediana: 23 giorni (IQR: 19-38 giorni)] (OB+). Un altro gruppo di 34 persone (OB-) non è stato integrato con la batterioterapia orale [durata mediana del ricovero: 21 giorni (IQR: 18-26 giorni)]. I pazienti ricoverati in reparto hanno ricevuto un'integrazione con batterioterapia orale, in aggiunta alla migliore terapia disponibile, in caso di sintomi intestinali. L'allergia o l'intolleranza nota o sospetta alla formulazione di batterioterapia orale è stata considerata una controindicazione alla prescrizione della supplementazione. La formulazione batterioterapica orale commerciale (SLAB51; attualmente in vendita con il marchio Sivomixx800®, Ormendes, Svizzera) era composta da *Streptococcus thermophilus* DSM32245 R, *Bifidobacterium lactis* DSM 32246 R, *Bifidobacterium lactis* DSM 32247 R, *Lactobacillus acidophilus* DSM 32241 R, *Lactobacillus helveticus* DSM 32242 R, *Lactobacillus paracasei* DSM 32243 R, *Lactobacillus plantarum* DSM 32244 R, e *Lactobacillus brevis* DSM 27961 R. La formulazione è stata somministrata in tre dosi uguali al giorno per un totale di 2.400 miliardi di batteri al giorno. Sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione: deterioramento cognitivo clinicamente evidente e conoscenza inadeguata della lingua italiana, storia o malattie in corso del piccolo o grande intestino, qualsiasi neoplasia sistemica in corso o pregressa e gravidanza. I tamponi nasofaringei e i campioni di sangue sono stati raccolti al momento dell'ammissione in ospedale (T0) e prima della dimissione (T1) da tutti i pazienti SARS-CoV-2-positivi. Sei mesi dopo la dimissione, tutti i pazienti sono stati inoltre contattati telefonicamente da valutatori clinici addestrati, ed è stato somministrato il questionario Fatigue Assessment Scale (FAS). Il Comitato Etico della Sapienza Università di Roma ha approvato lo studio (num. Rif. 109/2020). Tutti i partecipanti allo studio hanno rilasciato il consenso informato scritto. L'RNA virale è stato estratto da tamponi nasofaringei utilizzando il kit Versant SP 1.0 (Siemens Healthcare Diagnostics). In breve, 10 µl di RNA estratto sono stati retrotrascritti e simultaneamente amplificati da un sistema di RT-PCR (RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR, AltonaDiagnostics), targettando i geni virali E e S.

6.1.1 Fatigue Assessment Scale (FAS)

Sei mesi dopo la dimissione dall'ospedale, i partecipanti sono stati contattati telefonicamente e hanno completato il test Fatigue Assessment Scale, un questionario di 10 item utilizzato per valutare la fatica percepita⁴⁸⁰. La FAS è stata validata per i pazienti affetti da malattie reumatologiche⁴⁸¹, sarcoidosi⁴⁸² ma anche per la popolazione generale⁴⁸¹. È già stata utilizzata nei pazienti COVID-19 per valutare la fatica nel contesto post-COVID^{483,484}. Delle 10 domande, 5 valutano la fatica fisica (domande 1-2, 4-5 e 10) e 5 la fatica mentale (domande 3 e 6-9). Le risposte sono su una scala di Likert a 5 punti (da 1 = mai a 5 = sempre). Il punteggio totale del FAS varia da 10 a 50, con punteggi più alti che indicano un maggiore affaticamento. Punteggi totali inferiori a 22 indicano persone "non affaticate", punteggi superiori o uguali a 22 indicano pazienti "affaticati" e punteggi superiori o uguali a 35 indicano stanchezza estrema.

6.1.2 Analisi metabolomica

Per l'indagine metabolomica mediante risonanza magnetica nucleare protonica (1H-NMR), è stata preparata una soluzione standard con acido 3-(trimetilsililico)-propionico-2,2,3,3-d4 (TSP) sale sodico, 10mM, e sodio azide, 2mM, in D2O, regolata a pH 7.00 con un tampone fosfato 1M. Il sangue intero è stato lasciato riposare per 30' a 20°C prima di essere centrifugato a 3.000 rpm per 15' a 4°C per l'isolamento del siero, entro 2 ore dal prelievo. I campioni sono

stati poi conservati a -80°C prima di essere analizzati. Ogni aliquota scongelata è stata centrifugata a 18.630 g per 10 minuti a 4°C gradi; 0,7 mL di surnatante sono stati aggiunti a 0,1 mL di soluzione standard e centrifugati nuovamente. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati a 298 K con uno spettrometro AVANCE III (Bruker, Milano, Italia) operante alla frequenza di 600,13 MHz. Il segnale dovuto all'idrogeno deuteriosido residuo è stato soppresso mediante presaturazione, mentre i segnali ampi delle molecole che ruotano lentamente sono stati rimossi includendo un filtro di Carr-Purcell-Meiboom-Gill⁴⁸⁵ in una sequenza di decadimento a induzione libera. Il filtro è stato composto da un treno di 400 echi separati da 800 μs , per un tempo totale di 328ms. Ogni spettro è stato acquisito sommando 256 transienti utilizzando 32K punti dati su uno spettro di 7211,54 Hz (per un tempo di acquisizione di 2,27 s). Il ritardo di riciclo è stato impostato a 8 s, considerando il tempo di rilassamento longitudinale dei protoni in esame. Gli spettri sono stati regolati per fase e linea di base in Topspin ver. I segnali sono stati assegnati confrontando il loro spostamento chimico e la loro molteplicità con lo Human Metabolome Database⁴⁸⁶ e la libreria software Chenomx (Chenomx Inc., Edmonton, Canada, ver. 10). Ogni altra elaborazione è stata eseguita nel linguaggio computazionale R (www.r-project.org). Inoltre, la quantificazione delle molecole è stata eseguita nel primo campione acquisito utilizzando uno standard esterno, mentre gli spettri degli altri campioni sono stati adattati al primo mediante normalizzazione probabilistica del quoziente⁴⁸⁷. L'integrazione dei segnali è stata eseguita per ogni molecola mediante integrazione rettangolare.

6.1.3 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism software, versione 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA) e il pacchetto statistico per le scienze sociali (SPSS software), versione 22 (IBM SPSS, Chicago, III). I dati continui sono stati presentati come medie con deviazione standard ($\pm\text{SD}$) e mediane con intervallo interquartile (IQR: 25-75%), e la presenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi è stata valutata mediante il test t di Student o il test U di Mann-Whitney. Le variabili dicotomiche sono state descritte come frequenze semplici (n) e percentuali (%) e poi confrontate mediante il test esatto di Fisher o il test del chi quadro per i due gruppi. Le differenze di concentrazione metabolica tra i pazienti con infezione da SARS-CoV-2 che hanno ricevuto o meno una formulazione batterioterapica orale sono state analizzate utilizzando il test U di Mann-Whitney. Il test Wilcoxon signed-rank per campioni appaiati è stato utilizzato per valutare le differenze di concentrazione metabolica tra T0 e T7 nei pazienti OB+ e OB-. È stata calcolata la correlazione di Pearson punto-biserial per valutare la correlazione tra supplementazione di terapia batterica orale e la concentrazione sierica di metaboliti. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

6.2 Risultati

Un totale di 58 pazienti con infezione da SARS-CoV-2 sono stati arruolati nello studio. Le caratteristiche demografiche e cliniche dell'intera popolazione al momento del ricovero (T0) sono riportate nella Tabella 10. Durante il ricovero, il 79,3% (46/58) dei pazienti ha ricevuto un'ossigenoterapia supplementare, l'88% (51/58) dei casi è stato trattato con idrossiclorochina, il 31% (18/58) con azitromicina, il 48,3% (28/58) con un agente anti-IL-6 (Tocilizumab) e il 29,3% (17/58) con terapia antivirale.

Tra tutti i pazienti reclutati (n = 58), 24 (41,4%) hanno ricevuto terapia batterica orale durante il periodo di ricovero [mediana: 23 giorni (IQR: 19-38 giorni)] mentre 34 (58,6%) sono stati trattati solo con trattamento farmacologico [mediana: 23 giorni (IQR: 19-38 giorni)]. In particolare, il 70,8% (17/24) dei pazienti OB+ ha ricevuto ossigenoterapia supplementare, l'87,5% (21/24) idrossiclorochina, il 25% (6/24) azitromicina, il 50% (12/24) un agente anti-IL-6 (Tocilizumab) e il 29,2% (7/24) terapia antivirale. Nel gruppo OB-, l'85,3% (29/34) dei soggetti aveva ricevuto ossigenoterapia supplementare, l'88,2% (30/34) idrossiclorochina, il 35,3% (12/34) azitromicina, il 47% (16/34) un agente anti-IL-6 (Tocilizumab) e il 29,4%

(10/34) terapia antivirale. Pertanto, non sono state determinate differenze statisticamente significative tra i gruppi OB+ e OB- per quanto riguarda tutte le caratteristiche cliniche e i regimi di trattamento. Le caratteristiche dei due gruppi sono riportate nella Tabella 11.

Tabella 10. Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio a T0.

Parametri	Mediana (IQR 25-75%)	n(%)
Genere, Maschile	-	37(64)
Età (anni)	63 (56-70)	-
Leucociti (mmc)	5,625 (4072.5-7,105)	-
Linfociti (mmc)	805 (640-1,200)	-
Linfociti (%)	16 (10.5-23.43)	-
Glucosio (mg/dl)	102 (88.25-128.5)	-
Proteina c reattiva (mg/L)	62,340(17,505-177,600)	-
Durata dell'ospedalizzazione (giorni)	22 (18-27)	-
CHARLSON index	3 (1-4)	-
Ricovero in ICU	-	9 (15%)

Tabella 11. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 OB- e OB+.

Parametri	OB- (n=34)		OB+ (n=24)		p-value
	Mediana (IQR 25-75%)	n(%)	Mediana (IQR 25-75%)	n(%)	
Genere, Maschile	-	23 (68)	14 (58)		0.86
Età (anni)	62 (52-63)	-	64 (56-69)	-	0.47
Leucociti (mmc)	5,870 (4,390-7,105)	-	5,300 (3,615-7,042.5)	-	0.56
Linfociti (mmc)	805 (642.5-1,137.5)	-	810 (620-1,220)	-	0.86
Linfociti (%)	14.6(9.8-20.1)	-	17.4(10.8-25.9)	-	0.84
Glucosio (mg/dl)	106 (89.75-120.3)	-	99.5(85-142.8)	-	0.92
Proteina c reattiva (mg/L)	180,480 (24,545-202,000)	-	57,120(14,760-129,815)	-	0.23
Durata dell'ospedalizzazione (giorni)	20,5(18-26)	-	22.5(19.3-37.5)	-	0.9
CHARLSON index	3 (1-4)	-	3(1-5)	-	0.35
Ricovero in ICU	-	7 (21)	2(8.3)		0.19

Considerando che la fatica è stata recentemente descritta come uno dei sintomi elencati nel post-COVID-19 (1, 22, 23), a 6 mesi (T6) dalla dimissione ospedaliera tutti i pazienti con infezione da SARS-CoV-2 sono stati sottoposti al questionario FAS. Dei 58 pazienti, 41 (70,7%) hanno riferito affaticamento [FAS mediana (IQR) 32(26-36)], mentre 17 (29,3%) hanno mostrato un punteggio FAS inferiore a 22 [FAS mediana (IQR) 20(17-20)] (FAS affaticato vs. FAS non affaticato: $p < 0,01$). Alla dimissione dall'ospedale, non vi erano differenze significative a livello demografico e clinico tra i soggetti trovati affaticati e non affaticati a T6 (Tabella 12).

6.2.1 Profilo metabolomico dei pazienti con infezione da SARS-CoV2

Poiché la CFS è stata precedentemente associata a un'alterazione del profilo metabolico⁴⁸⁸, abbiamo eseguito un profilo metabolomico del siero raccolto dai nostri pazienti a T0 e T1 per valutare le modifiche nella concentrazione dei metaboliti chiave. Prima del trattamento, i gruppi OB- e OB+ erano comparabili per quanto riguarda tutti i metaboliti sierici considerati.

Nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2, dopo il trattamento con SLAB51, sono stati determinati aumenti significativi dei livelli di arginina, asparagina e lattato, opposti a una diminuzione significativa dei livelli di 3-idrossiisobutirrato (Figura 16). Al contrario, non sono

state osservate modifiche significative nella concentrazione degli stessi metaboliti sierici nel gruppo OB- (Figura 16).

Tabella 12. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 con e senza fatica

Parametri	Senza fatica (n=17)		Con fatica (n=41)		p-value
	Mediana (IQR 25-75%)	n(%)	Mediana (IQR 25-75%)	n(%)	
Genere, Maschile	-	10 (59)	-	27 (66)	0.62
Età (anni)	62 (51-64)	-	66 (59-70)	-	-
Leucociti (mmc)	5,230 (3,980-6,800)	-	5,900 (4,290-7,120)	-	0.49
Linfociti (mmc)	800 (690-1,200)	-	810 (600-1,200)	-	0.87
Linfociti (%)	17.3(13.4-25.9)	-	14.6(9.6-21.1)	-	0.67
Glucosio (mg/dl)	101 (85-126)	-	110(89-129)	-	0.48
Proteina c reattiva (mg/L)	22,080 (14,040-122,520)	-	68,040(21,360-177,960)	-	0.55
Durata dell'ospedalizzazione (giorni)	25 (20-43)	-	21(18-26)	-	0.03
CHARLSON index	2 (1-4)	-	3(1-4)	-	0.09
Ricovero in ICU	-	1 (6)	-	8 (20)	0.11

In grassetto i valori significativi

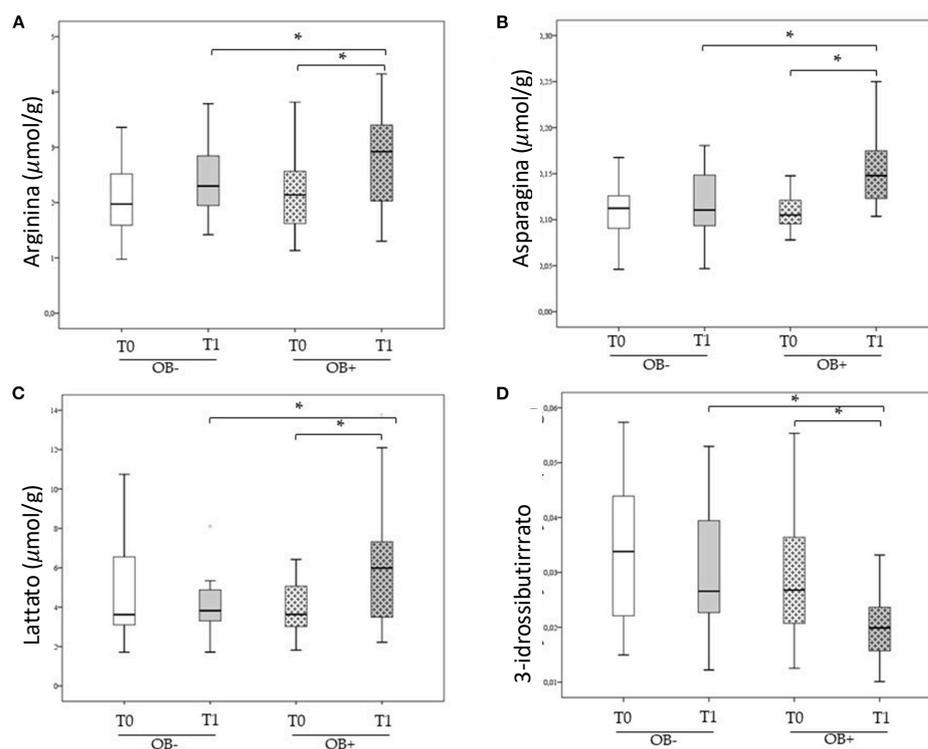


FIGURA 16. (A-D) Concentrazione sierica di arginina, asparagina, lattato e 3-idrossibutirrato in pazienti infetti da SARS-CoV-2 sottoposti e non sottoposti a trattamento batterioterapico orale al T0 e al T1. (A) Confronto della concentrazione sierica di arginina a T0 e T1 tra i pazienti infetti da SARS-CoV-2 trattati o non trattati con OB. (B) Confronto della concentrazione sierica di asparagina a T0 e T1 tra i pazienti infetti da SARS-CoV-2 trattati o non trattati con OB. (C) Confronto della concentrazione sierica di lattato a T0 e T1 tra i pazienti infetti da SARS-CoV-2 trattati o non trattati con OB. (D) Confronto della concentrazione sierica di 3-idrossibutirrato a T0 e T1 tra i pazienti infetti da SARS-CoV-2 trattati o non trattati con OB. I dati sono stati analizzati utilizzando il test U di Mann-Whitney e il test Wilcoxon signed-rank per campioni appaiati. *Statisticamente significativo.

Per minimizzare i possibili bias tra i due gruppi, abbiamo valutato i nostri dati anche dopo aver rimosso i pazienti ricoverati in terapia intensiva da entrambi i gruppi (OB- e OB+). I risultati ottenuti sono stati i seguenti: il gruppo supplementato con i probiotici è stato caratterizzato da una prevalenza significativamente inferiore di soggetti affaticati rispetto a quello che non assumeva la batterioterapia orale [OB- vs. OB+; 24(70,58%) vs. 9(37,5%), $p = 0,0003$]. Il gruppo a cui sono stati somministrati i probiotici è stato caratterizzato da valori di punteggio FAS significativamente più bassi rispetto a quello che non assumeva la batterioterapia orale [OB- vs. OB+; mediana (IQR), 33(31-34,5) vs 24 (26-22), $p = 0,007$].

6.3 Discussione

Una definizione accettata di fatica post-COVID-19 è una "diminuzione delle prestazioni fisiche e/o mentali che deriva da cambiamenti di fattori centrali, psicologici e/o periferici dovuti alla malattia COVID-19"⁴⁸⁹. La prevalenza della fatica è stata riportata fino al 50% dei pazienti post-COVID-19. Senza evidenza di danno d'organo, questi individui si sentono stanchi e non disposti a svolgere le attività correnti anche dopo molti mesi dall'eliminazione dell'infezione. Ad oggi, non esiste un metodo specifico per valutare la stanchezza nei soggetti COVID-19. Pertanto, abbiamo utilizzato la Fatigue Assessment Scale (FAS), che è comoda da compilare per i pazienti e non richiede molto tempo. I medici hanno utilizzato la FAS per monitorare i pazienti con sarcoidosi e fibrosi polmonare idiopatica^{480,482-484}. Abbiamo valutato i pazienti a 6 mesi dalla dimissione. Tutti i soggetti arruolati erano acutamente e gravemente malati al momento dell'ammissione al Pronto Soccorso. Come previsto dal nostro protocollo interno, 34 (58,6%) pazienti sono stati sottoposti a trattamento standard e 24 (41,4%) a supplementazione con la miscela probiotica ad alta potenza SLAB51. I pazienti sono rimasti ricoverati in ospedale fino alla risoluzione clinica (SO₂ \geq 94%) o al test negativo per la COVID-19. Alla dimissione, tutti i pazienti presentavano livelli ematici non rilevabili di serotonina, dopamina o acetilcolina simili (Figura 16). Sei mesi dopo la dimissione dall'ospedale, nessun paziente presentava test di funzionalità polmonare anormali o SO₂ inferiore al 94%. Non abbiamo potuto valutare il ruolo dell'ambiente familiare, delle condizioni economiche e di altri sentimenti durante i 6 mesi di permanenza a casa con le loro famiglie. Tuttavia, nessuno dei pazienti ha fatto riferimento all'uso di antidepressivi, sedativi o sonniferi prima del test FAS. È stata determinata una percentuale significativamente inferiore di soggetti che sperimentano la FC nel gruppo a cui è stato somministrato SLAB51 rispetto a quello che ha assunto solo la terapia farmacologica standard. In particolare, il gruppo a cui è stato somministrato SLAB51 ha presentato anche una percentuale significativamente più bassa di soggetti con affaticamento estremo, rispetto al gruppo che non assumeva probiotici. I pazienti con sintomi come affaticamento, "nebbia cerebrale", dolore, dispnea e intolleranza ortostatica⁴⁹⁰ sono sempre più frequenti e suggeriscono un coinvolgimento cronico del sistema nervoso centrale (SNC)⁴⁹¹. Nuove scoperte dimostrano che i livelli rilevabili del virus COVID-19 nel cervello sono bassi e non sono correlati a cambiamenti istopatologici⁴⁹². L'attivazione microgliale, i noduli microgliali e la fagocitosi neuronale osservati derivano da un'inflammatione sistemica, probabilmente in sinergia con l'ipossia e l'ischemia^{493,494}. Come rilevato dalla tomografia a emissione di positroni con 18-Fluorodeossiglucosio (FDG-PET), che misura il metabolismo cerebrale del glucosio, l'ipometabolismo del lobo frontale può essere coinvolto nella fatica nei pazienti con COVID-19⁴⁹⁵. È innegabile che nei soggetti con affaticamento post-COVID-19 l'omeostasi metabolica sia disturbata⁴⁹⁶. Il profilo metabolico dei due gruppi era simile al momento del ricovero. Al T1, nei soggetti trattati con OB+ (n = 24) è stato riscontrato un aumento dei livelli sierici di arginina, asparagina e lattato e una diminuzione dei livelli di 3-idrossiisobutirrato. Sei mesi dopo, quando è stato somministrato il test FAS, il gruppo a cui è stato somministrato SLAB51 ha presentato una prevalenza significativamente inferiore di stanchezza cronica rispetto ai pazienti trattati solo con la terapia farmacologica. Al T1, i soggetti trattati con SLAB51 presentavano livelli di arginina significativamente più elevati rispetto al basale e al gruppo OB- al T1. Sebbene questa osservazione debba essere confermata da un'indagine su un numero maggiore di campioni, i nostri risultati suggeriscono fortemente che i livelli/variazioni di arginina potrebbero costituire

un marcatore quasi predittivo di fatica cronica quando i pazienti COVID-19 vengono dimessi dall'ospedale. Ipotizziamo infatti che i livelli più elevati di arginina osservati nei pazienti trattati con SLAB51 alla dimissione possano essere alla base delle migliori condizioni fisiche e psichiatriche osservate dopo 6 mesi, rispetto ai soggetti trattati solo con la terapia standard. In questo contesto, l'arginina è essenziale nella regolazione dell'ormone della crescita, del glucagone, dell'insulina e per la sintesi del DNA, dell'RNA, delle poliammine e della creatina, una molecola prodotta nel fegato per rigenerare l'ATP in seguito alla contrazione muscolare⁴⁹⁷. Basse concentrazioni di arginina sono state associate in modo consistente alla fatica nelle sue forme croniche e reversibili. Mizuno et al. hanno riscontrato che la concentrazione plasmatica di arginina, insieme ad altri aminoacidi a catena ramificata, era bassa in soggetti sani dopo attività di affaticamento mentale⁴⁹⁸. Inoltre, Camic et al. hanno trovato che la somministrazione di arginina era in grado di ritardare l'insorgenza della fatica neuromuscolare⁴⁹⁹. Secondo Chen et al. questo potrebbe essere legato alla capacità dell'arginina di rimuovere l' NH_3 in eccesso aumentando la biosintesi dell'ossido nitrico o il ciclo dell'urea⁵⁰⁰. È interessante anche sottolineare l'andamento del 3-idrossiisobutirrato che diminuisce nei soggetti trattati con SLAB51 (OB+) ma rimane invariato in quelli non trattati con batterioterapia orale (OB-). Il 3-idrossiisobutirrato, in condizioni di carenza energetica, è una fonte di nutrimento per cuore, cervello e muscoli. È stato recentemente pubblicato che i corpi chetonici sono sbilanciati nei soggetti con COVID-19 e che la loro persistenza ad alti livelli nel sangue era associata a una prognosi sfavorevole^{501,502}. Nel gruppo OB, i livelli non modificati di 3-idrossiisobutirrato suggeriscono meccanismi di compensazione in stato stazionario per un'alterata utilizzazione del glucosio o per l'insulino-resistenza. Il trattamento con SLAB51 potrebbe aver abbassato il 3-idrossiisobutirrato nel gruppo OB+ modificando i livelli di arginina e asparagina che regolano il glucagone e l'insulina e di conseguenza migliorando l'utilizzo del glucosio e il metabolismo energetico. L'asparagina nell'organismo è un supporto critico nella produzione di energia ed è essenziale per il tessuto nervoso, in particolare per lo sviluppo e la funzione del cervello^{503,504}. Inoltre, può aumentare la sintesi del glucagone, l'ormone che antagonizza l'insulina e che provoca un aumento del glucosio nel sangue. Bassi livelli di asparagina possono indicare un cattivo metabolismo o sintesi dell'acido aspartico, con conseguente incapacità di sintetizzare ed espellere adeguatamente l'urea. L'incapacità di espellere l'urea può portare alla formazione di metaboliti tossici contenenti azoto, che possono causare una serie di sintomi, come depressione, irritabilità, mal di testa, confusione o, in casi più estremi, psicosi. La diminuzione dei livelli di arginina e asparagina è presente nel plasma durante le esacerbazioni infiammatorie polmonari acute⁵⁰⁵. L'aumento del lattato osservato solo nei soggetti OB+ deve essere inquadrato nel contesto dell'utilizzo del metabolismo energetico. Non pensiamo che la differenza osservata a T1 derivi da una diversa attività muscolare nei nostri pazienti. I soggetti OB+ e OB- sono stati costretti a letto per settimane e sono stati dimessi senza alcuna riabilitazione motoria. Pertanto, a nostro avviso, la variazione osservata dipende dalla modifica della flora intestinale indotta da SLAB51. È noto che un'adeguata fermentazione intestinale è associata a migliori prestazioni fisiche e atletiche⁵⁰⁶. L'aumento dei livelli di lattato nei soggetti OB+ potrebbe essere una fonte di energia aggiuntiva per il cervello, come suggerito dal suo uso come neuroprotettore nei traumi cerebrali⁵⁰⁷. La natura osservazionale dello studio, così come la mancanza di un controllo appropriato, di randomizzazione, devono essere considerati come limitazioni principali per questo studio.

6.4 Conclusione

In conclusione, un numero crescente di evidenze suggerisce che la disbiosi e l'alterazione dei processi metabolici dovuti allo squilibrio della flora intestinale, osservati nei pazienti infettati da SARS-CoV2, può giocare un ruolo chiave nel determinare la gravità del COVID-19, compresi i disturbi neuropsicologici, psichiatrici e a lungo termine⁵⁰⁸⁻⁵¹¹.

Dato il significativo impatto della SARS-CoV-2 sul microbiota dell'ospite e l'attuale mancanza di opzioni terapeutiche efficaci, è stato ipotizzato un possibile ruolo della batterioterapia orale come strategia terapeutica complementare per contrastare i cambiamenti fisiopatologici dovuti

alla SARS-CoV-2 e ai danni correlati alla COVID-19⁵¹²⁻⁵¹⁴. Riteniamo che, oltre a quanto precedentemente riportato in merito alla sopravvivenza e al rischio di intubazione⁴⁵⁷, la somministrazione di SLAB51 durante il ricovero possa influire sulle prestazioni del soggetto a distanza di mesi. Pur considerando tutti i limiti del presente studio, alcune evidenze possono essere sottolineate: (a) i soggetti infettati dal virus, se trattati con SLAB51, hanno una minore incidenza di stanchezza cronica; (b) la somministrazione di batterioterapia induce cambiamenti metabolici per un migliore utilizzo del glucosio e delle vie energetiche. Tuttavia, questi risultati devono essere confermati da analisi più approfondite e replicati in ulteriori studi.

Parte III

Prospettive future e Conclusioni

Capitolo 7

Risposta immunitaria ai vaccini e disbiosi

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, alla fine di agosto 2022 sono state somministrate oltre 12,4 miliardi di dosi di vaccini contro la SARS-CoV-2 in tutto il mondo (156 vaccini ogni 100 persone). I diversi tipi di vaccini sviluppati per suscitare risposte immunitarie efficaci per proteggere dalla COVID-19 o per ridurre la gravità della malattia in caso di infezione hanno cambiato il corso della pandemia^{515,516}. Tuttavia, esiste una grande variazione nella risposta al vaccino tra individui diversi in popolazioni diverse. Un numero crescente di studi clinici e su animali ha dimostrato il ruolo critico della composizione e della funzione del microbiota intestinale nel modulare la risposta a vaccini come il vaccino contro l'influenza e il vaccino orale contro il rotavirus⁵¹⁷. Il microbiota intestinale può influenzare l'immunogenicità del vaccino, compresa l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene attraverso i recettori di riconoscimento del modello da parte di molecole derivate dai batteri, come la flagellina e il peptidoglicano, che agiscono come potenti adiuvanti naturali per potenziare la risposta immunitaria⁵¹⁸. In particolare, è stato dimostrato che la flagellina batterica contribuisce in modo determinante alla risposta anticorpale al vaccino antinfluenzale attraverso il rilevamento del recettore Toll-like 5 (TLR5)⁵¹⁹. In topi privi di germi e trattati con antibiotici, il rilevamento mediato da NOD2 del peptidoglicano batterico ha potenziato la risposta immunitaria al vaccino intranasale contro la tossina del colera⁵²⁰. Il microbiota intestinale potrebbe anche modulare la risposta al vaccino attraverso metaboliti derivati dai batteri, come gli SCFA, che regolano l'espressione genica per la risposta anticorpale e promuovono la differenziazione delle cellule B del plasma, secondo le evidenze in vivo⁵²¹.

Uno studio prospettico pubblicato nel 2022 ha caratterizzato il microbioma intestinale associato alle risposte immunitarie contro un vaccino inattivato (CoronaVac, Sinovac) o un vaccino a mRNA (BNT162b2, BioNTech, Comirnaty) e agli eventi avversi associati in 138 individui che avevano ricevuto un vaccino contro il COVID-19. L'abbondanza relativa di *Bifidobacterium adolescentis* nei soggetti altamente responsivi al vaccino CoronaVac era significativamente ($P = 0,023$) superiore a quella dei soggetti poco responsivi prima della vaccinazione, con un arricchimento delle vie carboidratiche correlate a *B. adolescentis*. Un mese dopo la seconda dose di vaccinazione CoronaVac, *B. adolescentis* è rimasto più abbondante nei soggetti high responders. Inoltre, la risposta anticorpale neutralizzante era correlata positivamente con l'abbondanza di batteri produttori di butirrato con flagelli e fimbrie, tra cui *Roseburia faecis*. È interessante notare che l'abbondanza di *Prevotella copri* e di due specie di *Megamonas* prima della vaccinazione COVID-19 è stata associata a un minor numero di eventi avversi in entrambi i gruppi di vaccinati, il che implica che questi batteri potrebbero svolgere un ruolo antinfiammatorio nella risposta immunitaria⁵²². Anche uno studio prospettico condotto su 43 pazienti con malattia infiammatoria intestinale ha mostrato associazioni tra disbiosi intestinale e risposta sierologica contro i vaccini BNT162b2 o ChAdOx1 nCoV-19 (Vaxzevria, AstraZeneca). L'abbondanza di *Bilophila* e i livelli del metabolita fecale trimetilammina sono stati associati positivamente alla risposta al vaccino, mentre l'abbondanza di *Streptococcus* e i livelli di metaboliti, tra cui fenilalanina, fenilacetato e succinato, hanno mostrato un'associazione negativa⁵²³. Questi risultati indicano l'importanza degli SCFA, del pattern-recognition sensing mediato dai recettori e della disbiosi intestinale associata alla malattia nel modulare l'immunogenicità del vaccino COVID-19. Uno studio ha anche mostrato un leggero spostamento del microbiota intestinale dopo la prima dose di vaccino, anche se non è chiaro se i cambiamenti microbici siano stati causati dalla vaccinazione o dovuti a misure correlate a COVID-19, poiché non è stato studiato un gruppo di controllo che non ha ricevuto vaccini. Altri

hanno dimostrato che un vaccino a mRNA ha portato a un arricchimento della diversità microbica orale, a una diminuzione dell'abbondanza di *Bacteroides* e a cambiamenti nel microbioma intestinale durante il corso del vaccino SinoVac in 40 individui sani⁵²⁴.

Ad oggi, una delle sfide principali della vaccinazione COVID-19 è il declino della protezione nel tempo, anche per le dosi di richiamo⁵²⁵. I soggetti di età pari o superiore a 60 anni, quelli immunocompromessi o con comorbidità, come l'obesità, sono altamente suscettibili al rapido declino dell'immunogenicità del vaccino^{526,527}. È stato ipotizzato che la disbiosi intestinale possa essere uno dei meccanismi attraverso cui questi fattori di rischio causano un indebolimento delle difese contro l'infezione da SARS-CoV-2 dopo la vaccinazione. Nei bambini di età compresa tra i 3 e i 5 anni, l'efficacia del vaccino COVID-19 (CoronaVac, Sinovac) si è dimostrata non ottimale⁵²⁸. Pertanto, questi soggetti vulnerabili o con controindicazioni ai vaccini COVID-19 potrebbero potenzialmente beneficiare di interventi basati sul microbiota per integrare l'efficacia dei vaccini COVID-19. È necessario condurre studi clinici sull'efficacia degli interventi basati sul microbiota per migliorare l'immunogenicità del vaccino COVID-19, ridurre gli eventi avversi associati al vaccino e prolungarne l'efficacia nel tempo.

Capitolo 8

Interventi basati sul microbiota

Sono in corso studi clinici che utilizzano modifiche della dieta, probiotici, prebiotici e trapianto di microbiota fecale (FMT) per determinarne l'efficacia nel trattamento del COVID-19 acuto e nel potenziamento dell'efficacia del vaccino SARS-CoV-2.

8.1 Gestione degli antibiotici

Durante la prima ondata della pandemia, gli antibiotici erano comunemente utilizzati. Una meta-analisi ha stimato che a tre pazienti su quattro con COVID-19 a livello globale sono stati prescritti antibiotici, e tale percentuale è nettamente superiore all'incidenza stimata delle coinfezioni batteriche nella COVID-19, che è solo dell'8,6%⁵²⁹166. Gli esiti clinici di 45 pazienti con COVID-19 moderata non hanno mostrato differenze tra coloro che avevano e non avevano ricevuto antibiotici, suggerendo che gli antibiotici non sono utili per migliorare gli esiti clinici della COVID-19³⁴². È stata riportata una marcata disbiosi intestinale nei pazienti con COVID-19 che hanno ricevuto antibiotici durante l'ospedalizzazione e la disbiosi intestinale indotta dagli antibiotici ha compromesso la risposta immunitaria ai vaccini contro l'influenza stagionale nell'uomo⁵³⁰. Uno studio longitudinale su 200 pazienti con COVID-19 ha dimostrato che una minore assunzione di antibiotici nell'anno precedente alla COVID-19 era associata a una minore gravità della malattia e a una più rapida eliminazione del SARS-CoV-2⁵³¹. Pertanto, la stewardship antimicrobica è fondamentale per prevenire la disbiosi indotta dagli antibiotici, la COVID-19 grave e il rischio di resistenza agli antimicrobici nei pazienti con COVID-19.

8.2 Modifica della dieta

La modifica della dieta è stata proposta come mezzo per modulare il microbiota intestinale e migliorare gli esiti clinici della COVID-19. Diversi studi di popolazione hanno fornito l'evidenza epidemiologica che specifiche abitudini alimentari sono associate alla mortalità e agli esiti delle malattie correlate alla COVID-19. In un'ampia indagine prospettica su 592.571 partecipanti nel Regno Unito e negli Stati Uniti, una dieta ricca di alimenti vegetali è stata associata a una riduzione del rischio e della gravità della COVID-19⁵³². Uno studio retrospettivo su 509 pazienti con COVID-19 ha rilevato associazioni statisticamente significative tra una dieta vegetariana e una minore gravità della COVID-19 nelle persone di età superiore a 65 anni, mentre gli individui non vegetariani sono risultati più inclini a sviluppare manifestazioni gravi di malattia⁵³³. Anche una maggiore assunzione di alimenti ricchi di prebiotici e una minore assunzione di zuccheri nell'anno precedente alla COVID-19 sono state associate a una gravità più lieve della malattia e a una più rapida eliminazione del SARS-CoV-2 in una coorte di 200 persone⁵³¹. Uno studio multicentrico su 7.337 individui ha dimostrato che, nei pazienti affetti da COVID-19 con diabete mellito di tipo 2, gli esiti clinici potevano essere migliorati da una glicemia ben controllata, evidenziando il potenziale della modifica della dieta a basso indice glicemico con una maggiore assunzione di verdura e frutta nel migliorare gli esiti tra i pazienti ospedalizzati⁵³⁴. I modelli dietetici dei vari Paesi europei sono risultati associati all'attività dell'ACE2 e al tasso di mortalità⁵³⁵, suggerendo un possibile legame meccanicistico tra la dieta e la mortalità da COVID-19. Un caso clinico ha rivelato un miglioramento dei gravi sintomi gastrointestinali post-acuti in un paziente con COVID-19 con un intervento ad alto contenuto di fibre contenente crusca, inulina e Fibersol-2, che è stato associato a cambiamenti nella composizione dei batteri intestinali con un aumento dei batteri produttori di SCFA, tra cui *Oscillibacter sp.*, *Anaerofustis sp.*, *Blautia spp.* ed *Eubacterium hallii*. La comprensione

dell'effetto della dieta sui cambiamenti microbici in risposta al coronavirus aprirà la strada a nuovi interventi dietetici durante la pandemia COVID-19⁵³⁶.

8.3 Probiotici e Prebiotici

Diversi studi retrospettivi e studi clinici di piccole e medie dimensioni, hanno dimostrato che la somministrazione di probiotici e prebiotici per via orale ha indotto un'attività antivirale e ha avuto effetti positivi sulla composizione e sulla diversità microbica intestinale ed è stata associata a un miglioramento degli esiti clinici nei pazienti affetti da COVID-19^{457,537-539}. Due studi retrospettivi comprendenti 200 e 411 pazienti ospedalizzati con COVID-19 hanno dimostrato che l'uso delle specie probiotiche *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* era associato a un miglioramento clinico più rapido entro 3 giorni, a una riduzione della durata dell'ospedalizzazione e a un minor rischio di morte nei pazienti con polmonite grave^{457,540}. I risultati di uno studio randomizzato e controllato che ha coinvolto 200 pazienti con COVID-19 hanno dimostrato che una supplementazione probiotica di 14 giorni di *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus clausii* combinata con enzimi sistemici con potenziale immunomodulante (serratiopeptidasi, bromelina, amilasi, lisozima, peptidasi, catalasi, papaina, glucoamilasi e lattoferrina) ha migliorato l'affaticamento fisico e mentale in soggetti reduci da COVID-19⁵³⁷. Un altro studio randomizzato e controllato, condotto su 300 partecipanti, ha inoltre rilevato che l'integrazione di una formula probiotica composta da *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* in pazienti affetti da COVID-19 è stata associata a una riduzione della carica virale nasofaringea, degli infiltrati polmonari, a una riduzione della durata dei sintomi clinici di 2-7 giorni e a un miglioramento della risposta immunitaria nel gruppo di intervento rispetto al gruppo di controllo che riceveva un placebo⁵³⁸. I meccanismi dei probiotici sono stati correlati a una migliore risposta immunitaria e a cambiamenti positivi nella composizione del microbiota intestinale, con una maggiore somiglianza con la composizione microbica del microbiota intestinale di individui sani e una diminuzione dei batteri associati a COVID-19, come dimostrato in studi pilota⁵⁴¹. In uno studio in aperto su 55 pazienti ospedalizzati con COVID-19, una percentuale maggiore di individui (88% contro 63,3%) che hanno ricevuto 4 settimane di una formula sinbiotica composta da ceppi di *Bifidobacterium* e prebiotici (SIM01) ha ottenuto la risoluzione dei sintomi clinici, un aumento degli anticorpi IgG contro il SARS-CoV-2 e una riduzione dei marcatori pro-infiammatori nel sangue, come IL-6, CCL2, M-CSF, TNF e IL-1RA, rispetto agli individui nel braccio di trattamento standard⁵³⁹.

Ad agosto 2022, 31 studi clinici sono stati registrati su ClinicalTrials.gov. La maggior parte degli studi clinici si è concentrata sul trattamento del COVID-19 e sulla sua prevenzione. In particolare, si è concentrata sull'uso di specie probiotiche appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus* per il trattamento o la prevenzione della COVID-19. I prodotti bioterapeutici vivi, considerati come medicinali biologici che contengono microrganismi vivi per uso terapeutico umano (come un *Lactococcus lactis* ingegnerizzato per secernere IL-10)⁵⁴², non sono stati studiati per il COVID-19 ma rappresentano una strada promettente a causa di una modalità d'azione multifattoriale. Uno studio in vitro che ha utilizzato estratti batterici ottenuti da campioni umani ha identificato tre nuovi metaboliti anti-SARS-CoV-2, N6-(Δ 2-isopentenil)adenosina, triptamina e 2,5-bis(3-indolilmetil)pirazina⁵⁴³, che sono strutturalmente o funzionalmente paragonabili ai farmaci COVID-19 sintetici, tra cui remdesivir, fluvoxamina e favipiravir. Sono necessarie ulteriori indagini in vivo e sperimentazioni cliniche per determinare la sicurezza e l'efficacia dei prodotti bioterapeutici vivi e dei metaboliti derivati dal microbiota per il COVID-19.

8.4 Trapianto fecale

Il FMT mira a ripristinare la disbiosi microbica attraverso il trasferimento di un microbioma sano a un individuo affetto da una malattia. Due case report hanno mostrato l'uso della FMT

nel COVID-19^{544,545}. In 5 degli 11 soggetti affetti da COVID-19 è stato registrato un miglioramento dei sintomi gastrointestinali e sono stati osservati miglioramenti favorevoli nei marcatori dell'immunità nel sangue e nella composizione del microbiota intestinale, con un aumento dell'abbondanza di *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium*⁵⁴⁴. In due pazienti con COVID-19 e concomitante infezione ricorrente da *Clostridioides difficile*, il trattamento con FMT è apparso sicuro e i sintomi respiratori correlati alla COVID-19 si sono rapidamente risolti entro un mese dalla FMT⁵⁴⁵. Tuttavia, molte di queste conclusioni preliminari sull'uso della FMT e dei probiotici sono state tratte sulla base di associazioni e analisi retrospettive. Sono necessari ulteriori studi clinici e sugli animali per chiarire i legami meccanici alla base degli effetti terapeutici di questi interventi basati sul microbiota.

Capitolo 9

Conclusioni

Questo capitolo conclude la tesi con una breve sintesi dei risultati principali degli studi sperimentali. Questa tesi, nata in un momento storico difficile per gli operatori sanitari, ha rappresentato un contributo allo sforzo dell'intera comunità scientifica per fronteggiare gli effetti devastanti di una pandemia inaspettata e diffusasi così rapidamente. Il nostro intento è stato quello di proporre una strategia terapeutica da affiancare alle terapie raccomandate, sicura dal punto di vista delle possibili complicazioni ed accessibile.

Nel capitolo 3 abbiamo mostrato come la supplementazione con terapia batterica orale ha mostrato un beneficio nel ridurre il trasferimento in ICU e una migliore sopravvivenza con una protezione nei confronti del rischio di sviluppare insufficienza respiratoria di otto volte superiore a chi non veniva supplementato. Per quanto riguarda gli altri segni e sintomi associati a COVID-19, cioè diarrea, febbre, tosse, dispnea, astenia, mialgia, un miglioramento significativo è stato già evidente dopo 24-48 ore dall'inizio della batterioterapia. La raccolta dei dati clinici, l'esame e l'assistenza dei pazienti affetti da COVID-19 sono impegnativi per il rischio di trasmissione del virus. La nostra iniziativa mirava a modulare l'asse intestino-polmone, facilitare la gestione del paziente e possibilmente determinare l'esito dell'infezione polmonare.

Nel capitolo 4 abbiamo analizzato una casistica più ampia di pazienti confermando le nostre precedenti osservazioni in quanto pochi giorni dopo la batterioterapia, la probabilità di sopravvivenza era significativamente migliorata. Inoltre, il trattamento combinato BAT e batterioterapia è stato complessivamente associato a una significativa riduzione della mortalità rispetto al gruppo BAT (10 = 11% vs. 34 = 30%; $p < 0,001$). Non siamo stati in grado di definire se l'effetto positivo osservato di una specifica batterioterapia orale possa essere spiegato da un effetto diretto sul microbiota intestinale o da un'attività antivirale o da entrambi. I nostri studi suggeriscono un possibile ruolo della batterioterapia orale nella gestione dei pazienti ricoverati per polmonite da COVID-19: in particolare, la riduzione della progressione verso la malattia grave e una minore mortalità sono state evidenziate nei soggetti in cui la BAT è associata alla terapia batterica orale.

I risultati del capitolo 5 possono essere divisi in due parti: una relativa all'osservazione clinica in vivo e la seconda dove viene approfondito in vitro un possibile meccanismo benefico della supplementazione con terapia batterica orale. Nella prima parte abbiamo descritto come già dopo 24 ore dall'inizio della batterioterapia, il gruppo trattato con la formulazione SLAB51 presentava una migliore ossigenazione del sangue rispetto al gruppo che riceveva solo terapia standard, come evidenziato dall'emogas analisi. Questo miglioramento del parametro dell'ossigenazione si è accompagnato anche a una sensazione di benessere soggettiva riportata nelle cartelle di diversi pazienti integrati con SLAB51. Nella seconda parte, i saggi in vitro hanno evidenziato che i batteri dello SLAB51 sono caratterizzati da un'elevata attività dell'arginina deaminasi (ADI) e sono associati a una significativa riduzione a breve termine dell'NO prodotto da cellule che imitano gli epitelii intestinali. Ipotizziamo che la somministrazione di SLAB51 possa produrre un'inibizione rilevante dell'attività NOS2 che, limitando l'afflusso di sangue e l'utilizzo di ossigeno nell'intestino, aumenterebbe la quantità di O₂ disponibile nel sangue arterioso per cervello, reni e cuore attivando un effetto di "risparmio di ossigeno (oxygen sparing)" rilevabile dal punto di vista clinico e laboratoristico.

Il capitolo 6 presenta uno studio che è nato dalle crescenti osservazioni di pazienti che sperimentavano sintomi cronici dopo la risoluzione acuta della malattia, in particolare un senso di affaticamento cronico. Abbiamo valutato tramite la Fatigue Assessment Scale (FAS) la fatica riportata dopo 6 mesi dai pazienti determinando una percentuale significativamente inferiore di soggetti che sperimentano la fatica cronica nel gruppo a cui è stato somministrato SLAB51

rispetto a quello che ha assunto solo la terapia farmacologica standard. In aggiunta, le analisi metabolomiche eseguite suggeriscono che la somministrazione di batterioterapia indurrebbe cambiamenti metabolici per un migliore utilizzo del glucosio e delle vie energetiche.

La rapida espansione delle conoscenze sull'importanza del microbiota intestinale nel COVID-19 rappresenta un cambiamento di paradigma nella comprensione del contributo di microrganismi specifici alla suscettibilità dell'ospite e alla risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2. Gli studi osservazionali hanno fornito importanti indicazioni sul ruolo della disbiosi nelle condizioni acute e post-acute della COVID-19 e sulla loro relazione con la gravità della malattia e sui possibili effetti a lungo termine. Sebbene gli studi clinici su larga scala siano limitati, riteniamo che questo campo sia in crescita e offra enormi opportunità.

Seppur con limitazioni date dal disegno degli studi clinici, la tesi contribuisce a comprendere il possibile ruolo della terapia batterica orale nell'infezione da SARS-CoV2 e pone le basi per sfruttarne i principi anche in altre patologie, non solo respiratorie.

Bibliografia

1. Zhao Z. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol.* 2003;52(8):715-720. doi:10.1099/jmm.0.05320-0
2. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. Accessed October 10, 2022. <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
4. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-236. doi:10.1080/22221751.2020.1719902
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
6. Re3data.Org. GISAID. Published online 2012. doi:10.17616/R3Q59F
7. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
8. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
9. 20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf. Accessed October 10, 2022. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>
10. 20200212-sitrep-23-ncov.pdf. Accessed October 10, 2022. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200212-sitrep-23-ncov.pdf>
11. Petersen E, Koopmans M, Go U, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(9):e238-e244. doi:10.1016/S1473-3099(20)30484-9
12. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 2020;395(10223):507-513. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
13. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
14. Yu Y, Zhu C, Yang L, et al. Identification of risk factors for mortality associated with COVID-19. *PeerJ.* 2020;8:e9885. doi:10.7717/peerj.9885
15. Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization. Accessed October 17, 2022. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
16. Chan JFW, To KKW, Tse H, Jin DY, Yuen KY. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends Microbiol.* 2013;21(10):544-555. doi:10.1016/j.tim.2013.05.005
17. Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* 2018;149:58-74. doi:10.1016/j.antiviral.2017.11.001
18. Biryukov J, Boydston JA, Dunning RA, et al. SARS-CoV-2 is rapidly inactivated at high temperature. *Environ Chem Lett.* 2021;19(2):1773-1777. doi:10.1007/s10311-021-01187-x
19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052

20. Enhancing response to Omicron SARS-CoV-2 variant. Accessed October 24, 2022. [https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-\(b.1.1.529\)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states](https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-(b.1.1.529)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states)
21. HAN Archive - 00459 | Health Alert Network (HAN). Accessed October 24, 2022. <https://emergency.cdc.gov/han/2021/han00459.asp>
22. Threat Assessment Brief: Implications of the emergence and spread of the SARS-CoV-2 B.1.1. 529 variant of concern (Omicron) for the EU/EEA. European Centre for Disease Prevention and Control. Published November 26, 2021. Accessed October 24, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-emergence-sars-cov-2-variant-b.1.1.529>
23. Tegally H, Moir M, Everatt J, et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nat Med*. 2022;28(9):1785-1790. doi:10.1038/s41591-022-01911-2
24. Jørgensen SB, Nygård K, Kacelnik O, Telle K. Secondary Attack Rates for Omicron and Delta Variants of SARS-CoV-2 in Norwegian Households. *JAMA*. 2022;327(16):1610-1611. doi:10.1001/jama.2022.3780
25. Baker JM, Nakayama JY, O'Hegarty M, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant Transmission Within Households - Four U.S. Jurisdictions, November 2021-February 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022;71(9):341-346. doi:10.15585/mmwr.mm7109e1
26. Pulliam JRC, van Schalkwyk C, Govender N, et al. Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science*. 2022;376(6593):eabn4947. doi:10.1126/science.abn4947
27. Altarawneh HN, Chemaitelly H, Hasan MR, et al. Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med*. 2022;386(13):1288-1290. doi:10.1056/NEJMc2200133
28. Rössler A, Riepler L, Bante D, von Laer D, Kimpel J. SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization in Serum from Vaccinated and Convalescent Persons. *N Engl J Med*. Published online January 12, 2022;NEJMc2119236. doi:10.1056/NEJMc2119236
29. Schmidt F, Muecksch F, Weisblum Y, et al. Plasma neutralization properties of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *medRxiv*. Published online December 13, 2021:2021.12.12.21267646. doi:10.1101/2021.12.12.21267646
30. Sheward DJ, Kim C, Ehling RA, et al. Neutralisation sensitivity of the SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) variant: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(6):813-820. doi:10.1016/S1473-3099(22)00129-3
31. Hachmann NP, Miller J, Collier A ris Y, et al. Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *N Engl J Med*. Published online June 22, 2022;NEJMc2206576. doi:10.1056/NEJMc2206576
32. Wang Q, Guo Y, Iketani S, et al. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature*. 2022;608(7923):603-608. doi:10.1038/s41586-022-05053-w
33. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*. 2022;608(7923):593-602. doi:10.1038/s41586-022-04980-y
34. Davies MA, Morden E, Rosseau P, et al. Outcomes of laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection during resurgence driven by Omicron lineages BA.4 and BA.5 compared with previous waves in the Western Cape Province, South Africa. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci*. Published online July 1, 2022:2022.06.28.22276983. doi:10.1101/2022.06.28.22276983
35. Iuliano AD, Brunkard JM, Boehmer TK, et al. Trends in Disease Severity and Health Care Utilization During the Early Omicron Variant Period Compared with Previous SARS-CoV-2 High Transmission Periods - United States, December 2020-January 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022;71(4):146-152. doi:10.15585/mmwr.mm7104e4
36. Faust JS, Du C, Liang C, et al. Excess Mortality in Massachusetts During the Delta and Omicron Waves of COVID-19. *JAMA*. 2022;328(1):74-76. doi:10.1001/jama.2022.8045
37. Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom. :13.
38. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England -

- PubMed. Accessed October 25, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658326/>
39. E V, S M, M C, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*. 2021;593(7858). doi:10.1038/s41586-021-03470-x
 40. Challen R, Brooks-Pollock E, Read JM, Dyson L, Tsaneva-Atanasova K, Danon L. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *BMJ*. 2021;372:n579. doi:10.1136/bmj.n579
 41. Davies NG, Jarvis CI, CMMID COVID-19 Working Group, et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature*. 2021;593(7858):270-274. doi:10.1038/s41586-021-03426-1
 42. Frampton D, Rampling T, Cross A, et al. Genomic characteristics and clinical effect of the emergent SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage in London, UK: a whole-genome sequencing and hospital-based cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(9):1246-1256. doi:10.1016/S1473-3099(21)00170-5
 43. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. 2021;592(7854):438-443. doi:10.1038/s41586-021-03402-9
 44. Wu K, Werner AP, Moliva JJ, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv*. doi:10.1101/2021.01.25.427948
 45. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe*. 2021;29(3):463-476.e6. doi:10.1016/j.chom.2021.02.003
 46. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021;27(4):622-625. doi:10.1038/s41591-021-01285-x
 47. X X, Y L, J L, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nat Med*. 2021;27(4). doi:10.1038/s41591-021-01270-4
 48. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology. Virological. Published January 12, 2021. Accessed October 26, 2022. <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manauas-preliminary-findings/586>
 49. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021;372(6544):815-821. doi:10.1126/science.abh2644
 50. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation. :66.
 51. Dougherty K, Mannell M, Naqvi O, Matson D, Stone J. SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant COVID-19 Outbreak Associated with a Gymnastics Facility - Oklahoma, April-May 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;70(28):1004-1007. doi:10.15585/mmwr.mm7028e2
 52. Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, et al. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):35-42. doi:10.1016/S1473-3099(21)00475-8
 53. Sheikh A, McMenamin J, Taylor B, Robertson C, Public Health Scotland and the EAVE II Collaborators. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *Lancet Lond Engl*. 2021;397(10293):2461-2462. doi:10.1016/S0140-6736(21)01358-1
 54. S S, A W, G P, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10247). doi:10.1016/S0140-6736(20)31304-0
 55. Havers FP, Reed C, Lim T, et al. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern Med*. Published online July 21, 2020. doi:10.1001/jamainternmed.2020.4130
 56. COVID-19 Cumulative Infection Collaborators. Estimating global, regional, and national daily and cumulative infections with SARS-CoV-2 through Nov 14, 2021: a statistical

- analysis. *Lancet Lond Engl.* 2022;399(10344):2351-2380. doi:10.1016/S0140-6736(22)00484-6
57. Ea M, A R, Rt G, Pe S. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med.* 2021;174(1). doi:10.7326/M20-5008
 58. Morawska L, Milton DK. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2020;71(9):2311-2313. doi:10.1093/cid/ciaa939
 59. Klompas M, Baker MA, Rhee C. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. *JAMA.* Published online July 13, 2020. doi:10.1001/jama.2020.12458
 60. Chagla Z, Hota S, Khan S, Mertz D, International Hospital and Community Epidemiology Group. Re: It Is Time to Address Airborne Transmission of COVID-19. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2021;73(11):e3981-e3982. doi:10.1093/cid/ciaa1118
 61. Duval D, Palmer JC, Tudge I, et al. Long distance airborne transmission of SARS-CoV-2: rapid systematic review. *BMJ.* 2022;377:e068743. doi:10.1136/bmj-2021-068743
 62. Shen Y, Li C, Dong H, et al. Community Outbreak Investigation of SARS-CoV-2 Transmission Among Bus Riders in Eastern China. *JAMA Intern Med.* 2020;180(12):1665-1671. doi:10.1001/jamainternmed.2020.5225
 63. Hamner L, Dubbel P, Capron I, et al. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice - Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(19):606-610. doi:10.15585/mmwr.mm6919e6
 64. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA.* 2020;323(16):1610-1612. doi:10.1001/jama.2020.3227
 65. Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1583-1591. doi:10.3201/eid2607.200885
 66. Zhou J, Otter JA, Price JR, et al. Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2021;73(7):e1870-e1877. doi:10.1093/cid/ciaa905
 67. Ben-Shmuel A, Brosh-Nissimov T, Glinert I, et al. Detection and infectivity potential of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) environmental contamination in isolation units and quarantine facilities. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;26(12):1658-1662. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.004
 68. Birgand G, Peiffer-Smadja N, Fournier S, Kerneis S, Lescure FX, Lucet JC. Assessment of Air Contamination by SARS-CoV-2 in Hospital Settings. *JAMA Netw Open.* 2020;3(12):e2033232. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.33232
 69. Wong SCY, Kwong RTS, Wu TC, et al. Risk of nosocomial transmission of coronavirus disease 2019: an experience in a general ward setting in Hong Kong. *J Hosp Infect.* 2020;105(2):119-127. doi:10.1016/j.jhin.2020.03.036
 70. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020;323(18):1843-1844. doi:10.1001/jama.2020.3786
 71. Colavita F, Lapa D, Carletti F, et al. SARS-CoV-2 Isolation From Ocular Secretions of a Patient With COVID-19 in Italy With Prolonged Viral RNA Detection. *Ann Intern Med.* 2020;173(3):242-243. doi:10.7326/M20-1176
 72. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020;159(1):81-95. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.065
 73. Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ.* 2020;369:m1443. doi:10.1136/bmj.m1443
 74. Xiao F, Sun J, Xu Y, et al. Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe

- COVID-19. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1920-1922. doi:10.3201/eid2608.200681
75. Probable Evidence of Fecal Aerosol Transmission of SARS-CoV-2 in a High-Rise Building - PubMed. Accessed October 26, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32870707/>
 76. Yuan J, Chen Z, Gong C, et al. Sewage as a Possible Transmission Vehicle During a Coronavirus Disease 2019 Outbreak in a Densely Populated Community: Guangzhou, China, April 2020. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2021;73(7):e1487-e1488. doi:10.1093/cid/ciaa1494
 77. AABB COVID-19 Resources. aabb.org. Accessed October 26, 2022. <https://www.aabb.org/regulatory-and-advocacy/regulatory-affairs/infectious-diseases/coronavirus>
 78. Kotlyar AM, Grechukhina O, Chen A, et al. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(1):35-53.e3. doi:10.1016/j.ajog.2020.07.049
 79. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020;382(16):1564-1567. doi:10.1056/NEJMc2004973
 80. Riddell S, Goldie S, Hill A, Eagles D, Drew TW. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virol J.* 2020;17(1):145. doi:10.1186/s12985-020-01418-7
 81. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 2020;382(12):1177-1179. doi:10.1056/NEJMc2001737
 82. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study - The Lancet Infectious Diseases. Accessed October 26, 2022. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30196-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30196-1/fulltext)
 83. Jones TC, Biele G, Mühlemann B, et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science.* 2021;373(6551):eabi5273. doi:10.1126/science.abi5273
 84. Hay JA, Kissler SM, Fauver JR, et al. Viral dynamics and duration of PCR positivity of the SARS-CoV-2 Omicron variant. :18.
 85. Boucau J, Marino C, Regan J, et al. Duration of Shedding of Culturable Virus in SARS-CoV-2 Omicron (BA.1) Infection. *N Engl J Med.* 2022;387(3):275-277. doi:10.1056/NEJMc2202092
 86. Fontana LM, Villamagna AH, Sikka MK, McGregor JC. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2021;42(6):659-668. doi:10.1017/ice.2020.1273
 87. Kim MC, Cui C, Shin KR, et al. Duration of Culturable SARS-CoV-2 in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(7):671-673. doi:10.1056/NEJMc2027040
 88. Basile K, McPhie K, Carter I, et al. Cell-based Culture Informs Infectivity and Safe De-Isolation Assessments in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2021;73(9):e2952-e2959. doi:10.1093/cid/ciaa1579
 89. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020;581(7809):465-469. doi:10.1038/s41586-020-2196-x
 90. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):565-574. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1
 91. Differences in Antibody Kinetics and Functionality Between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections - PubMed. Accessed October 26, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726417/>
 92. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* 2021;371(6529):eabf4063. doi:10.1126/science.abf4063
 93. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone

- marrow plasma cells in humans. *Nature*. 2021;595(7867):421-425. doi:10.1038/s41586-021-03647-4
94. Yao L, Wang GL, Shen Y, et al. Persistence of Antibody and Cellular Immune Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients Over Nine Months After Infection. *J Infect Dis*. 2021;224(4):586-594. doi:10.1093/infdis/jiab255
95. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020;370(6521):1227-1230. doi:10.1126/science.abd7728
96. Rodda LB, Netland J, Shehata L, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021;184(1):169-183.e17. doi:10.1016/j.cell.2020.11.029
97. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021;27(7):1205-1211. doi:10.1038/s41591-021-01377-8
98. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals - PubMed. Accessed October 27, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473127/>
99. Sagar M, Reifler K, Rossi M, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest*. 2021;131(1):143380. doi:10.1172/JCI143380
100. Kundu R, Narean JS, Wang L, et al. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat Commun*. 2022;13(1):80. doi:10.1038/s41467-021-27674-x
101. J R, A M, S N, J W, M L, K H. Incidence and Severity of Covid-19 in Patients with and without Previously Verified Infections with Common Cold Coronaviruses. *J Infect Dis*. 2021;223(10). doi:10.1093/infdis/jiab089
102. Wratil PR, Schmacke NA, Karakoc B, et al. Evidence for increased SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity related to pre-existing immunity to seasonal coronaviruses. *Cell Rep*. 2021;37(13):110169. doi:10.1016/j.celrep.2021.110169
103. Vj H, S F, A C, et al. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *Lancet Lond Engl*. 2021;397(10283). doi:10.1016/S0140-6736(21)00675-9
104. Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet Lond Engl*. 2021;397(10280):1204-1212. doi:10.1016/S0140-6736(21)00575-4
105. Protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection with the Omicron BA.4 or BA.5 subvariants | medRxiv. Accessed October 27, 2022. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.07.11.22277448v1>
106. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol*. 2020;41(5):355-359. doi:10.1016/j.it.2020.03.007
107. Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog*. 2018;14(8):e1007236. doi:10.1371/journal.ppat.1007236
108. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol*. 2020;108(1):17-41. doi:10.1002/JLB.3COVR0520-272R
109. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020;75(7):1564-1581. doi:10.1111/all.14364
110. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(7):389-391. doi:10.1038/s41577-020-0343-0
111. van de Veerdonk FL, Netea MG, van Deuren M, et al. Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. *eLife*. 2020;9:e57555. doi:10.7554/eLife.57555

112. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-128. doi:10.1056/NEJMoa2015432
113. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(2):327-331. doi:10.23812/CONTI-E
114. Coopersmith CM, Antonelli M, Bauer SR, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. *Crit Care Med*. 2021;49(4):598-622. doi:10.1097/CCM.0000000000004895
115. Hua A, O'Gallagher K, Sado D, Byrne J. Life-threatening cardiac tamponade complicating myo-pericarditis in COVID-19. *Eur Heart J*. 2020;41(22):2130. doi:10.1093/eurheartj/ehaa253
116. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 2020;5(7):811-818. doi:10.1001/jamacardio.2020.1017
117. Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, et al. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(17):2071-2081. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1043
118. Violi F, Ceccarelli G, Cangemi R, et al. Arterial and venous thrombosis in coronavirus 2019 disease (Covid-19): relationship with mortality. *Intern Emerg Med*. 2021;16(5):1231-1237. doi:10.1007/s11739-020-02621-8
119. Tan L, Wang Q, Zhang D, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):33. doi:10.1038/s41392-020-0148-4
120. Amgalan A, Othman M. Exploring possible mechanisms for COVID-19 induced thrombocytopenia: Unanswered questions. *J Thromb Haemost JTH*. 2020;18(6):1514-1516. doi:10.1111/jth.14832
121. Abou-Ismaïl MY, Diamond A, Kapoor S, Arafah Y, Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb Res*. 2020;194:101-115. doi:10.1016/j.thromres.2020.06.029
122. Ni W, Yang X, Yang D, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care Lond Engl*. 2020;24(1):422. doi:10.1186/s13054-020-03120-0
123. Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol*. 2020;77(8):1018-1027. doi:10.1001/jamaneurol.2020.2065
124. Patel KP, Patel PA, Vunnam RR, et al. Gastrointestinal, hepatobiliary, and pancreatic manifestations of COVID-19. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2020;128:104386. doi:10.1016/j.jcv.2020.104386
125. Aleem A, Shah H. Gastrointestinal And Hepatic Manifestations Of Coronavirus (COVID-19). In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed October 28, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570562/>
126. Gabarre P, Dumas G, Dupont T, Darmon M, Azoulay E, Zafrani L. Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med*. 2020;46(7):1339-1348. doi:10.1007/s00134-020-06153-9
127. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-582. doi:10.7326/M20-0504
128. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2020;25(10). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180
129. Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*.

2020;94:154-155. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.020

130. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;173(5):362-367. doi:10.7326/M20-3012

131. Ma Q, Liu J, Liu Q, et al. Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among the Tested Population and Individuals With Confirmed COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2021;4(12):e2137257. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.37257

132. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526-2533. doi:10.1001/jama.2012.5669

133. Ferrando C, Suarez-Sipmann F, Mellado-Artigas R, et al. Clinical features, ventilatory management, and outcome of ARDS caused by COVID-19 are similar to other causes of ARDS. *Intensive Care Med.* 2020;46(12):2200-2211. doi:10.1007/s00134-020-06192-2

134. Update to living systematic review on prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19. *BMJ.* 2022;378:o2009. doi:10.1136/bmj.o2009

135. Lombardi Y, Azoyan L, Szychowiak P, et al. External validation of prognostic scores for COVID-19: a multicenter cohort study of patients hospitalized in Greater Paris University Hospitals. *Intensive Care Med.* 2021;47(12):1426-1439. doi:10.1007/s00134-021-06524-w

136. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5

137. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020;323(13):1239-1242. doi:10.1001/jama.2020.2648

138. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(6):669-677. doi:10.1016/S1473-3099(20)30243-7

139. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA.* 2020;323(20):2052-2059. doi:10.1001/jama.2020.6775

140. Onder G, Rezza G, Brusaferro S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA.* 2020;323(18):1775-1776. doi:10.1001/jama.2020.4683

141. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430-436. doi:10.1038/s41586-020-2521-4

142. CDC COVID-19 Response Team. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - United States, February 12-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(12):343-346. doi:10.15585/mmwr.mm6912e2

143. Jw C, M V, Bl C, et al. Clinical Outcomes in Young US Adults Hospitalized With COVID-19. *JAMA Intern Med.* 2020;181(3). doi:10.1001/jamainternmed.2020.5313

144. Petrilli CM, Jones SA, Yang J, et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ.* 2020;369:m1966. doi:10.1136/bmj.m1966

145. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3

146. Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 - United States, February 12-March 28, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(13). doi:10.15585/mmwr.mm6913e2

147. Harrison SL, Fazio-Eynullayeva E, Lane DA, Underhill P, Lip GYH. Comorbidities associated with mortality in 31,461 adults with COVID-19 in the United States: A federated electronic medical record analysis. *PLoS Med.* 2020;17(9):e1003321. doi:10.1371/journal.pmed.1003321

148. Dai M, Liu D, Liu M, et al. Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov.* 2020;10(6):783-791. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0422
149. Lighter J, Phillips M, Hochman S, et al. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2020;71(15):896-897. doi:10.1093/cid/ciaa415
150. Lowe KE, Zein J, Hatipoglu U, Attaway A. Association of Smoking and Cumulative Pack-Year Exposure With COVID-19 Outcomes in the Cleveland Clinic COVID-19 Registry. *JAMA Intern Med.* 2021;181(5):709-711. doi:10.1001/jamainternmed.2020.8360
151. McMichael TM, Currie DW, Clark S, et al. Epidemiology of Covid-19 in a Long-Term Care Facility in King County, Washington. *N Engl J Med.* 2020;382(21):2005-2011. doi:10.1056/NEJMoa2005412
152. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(24):759-765. doi:10.15585/mmwr.mm6924e2
153. Brawner CA, Ehrman JK, Bole S, et al. Inverse Relationship of Maximal Exercise Capacity to Hospitalization Secondary to Coronavirus Disease 2019. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(1):32-39. doi:10.1016/j.mayocp.2020.10.003
154. Sallis R, Young DR, Tartof SY, et al. Physical inactivity is associated with a higher risk for severe COVID-19 outcomes: a study in 48 440 adult patients. *Br J Sports Med.* 2021;55(19):1099-1105. doi:10.1136/bjsports-2021-104080
155. Steenkamp L, Saggars RT, Bandini R, et al. Small steps, strong shield: directly measured, moderate physical activity in 65 361 adults is associated with significant protective effects from severe COVID-19 outcomes. *Br J Sports Med.* 2022;56(10):568-576. doi:10.1136/bjsports-2021-105159
156. Lee SW, Lee J, Moon SY, et al. Physical activity and the risk of SARS-CoV-2 infection, severe COVID-19 illness and COVID-19 related mortality in South Korea: a nationwide cohort study. *Br J Sports Med.* 2022;56(16):901-912. doi:10.1136/bjsports-2021-104203
157. Kragholm K, Andersen MP, Gerds TA, et al. Association Between Male Sex and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-A Danish Nationwide, Register-based Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2021;73(11):e4025-e4030. doi:10.1093/cid/ciaa924
158. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun.* 2020;11(1):6317. doi:10.1038/s41467-020-19741-6
159. Price-Haywood EG, Burton J, Fort D, Seoane L. Hospitalization and Mortality among Black Patients and White Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;382(26):2534-2543. doi:10.1056/NEJMsa2011686
160. Moore JT, Ricaldi JN, Rose CE, et al. Disparities in Incidence of COVID-19 Among Underrepresented Racial/Ethnic Groups in Counties Identified as Hotspots During June 5-18, 2020 - 22 States, February-June 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(33):1122-1126. doi:10.15585/mmwr.mm6933e1
161. Gold JAW, Rossen LM, Ahmad FB, et al. Race, Ethnicity, and Age Trends in Persons Who Died from COVID-19 - United States, May-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(42):1517-1521. doi:10.15585/mmwr.mm6942e1
162. Asch DA, Islam MN, Sheils NE, et al. Patient and Hospital Factors Associated With Differences in Mortality Rates Among Black and White US Medicare Beneficiaries Hospitalized With COVID-19 Infection. *JAMA Netw Open.* 2021;4(6):e2112842. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.12842
163. Kabarriti R, Brodin NP, Maron MI, et al. Association of Race and Ethnicity With Comorbidities and Survival Among Patients With COVID-19 at an Urban Medical Center in New York. *JAMA Netw Open.* 2020;3(9):e2019795. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.19795
164. Muñoz-Price LS, Nattinger AB, Rivera F, et al. Racial Disparities in Incidence and Outcomes Among Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open.* 2020;3(9):e2021892.

doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.21892

165. Marquez N, Ward JA, Parish K, Saloner B, Dolovich S. COVID-19 Incidence and Mortality in Federal and State Prisons Compared With the US Population, April 5, 2020, to April 3, 2021. *JAMA*. 2021;326(18):1865-1867. doi:10.1001/jama.2021.17575

166. Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020;180(7):934-943. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994

167. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020;5(7):802-810. doi:10.1001/jamacardio.2020.0950

168. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636-1643. doi:10.1038/s41591-020-1051-9

169. Maghbooli Z, Sahraian MA, Ebrahimi M, et al. Vitamin D sufficiency, a serum 25-hydroxyvitamin D at least 30 ng/mL reduced risk for adverse clinical outcomes in patients with COVID-19 infection. *PLoS One*. 2020;15(9):e0239799. doi:10.1371/journal.pone.0239799

170. Munshi R, Hussein MH, Toraih EA, et al. Vitamin D insufficiency as a potential culprit in critical COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021;93(2):733-740. doi:10.1002/jmv.26360

171. Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):656-657. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2

172. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021;73(11):e4197-e4205. doi:10.1093/cid/ciaa851

173. Yilmaz A, Marklund E, Andersson M, et al. Upper Respiratory Tract Levels of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA and Duration of Viral RNA Shedding Do Not Differ Between Patients With Mild and Severe/Critical Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis*. 2021;223(1):15-18. doi:10.1093/infdis/jiaa632

174. Xu D, Zhou F, Sun W, et al. Relationship Between Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Nucleic Acid and Organ Damage in Coronavirus 2019 Patients: A Cohort Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021;73(1):68-75. doi:10.1093/cid/ciaa1085

175. Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, et al. High Frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and Association With Severe Disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021;72(9):e291-e295. doi:10.1093/cid/ciaa1054

176. Niemi MEK, Daly MJ, Ganna A. The human genetic epidemiology of COVID-19. *Nat Rev Genet*. 2022;23(9):533-546. doi:10.1038/s41576-022-00478-5

177. Kousathanas A, Pairo-Castineira E, Rawlik K, et al. Whole-genome sequencing reveals host factors underlying critical COVID-19. *Nature*. 2022;607(7917):97-103. doi:10.1038/s41586-022-04576-6

178. Ishak A, Mehendale M, AlRawashdeh MM, et al. The association of COVID-19 severity and susceptibility and genetic risk factors: A systematic review of the literature. *Gene*. 2022;836:146674. doi:10.1016/j.gene.2022.146674

179. Menni C, Valdes AM, Polidori L, et al. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *Lancet Lond Engl*. 2022;399(10335):1618-1624. doi:10.1016/S0140-6736(22)00327-0

180. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032

181. Zayet S, Kadiane-Oussou NJ, Lepiller Q, et al. Clinical features of COVID-19 and influenza: a comparative study on Nord Franche-Comte cluster. *Microbes Infect*. 2020;22(9):481-488. doi:10.1016/j.micinf.2020.05.016

182. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;7:CD013665. doi:10.1002/14651858.CD013665

183. Pan F, Ye T, Sun P, et al. Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. 2020;295(3):715-721. doi:10.1148/radiol.2020200370
184. Shi H, Han X, Jiang N, et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):425-434. doi:10.1016/S1473-3099(20)30086-4
185. Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, et al. Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *N Engl J Med*. 2020;382(24):2372-2374. doi:10.1056/NEJMc2010419
186. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, et al. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020;71(15):889-890. doi:10.1093/cid/ciaa330
187. Chung TWH, Sridhar S, Zhang AJ, et al. Olfactory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 Patients: Observational Cohort Study and Systematic Review. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7(6):ofaa199. doi:10.1093/ofid/ofaa199
188. Spinato G, Fabbri C, Polesel J, et al. Alterations in Smell or Taste in Mildly Symptomatic Outpatients With SARS-CoV-2 Infection. *JAMA*. 2020;323(20):2089-2090. doi:10.1001/jama.2020.6771
189. Tan BKJ, Han R, Zhao JJ, et al. Prognosis and persistence of smell and taste dysfunction in patients with covid-19: meta-analysis with parametric cure modelling of recovery curves. *BMJ*. 2022;378:e069503. doi:10.1136/bmj-2021-069503
190. Jin X, Lian JS, Hu JH, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut*. 2020;69(6):1002-1009. doi:10.1136/gutjnl-2020-320926
191. Galván Casas C, Català A, Carretero Hernández G, et al. Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *Br J Dermatol*. 2020;183(1):71-77. doi:10.1111/bjd.19163
192. de Masson A, Bouaziz JD, Sulimovic L, et al. Chilblains is a common cutaneous finding during the COVID-19 pandemic: A retrospective nationwide study from France. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(2):667-670. doi:10.1016/j.jaad.2020.04.161
193. Annweiler C, Sacco G, Salles N, et al. National French Survey of Coronavirus Disease (COVID-19) Symptoms in People Aged 70 and Over. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021;72(3):490-494. doi:10.1093/cid/ciaa792
194. Cohen PA, Hall LE, John JN, Rapoport AB. The Early Natural History of SARS-CoV-2 Infection: Clinical Observations From an Urban, Ambulatory COVID-19 Clinic. *Mayo Clin Proc*. 2020;95(6):1124-1126. doi:10.1016/j.mayocp.2020.04.010
195. Chen T, Wu D, Chen H, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ*. 2020;368:m1091. doi:10.1136/bmj.m1091
196. Arentz M, Yim E, Klaff L, et al. Characteristics and Outcomes of 21 Critically Ill Patients With COVID-19 in Washington State. *JAMA*. 2020;323(16):1612-1614. doi:10.1001/jama.2020.4326
197. Cao J, Tu WJ, Cheng W, et al. Clinical Features and Short-term Outcomes of 102 Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020;71(15):748-755. doi:10.1093/cid/ciaa243
198. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020;191:145-147. doi:10.1016/j.thromres.2020.04.013
199. Helms J, Tacquard C, Severac F, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1089-1098. doi:10.1007/s00134-020-06062-x
200. Moll M, Zon RL, Sylvester KW, et al. VTE in ICU Patients With COVID-19. *Chest*. 2020;158(5):2130-2135. doi:10.1016/j.chest.2020.07.031
201. Y Z, M X, S Z, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(17). doi:10.1056/NEJMc2007575
202. Merkler AE, Parikh NS, Mir S, et al. Risk of Ischemic Stroke in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) vs Patients With Influenza. *JAMA Neurol*. Published

online July 2, 2020. doi:10.1001/jamaneurol.2020.2730

203. Liotta EM, Batra A, Clark JR, et al. Frequent neurologic manifestations and encephalopathy-associated morbidity in Covid-19 patients. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(11):2221-2230. doi:10.1002/acn3.51210
204. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10229):1033-1034. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
205. Wang C, Kang K, Gao Y, et al. Cytokine Levels in the Body Fluids of a Patient With COVID-19 and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Case Report. *Ann Intern Med.* 2020;173(6):499-501. doi:10.7326/L20-0354
206. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med.* 2020;8(12):1233-1244. doi:10.1016/S2213-2600(20)30404-5
207. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, et al. Guillain-Barré Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020;382(26):2574-2576. doi:10.1056/NEJMc2009191
208. Patel P, DeCuir J, Abrams J, Campbell AP, Godfred-Cato S, Belay ED. Clinical Characteristics of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults: A Systematic Review. *JAMA Netw Open.* 2021;4(9):e2126456. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.26456
209. Morris SB, Schwartz NG, Patel P, et al. Case Series of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults Associated with SARS-CoV-2 Infection - United Kingdom and United States, March-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(40):1450-1456. doi:10.15585/mmwr.mm6940e1
210. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2020;71(9):2459-2468. doi:10.1093/cid/ciaa530
211. Sepulveda J, Westblade LF, Whittier S, et al. Bacteremia and Blood Culture Utilization during COVID-19 Surge in New York City. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):e00875-20. doi:10.1128/JCM.00875-20
212. Cj K, Th M, D D, et al. Characterization of Bacterial and Fungal Infections in Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 and Factors Associated With Health Care-Associated Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(6). doi:10.1093/ofid/ofab201
213. Kurra N, Woodard PI, Gandrakota N, et al. Opportunistic Infections in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus.* 2022;14(3):e23687. doi:10.7759/cureus.23687
214. Musuuzza JS, Watson L, Parmasad V, Putman-Buehler N, Christensen L, Safdar N. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2021;16(5):e0251170. doi:10.1371/journal.pone.0251170
215. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses.* 2020;63(6):528-534. doi:10.1111/myc.13096
216. van Arkel ALE, Rijpstra TA, Belderbos HNA, van Wijngaarden P, Verweij PE, Bentvelsen RG. COVID-19-associated Pulmonary Aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(1):132-135. doi:10.1164/rccm.202004-1038LE
217. Blaize M, Mayaux J, Nabet C, et al. Fatal Invasive Aspergillosis and Coronavirus Disease in an Immunocompetent Patient. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1636-1637. doi:10.3201/eid2607.201603
218. Joshi S, Telang R, Tambe M, et al. Outbreak of Mucormycosis in Coronavirus Disease Patients, Pune, India. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(1):1-8. doi:10.3201/eid2801.211636
219. Chen C, Hauptert SR, Zimmermann L, Shi X, Fritsche LG, Mukherjee B. Global Prevalence of Post-Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Condition or Long COVID: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Infect Dis.* 2022;226(9):1593-1607. doi:10.1093/infdis/jiac136
220. Zhu J, Zhong Z, Ji P, et al. Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: a meta-analysis. *Fam Med Community Health.* 2020;8(2):e000406. doi:10.1136/fmch-2020-000406
221. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology,

- Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020;324(8):782-793. doi:10.1001/jama.2020.12839
222. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1757-1766. doi:10.1056/NEJMcp2009249
223. Wong HYF, Lam HYS, Fong AHT, et al. Frequency and Distribution of Chest Radiographic Findings in Patients Positive for COVID-19. *Radiology*. 2020;296(2):E72-E78. doi:10.1148/radiol.2020201160
224. Miró Ó, Llorens P, Jiménez S, et al. Frequency, Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcomes of Spontaneous Pneumothorax in Patients With Coronavirus Disease 2019: A Case-Control, Emergency Medicine-Based Multicenter Study. *Chest*. 2021;159(3):1241-1255. doi:10.1016/j.chest.2020.11.013
225. ACR Recommendations for the use of Chest Radiography and Computed Tomography (CT) for Suspected COVID-19 Infection. Accessed November 7, 2022. <https://www.acr.org/Advocacy-and-Economics/ACR-Position-Statements/Recommendations-for-Chest-Radiography-and-CT-for-Suspected-COVID19-Infection>
226. Simpson S, Kay FU, Abbara S, et al. Radiological Society of North America Expert Consensus Document on Reporting Chest CT Findings Related to COVID-19: Endorsed by the Society of Thoracic Radiology, the American College of Radiology, and RSNA. *Radiol Cardiothorac Imaging*. 2020;2(2):e200152. doi:10.1148/ryct.2020200152
227. Zhao W, Zhong Z, Xie X, Yu Q, Liu J. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study. *AJR Am J Roentgenol*. 2020;214(5):1072-1077. doi:10.2214/AJR.20.22976
228. Ojha V, Mani A, Pandey NN, Sharma S, Kumar S. CT in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review of chest CT findings in 4410 adult patients. *Eur Radiol*. 2020;30(11):6129-6138. doi:10.1007/s00330-020-06975-7
229. Bao C, Liu X, Zhang H, Li Y, Liu J. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) CT Findings: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Am Coll Radiol JACR*. 2020;17(6):701-709. doi:10.1016/j.jacr.2020.03.006
230. Altmayer S, Zanon M, Pacini GS, et al. Comparison of the computed tomography findings in COVID-19 and other viral pneumonia in immunocompetent adults: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol*. 2020;30(12):6485-6496. doi:10.1007/s00330-020-07018-x
231. Islam N, Salameh JP, Leeflang MM, et al. Thoracic imaging tests for the diagnosis of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;11:CD013639. doi:10.1002/14651858.CD013639.pub3
232. Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology*. 2020;296(2):E32-E40. doi:10.1148/radiol.2020200642
233. Bai HX, Hsieh B, Xiong Z, et al. Performance of Radiologists in Differentiating COVID-19 from Non-COVID-19 Viral Pneumonia at Chest CT. *Radiology*. 2020;296(2):E46-E54. doi:10.1148/radiol.2020200823
234. Abrams ER, Rose G, Fields JM, Esener D. Point-of-Care Ultrasound in the Evaluation of COVID-19. *J Emerg Med*. 2020;59(3):403-408. doi:10.1016/j.jemermed.2020.06.032
235. Peng QY, Wang XT, Zhang LN, Chinese Critical Care Ultrasound Study Group (CCUSG). Findings of lung ultrasonography of novel corona virus pneumonia during the 2019-2020 epidemic. *Intensive Care Med*. 2020;46(5):849-850. doi:10.1007/s00134-020-05996-6
236. Singh AK, Singh A, Singh R, Misra A. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes Metab Syndr*. 2021;15(6):102329. doi:10.1016/j.dsx.2021.102329
237. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med*. 2022;386(6):509-520. doi:10.1056/NEJMoa2116044
238. Mahase E. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ*. 2021;375:n2713. doi:10.1136/bmj.n2713
239. Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the

- recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020;30(3):269-271. doi:10.1038/s41422-020-0282-0
240. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med.* 2020;383(19):1813-1826. doi:10.1056/NEJMoa2007764
241. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(19):1827-1837. doi:10.1056/NEJMoa2015301
242. Spinner CD, Gottlieb RL, Criner GJ, et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2020;324(11):1048-1057. doi:10.1001/jama.2020.16349
243. Zhang R, Mylonakis E. In inpatients with COVID-19, none of remdesivir, hydroxychloroquine, lopinavir, or interferon β -1a differed from standard care for in-hospital mortality. *Ann Intern Med.* 2021;174(2):JC17. doi:10.7326/ACPJ202102160-017
244. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* Published online December 22, 2021;NEJMoa2116846. doi:10.1056/NEJMoa2116846
245. Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):229-237. doi:10.1056/NEJMoa2029849
246. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;385(23):e81. doi:10.1056/NEJMoa2108163
247. Baum A, Ajithdoss D, Copin R, et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science.* 2020;370(6520):1110-1115. doi:10.1126/science.abe2402
248. Wilhelm A, Widera M, Grikscheit K, et al. Reduced Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Variant by Vaccine Sera and monoclonal antibodies. Published online December 8, 2021;2021.12.07.21267432. doi:10.1101/2021.12.07.21267432
249. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, et al. Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination With Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;325(7):632-644. doi:10.1001/jama.2021.0202
250. Wang P, Nair MS, Liu L, et al. Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7. *BioRxiv Prepr Serv Biol.* Published online February 12, 2021;2021.01.25.428137. doi:10.1101/2021.01.25.428137
251. Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, et al. Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab-Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med.* 2022;386(23):2188-2200. doi:10.1056/NEJMoa2116620
252. Al Jurdi A, Morena L, Cote M, Bethea E, Azzi J, Riella LV. Tixagevimab/cilgavimab pre-exposure prophylaxis is associated with lower breakthrough infection risk in vaccinated solid organ transplant recipients during the omicron wave. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* Published online June 21, 2022. doi:10.1111/ajt.17128
253. Cao Y, Wang J, Jian F, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature.* 2022;602(7898):657-663. doi:10.1038/s41586-021-04385-3
254. VanBlargan LA, Errico JM, Halfmann PJ, et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat Med.* 2022;28(3):490-495. doi:10.1038/s41591-021-01678-y
255. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, et al. Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Covid-19 Omicron Variant. *N Engl J Med.* 2022;386(10):995-998. doi:10.1056/NEJMc2119407
256. Bruel T, Hadjadj J, Maes P, et al. Serum neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sublineages BA.1 and BA.2 in patients receiving monoclonal antibodies. *Nat Med.* 2022;28(6):1297-1302. doi:10.1038/s41591-022-01792-5
257. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693-704. doi:10.1056/NEJMoa2021436
258. Huet T, Beaussier H, Voisin O, et al. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort

- study. *Lancet Rheumatol.* 2020;2(7):e393-e400. doi:10.1016/S2665-9913(20)30164-8
259. Rosas IO, Bräu N, Waters M, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med.* 2021;384(16):1503-1516. doi:10.1056/NEJMoa2028700
260. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(24):2333-2344. doi:10.1056/NEJMoa2028836
261. REMAP-CAP Investigators, Gordon AC, Mouncey PR, et al. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(16):1491-1502. doi:10.1056/NEJMoa2100433
262. Lescure FX, Honda H, Fowler RA, et al. Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(5):522-532. doi:10.1016/S2213-2600(21)00099-0
263. Richardson P, Griffin I, Tucker C, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10223):e30-e31. doi:10.1016/S0140-6736(20)30304-4
264. Stebbing J, Phelan A, Griffin I, et al. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(4):400-402. doi:10.1016/S1473-3099(20)30132-8
265. Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, et al. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(9):795-807. doi:10.1056/NEJMoa2031994
266. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-2615. doi:10.1056/NEJMoa2034577
267. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384(5):403-416. doi:10.1056/NEJMoa2035389
268. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(23):2187-2201. doi:10.1056/NEJMoa2101544
269. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet Lond Engl.* 2021;397(10269):99-111. doi:10.1016/S0140-6736(20)32661-1
270. Shinde V, Bhikha S, Hoosain Z, et al. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N Engl J Med.* 2021;384(20):1899-1909. doi:10.1056/NEJMoa2103055
271. Dunkle LM, Kotloff KL, Gay CL, et al. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico. *N Engl J Med.* 2022;386(6):531-543. doi:10.1056/NEJMoa2116185
272. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning Immunity after the BNT162b2 Vaccine in Israel. *N Engl J Med.* 2021;385(24):e85. doi:10.1056/NEJMoa2114228
273. Saiag E, Goldshmidt H, Sprecher E, Ben-Ami R, Bomze D. Immunogenicity of a BNT162b2 vaccine booster in health-care workers. *Lancet Microbe.* 2021;2(12):e650. doi:10.1016/S2666-5247(21)00272-X
274. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2021;47(1):60-73. doi:10.1007/s00134-020-06294-x
275. Li J, Huang DQ, Zou B, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol.* 2021;93(3):1449-1458. doi:10.1002/jmv.26424
276. Ziehr DR, Alladina J, Petri CR, et al. Respiratory Pathophysiology of Mechanically Ventilated Patients with COVID-19: A Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201(12):1560-1564. doi:10.1164/rccm.202004-1163LE
277. Grasselli G, Greco M, Zanella A, et al. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med.* 2020;180(10):1345-1355. doi:10.1001/jamainternmed.2020.3539

278. Chew MS, Blixt PJ, Åhman R, et al. National outcomes and characteristics of patients admitted to Swedish intensive care units for COVID-19: A registry-based cohort study. *Eur J Anaesthesiol.* 2021;38(4):335-343. doi:10.1097/EJA.0000000000001459
279. Mw S, Aj A, Ak S, et al. Comparing Clinical Features and Outcomes in Mechanically Ventilated Patients with COVID-19 and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Am Thorac Soc.* 2021;18(11). doi:10.1513/AnnalsATS.202008-1076OC
280. Kurtz P, Bastos LSL, Dantas LF, et al. Evolving changes in mortality of 13,301 critically ill adult patients with COVID-19 over 8 months. *Intensive Care Med.* 2021;47(5):538-548. doi:10.1007/s00134-021-06388-0
281. Armstrong RA, Kane AD, Cook TM. Outcomes from intensive care in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Anaesthesia.* 2020;75(10):1340-1349. doi:10.1111/anae.15201
282. Doidge JC, Gould DW, Ferrando-Vivas P, et al. Trends in Intensive Care for Patients with COVID-19 in England, Wales, and Northern Ireland. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;203(5):565-574. doi:10.1164/rccm.202008-3212OC
283. Docherty AB, Mulholland RH, Lone NI, et al. Changes in in-hospital mortality in the first wave of COVID-19: a multicentre prospective observational cohort study using the WHO Clinical Characterisation Protocol UK. *Lancet Respir Med.* 2021;9(7):773-785. doi:10.1016/S2213-2600(21)00175-2
284. Vahidy FS, Drews AL, Masud FN, et al. Characteristics and Outcomes of COVID-19 Patients During Initial Peak and Resurgence in the Houston Metropolitan Area. *JAMA.* 2020;324(10):998-1000. doi:10.1001/jama.2020.15301
285. Anesi GL, Jablonski J, Harhay MO, et al. Characteristics, Outcomes, and Trends of Patients With COVID-19-Related Critical Illness at a Learning Health System in the United States. *Ann Intern Med.* 2021;174(5):613-621. doi:10.7326/M20-5327
286. Auld SC, Harrington KRV, Adelman MW, et al. Trends in ICU Mortality From Coronavirus Disease 2019: A Tale of Three Surges. *Crit Care Med.* 2022;50(2):245-255. doi:10.1097/CCM.0000000000005185
287. Gupta S, Hayek SS, Wang W, et al. Factors Associated With Death in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019 in the US. *JAMA Intern Med.* 2020;180(11):1436-1447. doi:10.1001/jamainternmed.2020.3596
288. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA.* 2020;323(16):1574-1581. doi:10.1001/jama.2020.5394
289. Choron RL, Butts CA, Bargoud C, et al. Fever in the ICU: A Predictor of Mortality in Mechanically Ventilated COVID-19 Patients. *J Intensive Care Med.* 2021;36(4):484-493. doi:10.1177/0885066620979622
290. African COVID-19 Critical Care Outcomes Study (ACCCOS) Investigators. Patient care and clinical outcomes for patients with COVID-19 infection admitted to African high-care or intensive care units (ACCCOS): a multicentre, prospective, observational cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2021;397(10288):1885-1894. doi:10.1016/S0140-6736(21)00441-4
291. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):475-481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5
292. Raschke RA, Agarwal S, Rangan P, Heise CW, Curry SC. Discriminant Accuracy of the SOFA Score for Determining the Probable Mortality of Patients With COVID-19 Pneumonia Requiring Mechanical Ventilation. *JAMA.* 2021;325(14):1469-1470. doi:10.1001/jama.2021.1545
293. Keller MB, Wang J, Nason M, Warner S, Follmann D, Kadri SS. Preintubation Sequential Organ Failure Assessment Score for Predicting COVID-19 Mortality: External Validation Using Electronic Health Record From 86 U.S. Healthcare Systems to Appraise Current Ventilator Triage Algorithms. *Crit Care Med.* 2022;50(7):1051-1062. doi:10.1097/CCM.0000000000005534
294. Bain W, Yang H, Shah FA, et al. COVID-19 versus Non-COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome: Comparison of Demographics, Physiologic Parameters, Inflammatory

- Biomarkers, and Clinical Outcomes. *Ann Am Thorac Soc.* 2021;18(7):1202-1210. doi:10.1513/AnnalsATS.202008-1026OC
295. Saad M, Laghi FA, Brofman J, Undevia NS, Shaikh H. Long-Term Acute Care Hospital Outcomes of Mechanically Ventilated Patients With Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med.* 2022;50(2):256-263. doi:10.1097/CCM.0000000000005193
296. Kwak PE, Connors JR, Benedict PA, et al. Early Outcomes From Early Tracheostomy for Patients With COVID-19. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg.* 2021;147(3):239-244. doi:10.1001/jamaoto.2020.4837
297. Tomazini BM, Maia IS, Cavalcanti AB, et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2020;324(13):1307-1316. doi:10.1001/jama.2020.17021
298. Kaafarani HMA, El Moheb M, Hwabejire JO, et al. Gastrointestinal Complications in Critically Ill Patients With COVID-19. *Ann Surg.* 2020;272(2):e61-e62. doi:10.1097/SLA.0000000000004004
299. Martinez-Rojas MA, Vega-Vega O, Bobadilla NA. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;318(6):F1454-F1462. doi:10.1152/ajprenal.00160.2020
300. Zhou X, Cheng Z, Luo L, et al. Incidence and impact of disseminated intravascular coagulation in COVID-19 a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res.* 2021;201:23-29. doi:10.1016/j.thromres.2021.02.010
301. Huang C, Huang L, Wang Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2021;397(10270):220-232. doi:10.1016/S0140-6736(20)32656-8
302. Taquet M, Geddes JR, Husain M, Luciano S, Harrison PJ. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry.* 2021;8(5):416-427. doi:10.1016/S2215-0366(21)00084-5
303. Limborg MT, Heeb P. Special Issue: Coevolution of Hosts and Their Microbiome. *Genes.* 2018;9(11):549. doi:10.3390/genes9110549
304. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc.* 2015;74(1):13-22. doi:10.1017/S0029665114001463
305. Shaik L, Kashyap R, Thotamgari SR, Singh R, Khanna S. Gut-Brain Axis and its Neuro-Psychiatric Effects: A Narrative Review. *Cureus.* 12(10):e11131. doi:10.7759/cureus.11131
306. Queiroz SAL, Ton AMM, Pereira TMC, et al. The Gut Microbiota-Brain Axis: A New Frontier on Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry.* 2022;13:872594. doi:10.3389/fpsyt.2022.872594
307. Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology Baltim Md.* 2014;59(1):328-339. doi:10.1002/hep.26494
308. Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2014;25(4):657-670. doi:10.1681/ASN.2013080905
309. Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12 Suppl 2:S150-156. doi:10.1513/AnnalsATS.201503-133AW
310. Thomas S, Izard J, Walsh E, et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res.* 2017;77(8):1783-1812. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2929
311. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* 2019;7(1):E14. doi:10.3390/microorganisms7010014
312. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65. doi:10.1038/nature08821
313. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci.*

- 2011;108(supplement_1):4586-4591. doi:10.1073/pnas.1000097107
314. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351):327-336. doi:10.1038/nature10213
315. Guh AY, Kuty PK. Clostridioides difficile Infection. *Ann Intern Med*. 2018;169(7):ITC49-ITC64. doi:10.7326/AITC201810020
316. Abid MB. Could the menagerie of the gut microbiome really cure cancer? Hope or hype. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):92. doi:10.1186/s40425-019-0561-9
317. M G, Z L, H Y, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*. 2020;51. doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.051
318. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol*. 2019;71(6):1216-1228. doi:10.1016/j.jhep.2019.08.005
319. Tang WHW, Bäckhed F, Landmesser U, Hazen SL. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(16):2089-2105. doi:10.1016/j.jacc.2019.03.024
320. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 2017;595(2):489-503. doi:10.1113/JP273106
321. Liang S, Wu X, Hu X, Wang T, Jin F. Recognizing Depression from the Microbiota–Gut–Brain Axis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1592. doi:10.3390/ijms19061592
322. Gu J, Gong E, Zhang B, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med*. 2005;202(3):415-424. doi:10.1084/jem.20050828
323. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol*. 2016;1(10):16113. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.113
324. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(13):5354-5359. doi:10.1073/pnas.1019378108
325. Deriu E, Boxx GM, He X, et al. Influenza Virus Affects Intestinal Microbiota and Secondary Salmonella Infection in the Gut through Type I Interferons. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):e1005572. doi:10.1371/journal.ppat.1005572
326. Wang J, Li F, Wei H, Lian ZX, Sun R, Tian Z. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *J Exp Med*. 2014;211(12):2397-2410. doi:10.1084/jem.20140625
327. Bartley JM, Zhou X, Kuchel GA, Weinstock GM, Haynes L. Impact of Age, Caloric Restriction, and Influenza Infection on Mouse Gut Microbiome: An Exploratory Study of the Role of Age-Related Microbiome Changes on Influenza Responses. *Front Immunol*. 2017;8:1164. doi:10.3389/fimmu.2017.01164
328. Yildiz S, Mazel-Sanchez B, Kandasamy M, Manicassamy B, Schmolke M. Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. *Microbiome*. 2018;6(1):9. doi:10.1186/s40168-017-0386-z
329. Groves HT, Cuthbertson L, James P, Moffatt MF, Cox MJ, Tregoning JS. Respiratory Disease following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota. *Front Immunol*. 2018;9:182. doi:10.3389/fimmu.2018.00182
330. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1224-1231. doi:10.1164/rccm.201302-0341OC
331. Gu L, Deng H, Ren Z, et al. Dynamic Changes in the Microbiome and Mucosal Immune Microenvironment of the Lower Respiratory Tract by Influenza Virus Infection. *Front Microbiol*. 2019;10. Accessed November 9, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02491>
332. Zhang H, Li HB, Lyu JR, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2020;96:19-24. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.027
333. Perlot T, Penninger JM. ACE2 - from the renin-angiotensin system to gut microbiota

- and malnutrition. *Microbes Infect.* 2013;15(13):866-873. doi:10.1016/j.micinf.2013.08.003
334. Park SK, Lee CW, Park DI, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Fecal Samples From Patients With Asymptomatic and Mild COVID-19 in Korea. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Published online 2021:1387-1394.e2.
335. Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2020;92(7):833-840. doi:10.1002/jmv.25825
336. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020;369(6499):50-54. doi:10.1126/science.abc1669
337. Redd WD, Zhou JC, Hathorn KE, et al. Prevalence and Characteristics of Gastrointestinal Symptoms in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in the United States: A Multicenter Cohort Study. *Gastroenterology.* 2020;159(2):765-767.e2. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.045
338. Zhang T, Cui X, Zhao X, et al. Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia. *J Med Virol.* 2020;92(7):909-914. doi:10.1002/jmv.25795
339. Tang A, Tong Z dong, Wang H ling, et al. Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China - Volume 26, Number 6—June 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi:10.3201/eid2606.200301
340. Pan L, Mu M, Yang P, et al. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2020;115(5):766-773. doi:10.14309/ajg.0000000000000620
341. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater.* 2021;20(5):593-605. doi:10.1038/s41563-020-00906-z
342. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut.* 2021;70(4):698-706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020
343. Zuo T, Liu Q, Zhang F, et al. Temporal landscape of human gut RNA and DNA virome in SARS-CoV-2 infection and severity. *Microbiome.* 2021;9(1):91. doi:10.1186/s40168-021-01008-x
344. Zuo T, Zhan H, Zhang F, et al. Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology.* 2020;159(4):1302-1310.e5. doi:10.1053/j.gastro.2020.06.048
345. Bingula R, Filaire M, Radosevic-Robin N, et al. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J Oncol.* 2017;2017:e5035371. doi:10.1155/2017/5035371
346. Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications. *Virus Res.* 2020;285:198018. doi:10.1016/j.virusres.2020.198018
347. Xu K, Cai H, Shen Y, et al. [Management of COVID-19: the Zhejiang experience]. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J Zhejiang Univ Med Sci.* 2020;49(2):147-157. doi:10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.02
348. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 2005;11(8):875-879. doi:10.1038/nm1267
349. Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature.* 2012;487(7408):477-481. doi:10.1038/nature11228
350. Zhao Y, Chen F, Wu W, et al. GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):752-762. doi:10.1038/mi.2017.118
351. Liévin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):315-337. doi:10.1128/CMR.19.2.315-337.2006
352. Elsayed S, Zhang K. Human Infection Caused by *Clostridium hathewayi*. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(11):1950-1952. doi:10.3201/eid1011.040006
353. Forrester JD, Spain DA. *Clostridium ramosum* bacteremia: case report and literature review. *Surg Infect.* 2014;15(3):343-346. doi:10.1089/sur.2012.240
354. Yang T, Chakraborty S, Saha P, et al. Gnotobiotic Rats Reveal That Gut Microbiota

- Regulates Colonic mRNA of Ace2, the Receptor for SARS-CoV-2 Infectivity. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2020;76(1):e1-e3. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15360
355. Gu S, Chen Y, Wu Z, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis*. 2020;71(10):2669-2678. doi:10.1093/cid/ciaa709
356. Zuo T, Liu Q, Zhang F, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*. 2021;70(2):276-284. doi:10.1136/gutjnl-2020-322294
357. Sokol H, Contreras V, Maisonnasse P, et al. SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates alters the composition and functional activity of the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1893113. doi:10.1080/19490976.2021.1893113
358. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:9. doi:10.3389/fcimb.2020.00009
359. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):87-113. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.002
360. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(1):55-63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
361. Bruzzese E, Callegari ML, Raia V, et al. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with Lactobacillus GG: a randomised clinical trial. *PloS One*. 2014;9(2):e87796. doi:10.1371/journal.pone.0087796
362. Varraso R, Chiuve SE, Fung TT, et al. Alternate Healthy Eating Index 2010 and risk of chronic obstructive pulmonary disease among US women and men: prospective study. *BMJ*. 2015;350:h286. doi:10.1136/bmj.h286
363. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20(2):159-166. doi:10.1038/nm.3444
364. Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokudome S, Nakayama K. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing Lactobacillus casei in habitual smokers. *Prev Med*. 2005;40(5):589-594. doi:10.1016/j.ypmed.2004.07.019
365. Mitre E, Susi A, Kropp LE, Schwartz DJ, Gorman GH, Nylund CM. Association Between Use of Acid-Suppressive Medications and Antibiotics During Infancy and Allergic Diseases in Early Childhood. *JAMA Pediatr*. 2018;172(6):e180315. doi:10.1001/jamapediatrics.2018.0315
366. Dumas A, Corral D, Colom A, et al. The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2018;9:2656. doi:10.3389/fimmu.2018.02656
367. Dessein R, Bauduin M, Grandjean T, et al. Antibiotic-related gut dysbiosis induces lung immunodepression and worsens lung infection in mice. *Crit Care*. 2020;24(1):611. doi:10.1186/s13054-020-03320-8
368. Wang H, Lian P, Niu X, et al. TLR4 deficiency reduces pulmonary resistance to Streptococcus pneumoniae in gut microbiota-disrupted mice. *PLoS ONE*. 2018;13(12):e0209183. doi:10.1371/journal.pone.0209183
369. Yu G, Gail MH, Consonni D, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome Biol*. 2016;17(1):163. doi:10.1186/s13059-016-1021-1
370. Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLOS Pathog*. 2015;11(7):e1004923. doi:10.1371/journal.ppat.1004923
371. Sze MA, Tsuruta M, Yang SWJ, et al. Changes in the Bacterial Microbiota in Gut, Blood, and Lungs following Acute LPS Instillation into Mice Lungs. *PLOS ONE*. 2014;9(10):e111228. doi:10.1371/journal.pone.0111228
372. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):1-9. doi:10.1038/s12276-018-0126-x

373. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):321-335. doi:10.1038/nri3430
374. Stephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(3):161-177. doi:10.1007/s00005-011-0122-5
375. Martens EC, Lowe EC, Chiang H, et al. Recognition and Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Two Human Gut Symbionts. *PLoS Biol*. 2011;9(12):e1001221. doi:10.1371/journal.pbio.1001221
376. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107-118. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007
377. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*. 2010;32(6):815-827. doi:10.1016/j.immuni.2010.06.001
378. Samuelson DR, Welsh DA, Shellito JE. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front Microbiol*. 2015;6:1085. doi:10.3389/fmicb.2015.01085
379. Ito T, Carson WF, Cavassani KA, Connett JM, Kunkel SL. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):613-619. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.018
380. He Y, Wen Q, Yao F, Xu D, Huang Y, Wang J. Gut-lung axis: The microbial contributions and clinical implications. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43(1):81-95. doi:10.1080/1040841X.2016.1176988
381. Matsuno K, Ueta H, Shu Z, et al. The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Arch Histol Cytol*. 2010;73(1):1-21. doi:10.1679/aohc.73.1
382. Dumas A, Bernard L, Poquet Y, Lugo-Villarino G, Neyrolles O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol*. 2018;20(12):e12966. doi:10.1111/cmi.12966
383. Anand S, Mande SS. Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. *Front Microbiol*. 2018;9:2147. doi:10.3389/fmicb.2018.02147
384. Hwang DH, Kim JA, Lee JY. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol*. 2016;785:24-35. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.024
385. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*. 2011;34(5):794-806. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.021
386. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128-139. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.007
387. Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011;469(7331):543-547. doi:10.1038/nature09646
388. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):159-169. doi:10.1038/nri2710
389. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-573. doi:10.1126/science.1241165
390. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):1007-1022. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.014
391. Litvak Y, Byndloss MX, Bäumlér AJ. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science*. 2018;362(6418):eaat9076. doi:10.1126/science.aat9076
392. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal Immunol*. 2019;12(4):843-850. doi:10.1038/s41385-019-0160-6
393. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-661.

doi:10.1126/science.1178331

394. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, et al. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c⁺ Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8⁺ T Cell Metabolism. *Immunity*. 2018;48(5):992-1005.e8. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022
395. Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science*. 2017;357(6350):498-502. doi:10.1126/science.aam5336
396. Ahmadi Badi S, Moshiri A, Fateh A, et al. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles as New Systemic Regulators. *Front Microbiol*. 2017;8:1610. doi:10.3389/fmicb.2017.01610
397. Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget*. 2017;8(32):53829-53838. doi:10.18632/oncotarget.17754
398. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(4):241-255. doi:10.1038/s41579-020-00460-0
399. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(8):453-466. doi:10.1038/nrn3071
400. Dogra N, Mani RJ, Katare DP. The Gut-Brain Axis: Two Ways Signaling in Parkinson's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2022;42(2):315-332. doi:10.1007/s10571-021-01066-7
401. Manosso LM, Arent CO, Borba LA, Ceretta LB, Quevedo J, Réus GZ. Microbiota-Gut-Brain Communication in the SARS-CoV-2 Infection. *Cells*. 2021;10(8):1993. doi:10.3390/cells10081993
402. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*. 2018;1693:128-133. doi:10.1016/j.brainres.2018.03.015
403. Mittal R, Debs LH, Patel AP, et al. Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut–Brain Axis. *J Cell Physiol*. 2017;232(9):2359-2372. doi:10.1002/jcp.25518
404. Ojeda J, Ávila A, Vidal PM. Gut Microbiota Interaction with the Central Nervous System throughout Life. *J Clin Med*. 2021;10(6):1299. doi:10.3390/jcm10061299
405. Vodička M, Ergang P, Hrnčič T, et al. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun*. 2018;73:615-624. doi:10.1016/j.bbi.2018.07.007
406. Johnson SD, Olwenyi OA, Bhyravhatla N, et al. Therapeutic implications of SARS-CoV-2 dysregulation of the gut-brain-lung axis. *World J Gastroenterol*. 2021;27(29):4763-4783. doi:10.3748/wjg.v27.i29.4763
407. Jahani M, Dokaneheifard S, Mansouri K. Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm. *J Inflamm Lond Engl*. 2020;17:33. doi:10.1186/s12950-020-00263-3
408. Rahman A, Tabassum T, Araf Y, Al Nahid A, Ullah MdA, Hosen MJ. Silent hypoxia in COVID-19: pathomechanism and possible management strategy. *Mol Biol Rep*. 2021;48(4):3863-3869. doi:10.1007/s11033-021-06358-1
409. Tian M, Liu W, Li X, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):308. doi:10.1038/s41392-021-00726-w
410. Gopal AB, Chakraborty S, Padhan PK, et al. Silent hypoxia in COVID-19: a gut microbiota connection. *Curr Opin Physiol*. 2021;23:100456. doi:10.1016/j.cophys.2021.06.010
411. Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell Biosci*. 2020;10(1):40. doi:10.1186/s13578-020-00404-4
412. Tsikala Vafea M, Atalla E, Kalligeros M, Mylona EK, Shehadeh F, Mylonakis E. Chest CT findings in asymptomatic cases with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol*. 2020;75(11):876.e33-876.e39. doi:10.1016/j.crad.2020.07.025
413. Kumar P, Chander B. COVID 19 mortality: Probable role of microbiome to explain disparity. *Med Hypotheses*. 2020;144:110209. doi:10.1016/j.mehy.2020.110209
414. Bana B, Cabreiro F. The Microbiome and Aging. *Annu Rev Genet*. 2019;53:239-261. doi:10.1146/annurev-genet-112618-043650

415. Wilkins LJ, Monga M, Miller AW. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. *Sci Rep*. 2019;9(1):12918. doi:10.1038/s41598-019-49452-y
416. Abid MB, Mughal M, Abid MA. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Immune-Engaging Cancer Treatment. *JAMA Oncol*. 2020;6(10):1529-1530. doi:10.1001/jamaoncol.2020.2367
417. Sharma A, Bhatt NS, St Martin A, et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol*. 2021;8(3):e185-e193. doi:10.1016/S2352-3026(20)30429-4
418. Abid MA, Nunley L, Abid MB. Could Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Render Natural Immunity to Re-infections? A Spotlight on the Therapeutic Pipeline. *Front Immunol*. 2020;11. Accessed November 13, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01294>
419. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X
420. Han H, Ma Q, Li C, et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1123-1130. doi:10.1080/22221751.2020.1770129
421. Zhou Y, Fu B, Zheng X, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev*. 2020;7(6):998-1002. doi:10.1093/nsr/nwaa041
422. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*. 2020;159(3):944-955.e8. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048
423. Effenberger M, Grabherr F, Mayr L, et al. Faecal calprotectin indicates intestinal inflammation in COVID-19. *Gut*. 2020;69(8):1543-1544. doi:10.1136/gutjnl-2020-321388
424. Wilson KC, Chotirmall SH, Bai C, Rello J. COVID-19: Interim Guidance on Management Pending Empirical Evidence. From an American Thoracic Society-led International Task Force. Published online 2020:12.
425. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, et al. Surviving Sepsis Campaign: Guidelines on the Management of Critically Ill Adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Crit Care Med*. 2020;48(6):e440-e469. doi:10.1097/CCM.00000000000004363
426. Angus DC. Optimizing the Trade-off Between Learning and Doing in a Pandemic. *JAMA*. 2020;323(19):1895-1896. doi:10.1001/jama.2020.4984
427. Feng Z, Wang Y, Qi W. The Small Intestine, an Underestimated Site of SARS-CoV-2 Infection: From Red Queen Effect to Probiotic. Published online 2020. doi:10.20944/preprints202003.0161.v1
428. Chiu L, Bazin T, Truchetet ME, Schaeffer T, Delhaes L, Pradeu T. Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Front Immunol*. 2017;8. Accessed November 15, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01678>
429. Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, Reifer C, Ouwehand AC. Probiotic Effects on Cold and Influenza-Like Symptom Incidence and Duration in Children. *Pediatrics*. 2009;124(2):e172-e179. doi:10.1542/peds.2008-2666
430. Li N, Ma WT, Pang M, Fan QL, Hua JL. The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review. *Front Immunol*. 2019;10:1551. doi:10.3389/fimmu.2019.01551
431. Laviolette L, Laveneziana P, ERS Research Seminar Faculty. Dyspnoea: a multidimensional and multidisciplinary approach. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1750-1762. doi:10.1183/09031936.00092613
432. Barr W, Smith A. Acute diarrhea. *Am Fam Physician*. 2014;89(3):180-189.
433. Ye Z, Zhang Y, Wang Y, Huang Z, Song B. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. *Eur Radiol*. 2020;30(8):4381-4389. doi:10.1007/s00330-020-06801-0
434. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*.

- 1987;40(5):373-383. doi:10.1016/0021-9681(87)90171-8
435. McAleer JP, Kolls JK. Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur J Immunol*. 2018;48(1):39-49. doi:10.1002/eji.201646721
436. Cait A, Hughes MR, Antignano F, et al. Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunol*. 2018;11(3):785-795. doi:10.1038/mi.2017.75
437. Hosakote YM, Jantzi PD, Esham DL, et al. Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(11):1550-1560. doi:10.1164/rccm.201010-1755OC
438. Castelli V, d'Angelo M, Lombardi F, et al. Effects of the probiotic formulation SLAB51 in in vitro and in vivo Parkinson's disease models. *Aging*. 2020;12(5):4641-4659. doi:10.18632/aging.102927
439. Hashiba T, Suzuki M, Nagashima Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice. *Gene Ther*. 2001;8(19):1499-1507. doi:10.1038/sj.gt.3301540
440. Ramachandran P, Onukogu I, Ghanta S, et al. Gastrointestinal Symptoms and Outcomes in Hospitalized Coronavirus Disease 2019 Patients. *Dig Dis Basel Switz*. 2020;38(5):373-379. doi:10.1159/000509774
441. Nobel YR, Phipps M, Zucker J, et al. Gastrointestinal Symptoms and Coronavirus Disease 2019: A Case-Control Study From the United States. *Gastroenterology*. 2020;159(1):373-375.e2. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.017
442. Zhang J, Yu M, Tong S, Liu LY, Tang LV. Predictive factors for disease progression in hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2020;127:104392. doi:10.1016/j.jcv.2020.104392
443. Pouya F, Imani Saber Z, Kerachian MA. Molecular Aspects of Co-morbidities in COVID-19 Infection. *Arch Bone Jt Surg*. 2020;8(Suppl1):226-230. doi:10.22038/abjs.2020.47828.2361
444. Viana SD, Nunes S, Reis F. ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities – Role of gut microbiota dysbiosis. *Ageing Res Rev*. 2020;62:101123. doi:10.1016/j.arr.2020.101123
445. d'Ettorre G, Ceccarelli G, Marazzato M, et al. Challenges in the Management of SARS-CoV2 Infection: The Role of Oral Bacteriotherapy as Complementary Therapeutic Strategy to Avoid the Progression of COVID-19. *Front Med*. 2020;7:389. doi:10.3389/fmed.2020.00389
446. Gao S, Jiang F, Jin W, et al. Risk factors influencing the prognosis of elderly patients infected with COVID-19: a clinical retrospective study in Wuhan, China. *Aging*. 2020;12(13):12504-12516. doi:10.18632/aging.103631
447. Conte L, Toraldo DM. Targeting the gut-lung microbiota axis by means of a high-fibre diet and probiotics may have anti-inflammatory effects in COVID-19 infection. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14:1753466620937170. doi:10.1177/1753466620937170
448. Tulic MK, Piche T, Verhasselt V. Lung-gut cross-talk: evidence, mechanisms and implications for the mucosal inflammatory diseases. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2016;46(4):519-528. doi:10.1111/cea.12723
449. Espinoza JA, León MA, Céspedes PF, et al. Heme Oxygenase-1 Modulates Human Respiratory Syncytial Virus Replication and Lung Pathogenesis during Infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017;199(1):212-223. doi:10.4049/jimmunol.1601414
450. Tseng CK, Lin CK, Wu YH, et al. Human heme oxygenase 1 is a potential host cell factor against dengue virus replication. *Sci Rep*. 2016;6:32176. doi:10.1038/srep32176
451. Ceccarelli G, Scagnolari C, Pugliese F, Mastroianni CM, d'Ettorre G. Probiotics and COVID-19. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(8):721-722. doi:10.1016/S2468-1253(20)30196-5
452. Infusino F, Marazzato M, Mancone M, et al. Diet Supplementation, Probiotics, and Nutraceuticals in SARS-CoV-2 Infection: A Scoping Review. *Nutrients*. 2020;12(6):E1718. doi:10.3390/nu12061718
453. Ceccarelli G, Statzu M, Santinelli L, et al. Challenges in the management of HIV infection: update on the role of probiotic supplementation as a possible complementary

- therapeutic strategy for cART treated people living with HIV/AIDS. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19(9):949-965. doi:10.1080/14712598.2019.1638907
454. Han Y, Zhang H, Mu S, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging.* 2020;12(12):11245-11258. doi:10.18632/aging.103372
455. Toumazi D, Constantinou C. A Fragile Balance: The Important Role of the Intestinal Microbiota in the Prevention and Management of Colorectal Cancer. *Oncology.* 2020;98(9):593-602. doi:10.1159/000507959
456. Violi F, Cangemi R, Romiti GF, et al. Is Albumin Predictor of Mortality in COVID-19? *Antioxid Redox Signal.* 2021;35(2):139-142. doi:10.1089/ars.2020.8142
457. Ceccarelli G, Borrazzo C, Pinacchio C, et al. Oral Bacteriotherapy in Patients With COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Front Nutr.* 2021;7:613928. doi:10.3389/fnut.2020.613928
458. Grimes JM, Khan S, Badeaux M, Rao RM, Rowlinson SW, Carvajal RD. Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2021;102:566-570. doi:10.1016/j.ijid.2020.10.100
459. Abruzzo A, Vitali B, Lombardi F, et al. Mucoadhesive Buccal Films for Local Delivery of *Lactobacillus brevis*. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):E241. doi:10.3390/pharmaceutics12030241
460. Palumbo P, Miconi G, Cinque B, et al. NOS2 expression in glioma cell lines and glioma primary cell cultures: correlation with neurosphere generation and SOX-2 expression. *Oncotarget.* 2017;8(15):25582-25598. doi:10.18632/oncotarget.16106
461. Palumbo P, Lombardi F, Augello FR, et al. NOS2 inhibitor 1400W Induces Autophagic Flux and Influences Extracellular Vesicle Profile in Human Glioblastoma U87MG Cell Line. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):3010. doi:10.3390/ijms20123010
462. Riccia DD, Bizzini F, Perilli M, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007;13(4):376-385. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x
463. Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens.* 2020;9(3):231. doi:10.3390/pathogens9030231
464. Mach WJ, Thimmesch AR, Pierce JT, Pierce JD. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. *Nurs Res Pract.* 2011;2011:e260482. doi:10.1155/2011/260482
465. Bellan M, Soddu D, Balbo PE, et al. Respiratory and Psychophysical Sequelae Among Patients With COVID-19 Four Months After Hospital Discharge. *JAMA Netw Open.* 2021;4(1):e2036142. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.36142
466. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1988;12(4):365-372. doi:10.1161/01.hyp.12.4.365
467. Lj I. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2002;53(4 Pt 1). Accessed November 22, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12512688/>
468. R S, Ym S. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *J Biol Chem.* 2020;295(30). doi:10.1074/jbc.REV120.011188
469. La P, Ja B, Da W, Jm K, Tm T. Inducible nitric oxide contributes to viral pathogenesis following highly pathogenic influenza virus infection in mice. *J Infect Dis.* 2013;207(10). doi:10.1093/infdis/jit062
470. F I, P M, G B, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2004;22(10). doi:10.1200/JCO.2004.11.120
471. I S, Sl R, Lc A, Bb F. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3). doi:10.1152/physrev.00045.2009
472. What is long Covid and why are people having symptoms for months? The

- Independent. Published May 6, 2022. Accessed November 22, 2022. <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/long-covid-omicron-symptoms-what-b2072941.html>
473. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). *Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome*. clinicaltrials.gov; 2022. Accessed November 21, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02669212>
474. Newberry F, Hsieh SY, Wileman T, Carding SR. Does the microbiome and virome contribute to myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome? *Clin Sci*. 2018;132(5):523-542. doi:10.1042/CS20171330
475. Prins JB, Meer JW van der, Bleijenberg G. Chronic fatigue syndrome. *The Lancet*. 2006;367(9507):346-355. doi:10.1016/S0140-6736(06)68073-2
476. Pall ML, Satterlee JD. Elevated Nitric Oxide/Peroxynitrite Mechanism for the Common Etiology of Multiple Chemical Sensitivity, Chronic Fatigue Syndrome, and Posttraumatic Stress Disorder. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;933(1):323-329. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05836.x
477. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X
478. Araimo F, Imperiale C, Tordiglione P, et al. Ozone as adjuvant support in the treatment of COVID-19: A preliminary report of probiozovid trial. *J Med Virol*. 2021;93(4):2210-2220. doi:10.1002/jmv.26636
479. Marazzato M, Ceccarelli G, d'Ettorre G. Dysbiosis in SARS-CoV-2-Infected Patients. *Gastroenterology*. 2021;160(6):2195. doi:10.1053/j.gastro.2020.12.056
480. Michielsen HJ, De Vries J, Van Heck GL. Psychometric qualities of a brief self-rated fatigue measure: The Fatigue Assessment Scale. *J Psychosom Res*. 2003;54(4):345-352. doi:10.1016/S0022-3999(02)00392-6
481. Brief Report: Attention Deficit and Hyperactivity Disorder Scores Are Elevated and Respond to N-Acetylcysteine Treatment in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. doi:10.1002/art.37893
482. Kleijn WPE de, Vries JD, Wijnen PAHM, Drent M. Minimal (clinically) important differences for the Fatigue Assessment Scale in sarcoidosis. *Respir Med*. 2011;105(9):1388-1395. doi:10.1016/j.rmed.2011.05.004
483. Morgul E, Bener A, Atak M, et al. COVID-19 pandemic and psychological fatigue in Turkey. *Int J Soc Psychiatry*. 2021;67(2):128-135. doi:10.1177/0020764020941889
484. El Sayed S, Shokry D, Gomaa SM. Post-COVID-19 fatigue and anhedonia: A cross-sectional study and their correlation to post-recovery period. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2021;41(1):50-55. doi:10.1002/npr2.12154
485. Meiboom S, Gill D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev Sci Instrum*. 1958;29(8):688-691. doi:10.1063/1.1716296
486. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(suppl_1):D521-D526. doi:10.1093/nar/gkl923
487. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1H NMR Metabonomics. *Anal Chem*. 2006;78(13):4281-4290. doi:10.1021/ac051632c
488. Naviaux RK, Naviaux JC, Li K, et al. Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(37):E5472-E5480. doi:10.1073/pnas.1607571113
489. Rudroff T, Fietsam AC, Deters JR, Bryant AD, Kamholz J. Post-COVID-19 Fatigue: Potential Contributing Factors. *Brain Sci*. 2020;10(12):1012. doi:10.3390/brainsci10121012
490. Carfi A, Bernabei R, Landi F, for the Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA*. 2020;324(6):603-605. doi:10.1001/jama.2020.12603
491. Dani M, Dirksen A, Taraborrelli P, et al. Autonomic dysfunction in 'long COVID': rationale, physiology and management strategies. *Clin Med*. 2021;21(1):e63-e67. doi:10.7861/clinmed.2020-0896
492. Solomon IH, Normandin E, Bhattacharyya S, et al. Neuropathological Features of

- Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(10):989-992. doi:10.1056/NEJMc2019373
493. Al-Dalahmah O, Thakur KT, Nordvig AS, et al. Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):147. doi:10.1186/s40478-020-01024-2
494. Butler CA, Popescu AS, Kitchener EJA, Allendorf DH, Puigdellívol M, Brown GC. Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *J Neurochem*. 2021;158(3):621-639. doi:10.1111/jnc.15327
495. Delorme C, Paccoud O, Kas A, et al. COVID-19-related encephalopathy: a case series with brain FDG-positron-emission tomography/computed tomography findings. *Eur J Neurol*. 2020;27(12):2651-2657. doi:10.1111/ene.14478
496. Tsoukalas D, Sarandi E, Georgaki S. The snapshot of metabolic health in evaluating micronutrient status, the risk of infection and clinical outcome of COVID-19. *Clin Nutr ESPEN*. 2021;44:173-187. doi:10.1016/j.clnesp.2021.06.011
497. Oh HS, Oh SK, Lee JS, Wu C, Lee SJ. Effects of l-arginine on growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Food Sci Biotechnol*. 2017;26(6):1749-1754. doi:10.1007/s10068-017-0236-6
498. Mizuno K, Tanaka M, Nozaki S, et al. Mental fatigue-induced decrease in levels of several plasma amino acids. *J Neural Transm*. 2007;114(5):555-561. doi:10.1007/s00702-006-0608-1
499. Camic CL, Housh TJ, Zuniga JM, et al. Effects of Arginine-Based Supplements on the Physical Working Capacity at the Fatigue Threshold. *J Strength Cond Res*. 2010;24(5):1306-1312. doi:10.1519/JSC.0b013e3181d68816
500. Chen IF, Wu HJ, Chen CY, Chou KM, Chang CK. Branched-chain amino acids, arginine, citrulline alleviate central fatigue after 3 simulated matches in taekwondo athletes: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr*. 2016;13(1):28. doi:10.1186/s12970-016-0140-0
501. Shi X, Li X, Li D, et al. β -Hydroxybutyrate Activates the NF- κ B Signaling Pathway to Promote the Expression of Pro-Inflammatory Factors in Calf Hepatocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(4):920-932. doi:10.1159/000358664
502. Li J, Wang X, Chen J, Zuo X, Zhang H, Deng A. COVID-19 infection may cause ketosis and ketoacidosis. *Diabetes Obes Metab*. 2020;22(10):1935-1941. doi:10.1111/dom.14057
503. Kang P, Liu Y, Zhu H, et al. The effect of dietary asparagine supplementation on energy metabolism in liver of weaning pigs when challenged with lipopolysaccharide. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2017;31(4):548-555. doi:10.5713/ajas.17.0426
504. Marquezi ML, Roschel HA, Costa A dos S, Sawada LA, Jr AHL. Effect of Aspartate and Asparagine Supplementation on Fatigue Determinants in Intense Exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2003;13(1):65-75. doi:10.1123/ijsnem.13.1.65
505. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;14:575-583. doi:10.2147/COPD.S188422
506. Mohr AE, Jäger R, Carpenter KC, et al. The athletic gut microbiota. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020;17(1):24. doi:10.1186/s12970-020-00353-w
507. Buscemi L, Blochet C, Price M, Magistretti PJ, Lei H, Hirt L. Extended preclinical investigation of lactate for neuroprotection after ischemic stroke. *Clin Transl Neurosci*. 2020;4(1):2514183X20904571. doi:10.1177/2514183X20904571
508. Papoff P, Ceccarelli G, d'Ettorre G, et al. Gut Microbial Translocation in Critically Ill Children and Effects of Supplementation with Pre- and Pro Biotics. *Int J Microbiol*. 2012;2012:e151393. doi:10.1155/2012/151393
509. Spagnolello O, Pinacchio C, Santinelli L, et al. Targeting Microbiome: An Alternative Strategy for Fighting SARS-CoV-2 Infection. *Chemotherapy*. 2021;66(1-2):24-32. doi:10.1159/000515344
510. Tarsitani L, Vassalini P, Koukopoulos A, et al. Post-traumatic Stress Disorder Among COVID-19 Survivors at 3-Month Follow-up After Hospital Discharge. *J Gen Intern Med*. 2021;36(6):1702-1707. doi:10.1007/s11606-021-06731-7

511. d'Ettoire G, Ceccarelli G, Santinelli L, et al. Post-Traumatic Stress Symptoms in Healthcare Workers Dealing with the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(2):601. doi:10.3390/ijerph18020601
512. Ceccarelli G, Alessandri F, Oliva A, et al. The role of teicoplanin in the treatment of SARS-CoV-2 infection: A retrospective study in critically ill COVID-19 patients (Tei-COVID study). *J Med Virol*. 2021;93(7):4319-4325. doi:10.1002/jmv.26925
513. Violi F, Ceccarelli G, Cangemi R, et al. Hypoalbuminemia, Coagulopathy, and Vascular Disease in COVID-19. *Circ Res*. 2020;127(3):400-401. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317173
514. Cella E, Benedetti F, Fabris S, et al. SARS-CoV-2 Lineages and Sub-Lineages Circulating Worldwide: A Dynamic Overview. *Chemotherapy*. 2021;66(1-2):3-7. doi:10.1159/000515340
515. Nasreen S, Chung H, He S, et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe outcomes with variants of concern in Ontario. *Nat Microbiol*. 2022;7(3):379-385. doi:10.1038/s41564-021-01053-0
516. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, et al. Effectiveness of COVID-19 booster vaccines against COVID-19-related symptoms, hospitalization and death in England. *Nat Med*. 2022;28(4):831-837. doi:10.1038/s41591-022-01699-1
517. Lynn DJ, Benson SC, Lynn MA, Pulendran B. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(1):33-46. doi:10.1038/s41577-021-00554-7
518. B P, P SA, Dt O. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(6). doi:10.1038/s41573-021-00163-y
519. Oh JZ, Ravindran R, Chassaing B, et al. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity*. 2014;41(3):478-492. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.009
520. Kim D, Kim YG, Seo SU, et al. Nod2-mediated recognition of the microbiota is critical for mucosal adjuvant activity of cholera toxin. *Nat Med*. 2016;22(5):524-530. doi:10.1038/nm.4075
521. Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):202-214. doi:10.1016/j.chom.2016.07.001
522. Ng SC, Peng Y, Zhang L, et al. Gut microbiota composition is associated with SARS-CoV-2 vaccine immunogenicity and adverse events. *Gut*. 2022;71(6):1106-1116. doi:10.1136/gutjnl-2021-326563
523. Alexander JL, Kennedy NA, Ibraheim H, et al. COVID-19 vaccine-induced antibody responses in immunosuppressed patients with inflammatory bowel disease (VIP): a multicentre, prospective, case-control study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(4):342-352. doi:10.1016/S2468-1253(22)00005-X
524. Uehara O, Abiko Y, Nagasawa T, et al. Alterations in the oral microbiome of individuals with a healthy oral environment following COVID-19 vaccination. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):50. doi:10.1186/s12903-022-02093-6
525. Levine-Tiefenbrun M, Yelin I, Alapi H, et al. Waning of SARS-CoV-2 booster viral-load reduction effectiveness. *Nat Commun*. 2022;13(1):1237. doi:10.1038/s41467-022-28936-y
526. Ward H, Whitaker M, Flower B, et al. Population antibody responses following COVID-19 vaccination in 212,102 individuals. *Nat Commun*. 2022;13(1):907. doi:10.1038/s41467-022-28527-x
527. Pérez-Alós L, Armenteros JJA, Madsen JR, et al. Modeling of waning immunity after SARS-CoV-2 vaccination and influencing factors. *Nat Commun*. 2022;13(1):1614. doi:10.1038/s41467-022-29225-4
528. Jara A, Undurraga EA, Zubizarreta JR, et al. Effectiveness of CoronaVac in children 3-5 years of age during the SARS-CoV-2 Omicron outbreak in Chile. *Nat Med*. 2022;28(7):1377-1380. doi:10.1038/s41591-022-01874-4
529. Langford BJ, So M, Raybardhan S, et al. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin*

Microbiol Infect Dis. 2021;27(4):520-531. doi:10.1016/j.cmi.2020.12.018

530. Hagan T, Cortese M, Rouphael N, et al. Antibiotics-Driven Gut Microbiome Perturbation Alters Immunity to Vaccines in Humans. *Cell.* 2019;178(6):1313-1328.e13. doi:10.1016/j.cell.2019.08.010

531. Hegazy M, Ahmed Ashoush O, Tharwat Hegazy M, et al. Beyond probiotic legend: ESSAP gut microbiota health score to delineate SARS-COV-2 infection severity. *Br J Nutr.* 2022;127(8):1180-1189. doi:10.1017/S0007114521001926

532. Merino J, Joshi AD, Nguyen LH, et al. Diet quality and risk and severity of COVID-19: a prospective cohort study. *Gut.* 2021;70(11):2096-2104. doi:10.1136/gutjnl-2021-325353

533. Hou YC, Su WL, Chao YC. COVID-19 Illness Severity in the Elderly in Relation to Vegetarian and Non-vegetarian Diets: A Single-Center Experience. *Front Nutr.* 2022;9:837458. doi:10.3389/fnut.2022.837458

534. Zhu L, She ZG, Cheng X, et al. Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2020;31(6):1068-1077.e3. doi:10.1016/j.cmet.2020.04.021

535. Bousquet J, Anto JM, Iaccarino G, et al. Is diet partly responsible for differences in COVID-19 death rates between and within countries? *Clin Transl Allergy.* 2020;10:16. doi:10.1186/s13601-020-00323-0

536. Da S, Rat M, Dh V, Jp A, Pc K. The promise of the gut microbiome as part of individualized treatment strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;19(1). doi:10.1038/s41575-021-00499-1

537. Rathi A, Jadhav SB, Shah N. A Randomized Controlled Trial of the Efficacy of Systemic Enzymes and Probiotics in the Resolution of Post-COVID Fatigue. *Med Basel Switz.* 2021;8(9):47. doi:10.3390/medicines8090047

538. Gutiérrez-Castrellón P, Gandara-Martí T, Abreu Y Abreu AT, et al. Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial. *Gut Microbes.* 2022;14(1):2018899. doi:10.1080/19490976.2021.2018899

539. Zhang L, Xu Z, Mak JWY, et al. Gut microbiota-derived synbiotic formula (SIM01) as a novel adjuvant therapy for COVID-19: An open-label pilot study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2022;37(5):823-831. doi:10.1111/jgh.15796

540. Zhang L, Han H, Li X, et al. Probiotics use is associated with improved clinical outcomes among hospitalized patients with COVID-19. *Ther Adv Gastroenterol.* 2021;14:17562848211035670. doi:10.1177/17562848211035670

541. Wu C, Xu Q, Cao Z, et al. The volatile and heterogeneous gut microbiota shifts of COVID-19 patients over the course of a probiotics-assisted therapy. *Clin Transl Med.* 2021;11(12):e643. doi:10.1002/ctm2.643

542. Heavey MK, Durmusoglu D, Crook N, Anselmo AC. Discovery and delivery strategies for engineered live biotherapeutic products. *Trends Biotechnol.* 2022;40(3):354-369. doi:10.1016/j.tibtech.2021.08.002

543. Piscotta FJ, Hoffmann HH, Choi YJ, et al. Metabolites with SARS-CoV-2 Inhibitory Activity Identified from Human Microbiome Commensals. *mSphere.* 6(6):e00711-21. doi:10.1128/mSphere.00711-21

544. Liu F, Ye S, Zhu X, et al. Gastrointestinal disturbance and effect of fecal microbiota transplantation in discharged COVID-19 patients. *J Med Case Reports.* 2021;15(1):60. doi:10.1186/s13256-020-02583-7

545. Biliński J, Winter K, Jasiński M, et al. Rapid resolution of COVID-19 after faecal microbiota transplantation. *Gut.* 2022;71(1):230-232. doi:10.1136/gutjnl-2021-325010