

## È guerra mondiale al CoViD-19. Decisiva la prima battaglia sul fronte dell'invasione virale contro l'exitus per polmonite interstiziale

GIUSEPPINA BASTA<sup>1</sup>, SERENA DEL TURCO<sup>1</sup>, CHIARA CASELLI<sup>1</sup>, LUCA MELANI<sup>2</sup>, ANNAMARIA VIANELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa; <sup>2</sup>Associazione territoriale di Medicina Generale (AFT 2) ASL Toscana Nord Ovest, Pisa; <sup>3</sup>Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, Sezione di Telemedicina, Università di Pisa.

*Pervenuto il 25 marzo 2020; accettato il 26 marzo 2020.*

**Riassunto.** Una epidemia di un nuovo coronavirus originario di Wuhan (Cina), responsabile di una grave sindrome respiratoria acuta (Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS) e denominato SARS-CoV-2, sta provocando una malattia pandemica chiamata CoViD-19 (Coronavirus Disease-19), nonostante siano state prese dappertutto rigide misure di contenimento e restrizioni negli spostamenti individuali per ostacolare la diffusione del virus. Lo spettro della malattia varia da una forma pressoché asintomatica, a una forma paucisintomatica, a una condizione clinica rapidamente progressiva con polmonite interstiziale bilaterale e grave insufficienza respiratoria, che necessita di ventilazione meccanica e supporto in un'unità di terapia intensiva, per shock settico e disfunzione multiorgano. Al momento non esiste un vaccino in grado di prevenire CoViD-19 e le strutture ospedaliere stanno già rischiando la saturazione. Perciò sarebbe utile e necessario intensificare le cure sul territorio sia mediante stratificazione dei pazienti ad alto rischio di progressione polmonare infausta, sia mediante strategie di monitoraggio e di cura domiciliare dei pazienti positivi e/o di quelli altamente a rischio di ammalarsi di CoViD-19. Partendo dai meccanismi patogenetici dell'infezione fino alle caratteristiche cliniche dei pazienti contagiati, in questa revisione si è cercato di focalizzare i punti cruciali dell'infezione in combinazione con l'appropriatezza dell'intervento medico. Lo scopo che ci prefiggiamo è quello di offrire indicazioni di intervento terapeutico che siano tempestive e, per quanto possibile, efficaci, calate sul singolo paziente in relazione all'età, situazione clinica e comorbidità. Una diagnosi precoce associata a una appropriata azione terapeutica nelle fasi iniziali della malattia può ridurre la progressione di CoViD-19 verso la polmonite interstiziale, interferendo così sul numero di accessi alla terapia intensiva e sulla letalità della pandemia in corso.

**Parole chiave.** ACE2, coronavirus, CoViD-19, polmonite interstiziale, SARS-CoV-2.

*It's world war at CoViD-19. The first battle on the front of the viral invasion against the exitus for interstitial pneumonia was decisive.*

**Summary.** An outbreak of a new coronavirus originating from Wuhan (China), responsible for a severe acute respiratory syndrome (SARS), called SARS-CoV-2, is causing a pandemic disease called CoViD-19 (Coronavirus Disease-19), although strict containment measures and restrictions on individual travel have been taken everywhere to hinder the spread of the virus. The clinical spectrum of this infection includes, in order of lesser to greater severity, asymptomatic viremia, paucisymptomatic forms, clinical conditions characterized by respiratory failure that needs mechanical ventilation and support in an intensive care unit, systemic manifestations of infection, septic shock, and multiple organ dysfunction syndromes. There is currently no vaccine to prevent CoViD-19, but the international scientific community is intensely focused on finding a vaccine that will prevent SARS-CoV-2 transmission. In the meanwhile, to prevent hospitals from risking collapse, it is crucial to stratify patients at high risk of poor lung progression, to find effective monitoring strategies, even at home, for the positive patients and/or those highly at risk of positivity of CoViD-19. Starting from the pathogenetic mechanisms involved in the development of this infection up to the clinical characteristics of the infected patients, in this review we tried to focus on the crucial points of the infection in combination with the appropriateness of the medical intervention. We aim to offer indications of therapeutic intervention that are timely and, as far as possible, effective, targeted to the individual patient in relation to age, clinical condition and comorbidities. An early diagnosis associated with an appropriate therapeutic action in the initial stages of the disease can reduce the progression of CoViD-19 towards interstitial pneumonia, thus interfering with the number of transfers to intensive care and lethality of the pandemic in progress.

**Key words.** ACE2, coronavirus, CoViD-19, interstitial pneumonia, SARS-CoV-2.

### Introduzione

Un'epidemia virale responsabile di una grave sindrome respiratoria acuta (Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS) rilevata a Wuhan, Cina, è stata segnalata per la prima volta all'Ufficio nazionale

dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in Cina, il 31 dicembre 2019 come "polmonite di eziologia sconosciuta", ora attribuita a un nuovo virus appartenente alla famiglia dei coronavirus e chiamato SARS-CoV-2 per le analogie genomiche con il CoV beta che causò l'epidemia di SARS nel 2002-2003<sup>1</sup>.

Questo nuovo virus ha manifestato un'alta contagiosità<sup>2</sup>, diffondendosi rapidamente nel resto del mondo, e l'11 marzo 2020 l'OMS ha ufficialmente riconosciuto il carattere di pandemia.

CoV-2 è un virus a RNA a singolo filamento che al microscopio elettronico si presenta con un aspetto simile a una corona per la presenza di glicoproteine superficiali sporgenti, chiamate "spike", e ha un diametro di circa 60-140 nm. Sebbene le sue origini non siano del tutto comprese, la caratterizzazione genomica suggerisce che CoV-2 probabilmente si sia evoluto da un ceppo identificato nei pipistrelli<sup>2</sup>. Il potenziale ospite mammifero amplificatore, intermedio tra pipistrelli e umani, non è tuttavia noto.

Il tempo di incubazione dell'infezione è risultato essere in media di 5-6 giorni ma può arrivare fino a 14 giorni<sup>2</sup>.

I casi positivi per questa nuova epidemia raddoppiano ogni 7 giorni, mentre il numero di riproduzione di base ( $R_0$ ) è pari a 2,2; questo significa che ogni paziente trasmette l'infezione a ulteriori 2,2 individui.

Lo spettro clinico di questa infezione varia da forme asintomatiche o paucisintomatiche a condizioni cliniche con polmonite interstiziale caratterizzate da un'insufficienza respiratoria talmente severa da richiedere il supporto della ventilazione meccanica e l'accesso in un'unità di terapia intensiva, associata a deficit funzionale multiorgano e sistemico con sindrome da disfunzione multiorgano, conseguenti a shock settico.

I dati pubblicati finora provengono da report ospedalieri, ma è invece cruciale riuscire a compilare un registro territoriale che sia il più preciso e aggiornato possibile, perché è proprio la diffusione dell'infezione sul territorio, in fase pre-ospedaliera, quella che rischia di sfuggire al contenimento sanitario e alla registrazione statistica epidemiologica. Sono stati pubblicati i dati clinici ed epidemiologici dell'organizzazione sanitaria di controllo cinese relativi a 72.314 casi che comprendono sia i casi confermati e diagnosticati sia il maggior numero possibile dei casi sospetti, compresi quelli paucisintomatici e asintomatici<sup>3</sup>, e hanno fornito un'importante illustrazione della curva epidemiologica dell'epidemia in Cina. Il 62% dei casi è stato confermato con il test di laboratorio (analisi dell'acido nucleico virale su tampone rino-faringeo), incluso l'1% dei casi asintomatici, ma positivi al test. Inoltre, il tasso complessivo di mortalità sui casi confermati era del 2,3%. Da notare che i casi fatali erano principalmente pazienti anziani, in particolare quelli di età  $\geq 80$  anni (circa il 15%) e da 70 a 79 anni (8,0%). Circa la metà dei pazienti critici e affetti da comorbilità preesistenti, come malattie cardiovascolari, ipertensione, diabete, malattie respiratorie croniche e malattie oncologiche, è deceduta. Per quanto riguarda la fascia di popolazione infantile, solo l'1% dei pazienti aveva 9 anni o meno e in questo gruppo non si sono verificati casi fatali.

Nello stesso studio<sup>3</sup> lo spettro clinico dei pazienti infettati con SARS-CoV-2 e basato sulla severità delle

manifestazioni cliniche era: 81% con malattia lieve, senza polmonite o polmonite in forma lieve; 14% con malattia grave: dispnea, frequenza respiratoria  $\geq 30$ /min, saturazione di ossigeno nel sangue ( $SpO_2$ )  $\leq 93\%$ , rapporto  $PaO_2/FiO_2 < 300$  (rapporto tra pressione parziale dell'ossigeno,  $PaO_2$ , e frazione di ossigeno inspirato,  $FiO_2$ ) e/o infiltrati polmonari  $> 50\%$  entro 24-48 ore; 5% malattia critica: insufficienza respiratoria, shock settico e/o disfunzione multiorgano o insufficienza.

Al 28 febbraio 2020, l'Italia aveva 888 casi di infezioni da SARS-CoV-2, con la maggior parte dei casi nel Nord Italia nelle regioni Lombardia e Veneto, con 21 decessi. Il tasso di letalità riportato era 2,3%, simile a quello cinese. Anche in Italia i decessi avvenivano nella maggior parte dei casi fra gli anziani con comorbilità note<sup>4</sup>. Al 25 marzo 2020 i casi totali sono purtroppo saliti a 74.386 con 7503 decessi. Questi sono al momento i dati di uno dei più grandi e seri cluster di CoViD-19 al mondo. Nonostante gli sforzi aggressivi di contenimento, la malattia continua a diffondersi in Italia e il numero di pazienti affetti è in aumento, con un tasso di letalità molto elevato, dominato da pazienti molto anziani<sup>5</sup>.

Questi dati provengono in maggioranza da report ospedalieri, ma è invece cruciale riuscire a compilare un registro territoriale che sia il più preciso e aggiornato possibile, perché è proprio la diffusione dell'infezione sul territorio, in fase pre-ospedaliera quella che rischia di sfuggire al contenimento sanitario e alla registrazione statistica epidemiologica. La maggior parte dei pazienti che si trova nella fase iniziale della malattia riceve un trattamento domiciliare con farmaci sintomatici quali anti-piretici, anti-infiammatori, mucolitici e broncodilatatori. Spesso, però, già nella fase di malattia lieve, secondo la stadiazione redatta dai colleghi cinesi, si presentano i primi segni radiografici della progressione polmonare della malattia ed è questo il momento clinico in cui è necessario combattere la prima decisiva battaglia contro il SARS-CoV-2.

Lo scopo di questa revisione è quello di evidenziare i punti cruciali di intervento medico, in cui poter agire tempestivamente e, per quanto possibile, efficacemente, con un approccio di medicina clinica calata sul singolo paziente in relazione alla condizione clinica di base e alle comorbilità, al fine di ridurre la percentuale (sono circa il 20%) di casi che sfociano nello stadio più grave e critico della malattia e che necessitano dell'accesso ai reparti di terapia intensiva.

### Caratteristiche molecolari del virus e meccanismo di infezione

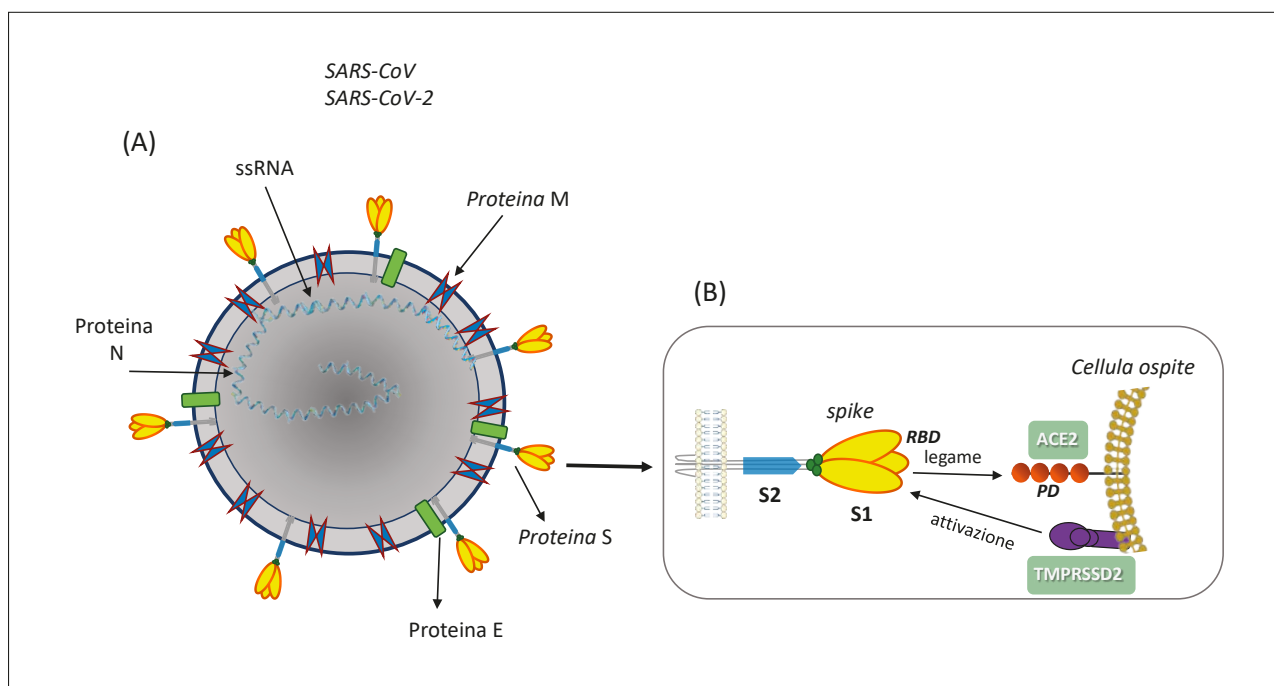
Le proteine del capsido di SARS-CoV-2 e SARS-CoV hanno strutture quasi identiche suggerendo che il meccanismo patogenetico possa essere simile<sup>6</sup>. La virulenza di SARS-CoV-2 dipende dall'attività di proteine non strutturali e di quattro proteine strutturali (S, E, M e N) che contribuiscono all'assemblaggio dei virioni e all'infezione dei CoV (figura 1A).

In merito alle funzioni delle proteine strutturali, il capsido ha un ruolo cruciale nella patogenicità del virus in quanto promuove l'assemblaggio e il rilascio del virus<sup>7</sup>. Quando SARS-CoV-2 infetta un ospite umano, il primo passo nel processo di infezione avviene a opera delle glicoproteine sporgenti del capsido composte da due subunità (S1 e S2), che sono gli elementi chiave del legame con l'ospite. Gli omotrimeri delle proteine S che compongono le spike sulla superficie virale si legano ai recettori cellulari (figura 1B)<sup>7</sup>.

La porta d'ingresso nelle cellule umane è rappresentata da un recettore, noto come enzima di conversione dell'angiotensina 2 (angiotensin converting enzyme 2 - ACE2) a cui SARS-CoV-2 si lega molto più saldamente di SARS-CoV<sup>8</sup> (figura 1B). L'entrata del virus nelle cellule è un passaggio critico, come dimostrato in modelli animali di SARS-CoV in cui la sovra-espressione di ACE2 aumentava la severità del danno polmonare<sup>9,10</sup>. La subunità S1 contiene il dominio di legame per il recettore che permette al virus di legarsi direttamente al dominio peptidasi del recettore ACE2<sup>7</sup>. Il legame di SARS-CoV-2 ad ACE2 innesca cambiamenti conformazionali della proteina S predisponendola alla fusione di membrana. In particolare, un peptide di fusione localizzato all'estremità N-terminale della subunità S2, contenente anche un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico, è responsabile della fusione alla membrana pla-

smatica o endosomiale della cellula ospite. Bisogna sottolineare che nel SARS-CoV-2 la subunità S2 è altamente conservata. Pertanto, essa potrebbe essere un bersaglio per i composti antivirali (anti-S2). Al contrario, il dominio di legame per il recettore della subunità S1 presenta una omologia della sequenza amminoacidica con altri SARS-CoV solo del 40%<sup>11</sup>. L'attivazione delle glicoproteine virali avviene anche grazie a una proteasi di membrana, la serina proteasi transmembrana 2 (transmembrane serine protease 2 - TMPRSS2)<sup>12</sup>, la quale è essenziale per l'ingresso e la diffusione di SARS-CoV-2 attraverso l'interazione con il recettore ACE2<sup>13</sup>. Successivamente il virus penetra nella cellula ospite e avviene la "spoliazione" (*uncoating*) che "mette a nudo" il suo codice genetico e inizia la replicazione e la sintesi delle componenti virali. Segue l'assemblaggio di queste componenti, che vanno a creare un nuovo virus e l'uscita dalla cellula, propagando l'infezione a quelle circostanti.

Nelle banche genetiche internazionali sono state pubblicate diverse sequenze geniche di SARS-CoV-2. Questa mappatura genica è di fondamentale importanza per consentire ai ricercatori di tracciare l'albero filogenetico del virus e, soprattutto, il riconoscimento precoce di ceppi potenzialmente più virulenti che differiscono in base alle mutazioni. Secondo recenti ricerche, proprio una mutazione della proteina spike, che probabilmente si è verificata alla fine di novembre



**Figura 1.** Struttura di SARS-CoV-2 e della glicoproteina S.

(A) La virulenza di SARS-CoV-2 dipende dall'attività di 16 proteine non strutturali e di 4 proteine strutturali (M, E, N e S). La proteina M regola il trasporto dei nutrienti attraverso la membrana e interagisce con il complesso RNA-proteine. La proteina E aiuta la proteina S ad ancorarsi alla cellula ospite. La proteina N aumenta la stabilità del singolo filamento a RNA (single strand RNA - ssRNA).

(B) La glicoproteina S è composta da due subunità S1 ed S2. S1 svolge una funzione di legame al recettore mentre S2 svolge le funzioni di fusione tra virus e cellula e l'internalizzazione del virus. Gli omotrimeri della proteina S formano le "spike" che si attivano grazie alla presenza di una proteasi, TMPRSS2, sulla superficie della cellula ospite, e poi, tramite il dominio di legame per il recettore (receptor binding domain - RBD) si legano al dominio peptidasi (peptide domain - PD) sul recettore ACE2.

2019, ha provocato il “salto” agli umani<sup>14,15</sup>. In particolare, Angeletti et al.<sup>16</sup> hanno confrontato la sequenza del gene virale responsabile della SARS-CoV-2 con quella della SARS-CoV. Da questo confronto è risultato che la posizione 723 presenta una serina anziché un residuo di glicina, mentre la posizione 1010 è occupata da prolina invece di isoleucina<sup>16</sup>. La proteina spike è dunque quella che determina la specificità del virus per il recettore ACE2 presente nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, della mucosa orofaringea<sup>17</sup>, della lingua e delle cellule polmonari, in particolare pneumociti di tipo 2<sup>18,19</sup>.

## Patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2: modalità di contagio e invasione cellulare

### CONTAGIO

Diverse informazioni essenziali sull'infettività e la sopravvivenza ambientale di SARS-CoV-2 sono in corso di studio. Uno studio recente ha evidenziato che SARS-CoV-2 e SARS-CoV sopravvivevano di più su plastica e acciaio inossidabile che su rame e cartone fino a 72 ore dopo l'applicazione su queste superfici, sebbene il titolo virale fosse notevolmente ridotto<sup>20</sup>. Avevano un'emivita molto simile nell'aerosol, fino a circa 3 ore<sup>20</sup>. I virus sono comunque sensibili al calore e alla luce ultravioletta e la vitalità diminuisce a temperature più elevate o a livelli più elevati di umidità relativa. Inoltre, possono essere effettivamente inattivati da solventi lipidici, tra cui etere (75%), etanolo, disinfettante contenente cloro, acido perossiacetico e cloroformio<sup>21</sup>.

La trasmissione da persona a persona di questo virus come di altri agenti patogeni respiratori potrebbe verificarsi sia per contatto diretto con individui infetti o con superfici contaminate, sia attraverso modalità aeree che si distinguono in respirabile (piccole particelle sospese nell'aria), inspirabile (dimensioni intermedie) o a gocciolina (droplet) satura di particelle virali. La diffusione è stata riscontrata principalmente tra i familiari, gli operatori sanitari e ad altri contatti stretti. Ma è anche vero che la ricerca del virus è stata fatta soprattutto a partire dai contatti stretti dei pazienti infetti e che molti soggetti paucisintomatici potrebbero essere sfuggiti ai controlli sanitari. Tuttavia, poiché la stabilità di SARS-CoV-2 è risultata simile a quella di SARS-CoV nelle circostanze sperimentali testate<sup>20</sup>, le differenze nelle caratteristiche epidemiologiche di questi virus probabilmente derivano da altri fattori, tra cui elevate cariche virali nel tratto respiratorio superiore e maggiore potenzialità per le persone infette da SARS-CoV-2 di trasmettere il virus mentre sono asintomatici<sup>22,23</sup>. Poiché il virus può rimanere vitale e infettivo negli aerosol per ore e su superfici fino a giorni, l'alta velocità di propagazione di SARS-CoV-2 indurrebbe perciò a pensare che il metro di distanza tra un individuo e l'altro, raccomandato dalle istituzioni governative per contenere l'epidemia, possa non essere sufficiente in quei contesti chiusi e affollati, come

mezzi di trasporto, ambienti ospedalieri con insufficiente ricambio d'aria, esercizi commerciali. Anche la trasmissione oro-fecale e la relativa sanificazione igienica degli ambienti va tenuta in seria considerazione. Per questo motivo, quando si prendono decisioni di intervento che comportano il blocco di percorsi ambientali, le raccomandazioni generiche applicate indiscriminatamente possono essere inefficaci; la scelta dell'intervento dovrebbe invece essere contestualizzata. Le misure drastiche adottate da alcune istituzioni governative e l'obbligo all'uso di mascherine protettive sono in linea con quanto esposto<sup>24</sup>.

### ENTRATA NELLE CELLULE:

#### COLONIZZAZIONE E INVASIONE VIRALE

Quando il SARS-CoV-2 infetta un ospite umano, il virus colonizza le vie aeree superiori o arriva direttamente agli alveoli per aerosol ed entra nella cellula ospite legandosi al recettore umano ACE2. Questo recettore è presente nelle cellule epiteliali ciliate delle vie aeree superiori e inferiori, così come negli pneumociti di tipo II, che risiedono negli alveoli e sono responsabili della rigenerazione degli pneumociti di tipo I e della secrezione del surfattante, che abbassa la tensione superficiale e favorisce gli scambi gassosi.

### ACE2 E SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NELLA PATOGENESI DEL DANNO POLMONARE E POSSIBILI TERAPIE DI INTERVENTO

Una domanda chiave è perché il polmone sembra essere il bersaglio più vulnerabile. Uno dei motivi è che la vasta superficie del polmone rende questo organo altamente suscettibile ai virus per inalazione. Esiste però anche un fattore biologico. Utilizzando il normale tessuto polmonare di otto donatori adulti, Zhao et al.<sup>25</sup> hanno dimostrato che l'83% delle cellule che esprimono ACE2 sono pneumociti di tipo II che facilitano la replicazione virale nel polmone, e questo potrebbe giustificare la maggiore vulnerabilità polmonare.

Il coinvolgimento del recettore ACE2 nel danno polmonare è stato anche evidenziato confrontando topi normali con topi privati del gene per l'ACE2, nei quali a parità di stimolo lesivo alveolare il danno polmonare risultava molto più esteso, rapido e grave rispetto ai topi normali<sup>26</sup>. Questo può essere spiegato considerando il ruolo del recettore ACE2 e del sistema renina angiotensina (RAS) nel danno polmonare (figura 2).

Il recettore ACE2 è una carbosipeptidasi, con la parte catalitica rivolta verso lo spazio extracellulare, con un ruolo chiave nel sistema RAS, in quanto associato alla regolazione dell'angiotensina II (AngII)<sup>27</sup>. Nei polmoni, l'attivazione locale del sistema RAS può influenzare la patogenesi del danno polmonare attraverso meccanismi multipli, come un aumento della

permeabilità vascolare e alterazioni delle cellule epiteliali alveolari<sup>28</sup>. L'attivazione del sistema RAS coinvolge una serie di step enzimatici a cascata in cui la renina, l'enzima iniziale della cascata di attivazione RAS, scinde l'angiotensinogeno, in Ang I. L'ACE converte l'Ang I ad Ang II, che si lega a due specifici recettori per l'angiotensina (AT1 e AT2, angiotensin type-1, angiotensin type-2). Il legame dell'Ang II al recettore AT1 determina vasocostrizione, uno stato pro-infiammatorio, e sostiene la fibrosi tissutale<sup>29</sup>. L'ACE2 svolge un ruolo chiave nel controbilanciare il sistema RAS, in quanto regola i livelli dell'Ang II convertendo l'Ang I in Ang 1-9 e l'Ang II in Ang 1-7. L'Ang 1-7 è pleiotropica e può influenzare le funzioni di molti organi e sistemi. I suoi effetti sono mediati da uno specifico recettore (mitochondrial assembly receptor - MAS) e dal recettore AT2<sup>29</sup>.

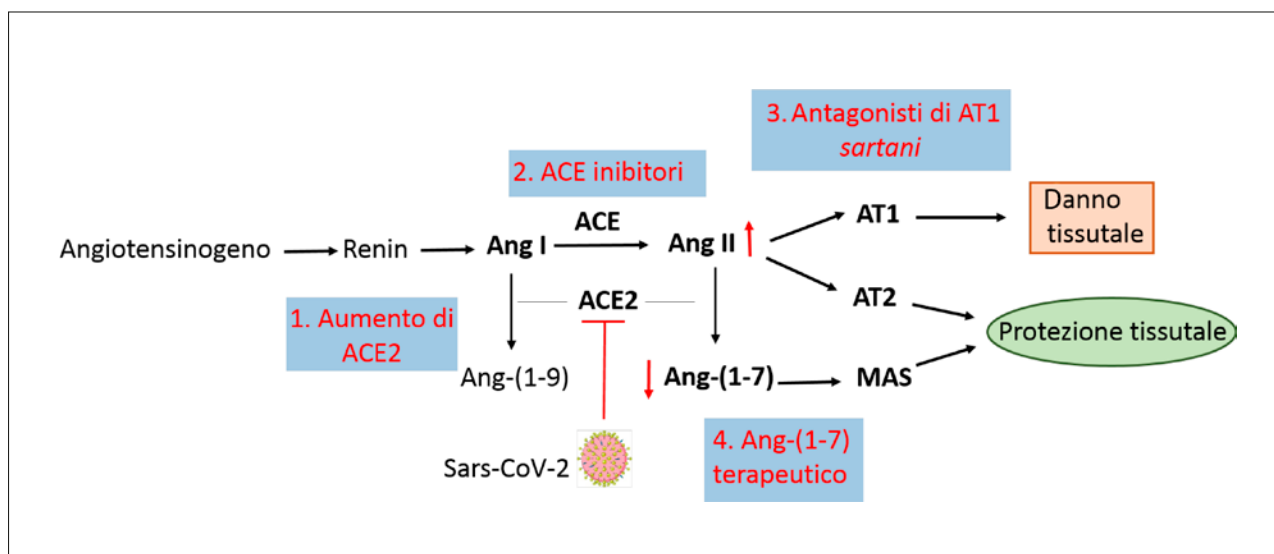
Nel complesso si ritiene che il recettore ACE2 funzioni come un enzima di contro-regolazione che esercita un'azione protettiva sugli alveoli diminuendo le concentrazioni locali di Ang II, contrastando quindi gli effetti pro-fibrotici del legame dell'Ang II al recettore AT1.

Poiché l'infezione da SARS-CoV-2 causa una riduzione di ACE2, con conseguente sbilanciamento del sistema RAS e ridotta funzione protettiva dell'ACE2, l'eccesso di Ang II attraverso il legame ai recettori AT1 potrebbe accelerare il danno alveolare portando alla sindrome da distress respiratorio acuto (Acute Respiratory Distress Syndrome - ARDS) fino alla fibrosi polmonare<sup>26</sup>. Sulla base di questo presupposto, la compensazione di ACE2 e il bilanciamento della funzione

ACE/ACE2 potrebbe contribuire ad alleviare le gravi lesioni polmonari indotte dal virus<sup>18</sup>.

In quest'ottica, alcuni ACE-inibitori, come il lisinopril, potrebbero bilanciare la funzione ACE/ACE2. Inoltre, la somministrazione del peptide Ang 1-7 che si lega al recettore MAS potrebbe risultare terapeutica così da contrastare l'attività dell'Ang II<sup>18</sup>.

Sulla base di quanto detto sullo sbilanciamento del sistema RAS dovuto all'infezione, una maggiore espressione di ACE2, conseguente al trattamento cronico soprattutto con sartani, antagonisti del recettore AT1<sup>30</sup> in pazienti affetti da SARS-CoV-2, potrebbe proteggerli da conseguenze polmonari gravi, sia attraverso il blocco, da parte dei sartani, dell'eccessiva attivazione dei recettori AT1, responsabili del danno alveolare, sia per la sovra-espressione dell'ACE2, che riduce la produzione di angiotensina e aumenta la produzione del vasodilatatore Ang-(1-7)<sup>31</sup> (figura 2). Tuttavia, si potrebbe anche ipotizzare che un aumento della disponibilità dell'ACE2 dell'epitelio alveolare possa facilitare l'infezione e/o le sue complicanze più temibili, come l'alveolite e l'ARDS. Da qui, la considerazione che gli ACE inibitori/sartani, determinando un aumento dei livelli di ACE2, esporrebbero i pazienti con patologie cardiovascolari in terapia cronica con questi anti-ipertensivi a un rischio aumentato di CoViD-19. È stato però osservato che le patologie cardiovascolari più serie sono associate a bassi livelli di ACE2, e quindi l'aumento del rischio di complicanze da SARS-CoV-2 nei pazienti con alti livelli di ACE2 indotto dalla terapia con sartani assumerebbe un valore relativo.



**Figura 2.** Possibili terapie d'intervento basate sul bilanciamento del sistema renina-angiotensina. L'attivazione del sistema RAS coinvolge la renina che trasforma l'angiotensinogeno in Ang I, che a sua volta è convertita ad Ang II dall'enzima ACE. L'Ang II si lega ai recettori AT1 e AT2, con effetti biologici opposti. L'enzima ACE2 funziona come un enzima contro-regolatore nel bilanciare le risposte indotte da ACE. ACE2 idrolizza Ang I e Ang II generando Ang-(1-9) e Ang-(1-7). Il legame dell'Ang-(1-7) al recettore MAS antagonizza le azioni mediate da Ang II. SARS-CoV-2 usa il recettore ACE2 come porta d'ingresso nella cellula ospite, alterando la bilancia ACE-ACE2. Le possibili strategie d'intervento includono: 1) aumento di ACE2 tramite somministrazione di proteine ricombinanti o tramite rilascio mirato alla cellula ospite; 2) utilizzo di ACE inibitori così da bloccare la generazione di Ang II; 3) utilizzo di antagonisti di AT1 come i sartani, così da bloccare il danno tissutale mediato dal legame dell'Ang II ad AT1; 4) somministrazione terapeutica di Ang-(1-7) che si lega al recettore MAS esercitando un effetto protettivo sul tessuto.

A ogni modo, bisogna sottolineare che non ci sono solide evidenze scientifiche (studi osservazionali retrospettivi o farmaco-epidemiologici) né sugli effetti protettivi né su quelli dannosi dei farmaci anti-ipertensivi ACE-inibitori/sartani in pazienti con CoViD-19. Questo deve condurre a una particolare cautela verso la sostituzione degli ACE-inibitori/sartani con altri anti-ipertensivi, specialmente nei pazienti ben controllati farmacologicamente. Queste classi di anti-ipertensivi, infatti, rappresentano terapie efficaci e consolidate nella prevenzione e nel trattamento di malattie croniche quali ipertensione arteriosa, scompenso cardiaco, diabete e insufficienza renale. Eventuali sostituzioni tra differenti classi di anti-ipertensivi, basate sui pochi studi fatti e sulla base di ipotesi molecolari incomplete, potrebbero esporre una popolazione di pazienti estremamente fragili a un potenziale aumento di rischio di ipertensione non controllata/ipotensione sintomatica, nonché di aggravamento delle condizioni croniche sopra menzionate.

#### L'INTERAZIONE TRA LE SPIKE DEL VIRUS E I RECETTORI ACE2 RAPPRESENTA UN UTILE TARGET MOLECOLARE PER LO SVILUPPO DI STRATEGIE D'INTERVENTO TERAPEUTICO

Il fatto che sia SARS-CoV sia SARS-CoV-2 utilizzino lo stesso recettore apre la possibilità di utilizzare la vasta ricerca condotta sui modelli di SARS-CoV per sviluppare nuove strategie.

L'approccio più semplice per affrontare l'epidemia di CoViD-19 sarebbe quello del targeting diretto della glicoproteina virale con l'utilizzo di anticorpi, così da neutralizzare l'entrata del virus nelle cellule. La recente caratterizzazione strutturale e funzionale della proteina spike ha fornito informazioni sul meccanismo utilizzato da questi virus per infettare le cellule ospiti e ha suggerito possibili strategie per la progettazione razionale di vaccini e terapie.

Una strategia è lo sviluppo di anticorpi diretti contro la subunità S1 della proteina spike virale per impedire il legame ad ACE2<sup>32</sup>. Tuttavia, convalidare rapidamente un anticorpo contro il virus che sia anche capace di neutralizzare eventuali forme mutate richiede molto tempo e anche l'approccio di un cocktail anticorpale, come adottato per Ebola, aggiungerebbe solo complessità al processo di produzione.

La proteasi TMPRSS2 potrebbe essere un altro interessante candidato per il vaccino in quanto un inibitore, camostat mesilato, approvato in Giappone per il trattamento di altre patologie, ha la capacità di bloccare l'attività di TMPRSS2 e quindi l'ingresso delle spike virali<sup>33</sup>.

Uno strumento semplice ma potenzialmente molto efficace, già sperimentato per SARS ed Ebola, è quello di usare il siero dei pazienti guariti per curare i pazienti che contraggono il virus<sup>34,35</sup>. I pazienti guariti dopo l'infezione sviluppano una risposta immunitaria anticorpale policlonale ad alto titolo contro diversi antigeni virali. Alcuni di questi anticorpi policlonali

potrebbero neutralizzare il virus e impedire nuovi cicli di infezione. Tuttavia questo strumento, ancora in fase embrionale, presenta non poche difficoltà nella purificazione e sicurezza dell'anti-siero. Esiste, però, in questo scenario un'altra strategia che si basa sulla neutralizzazione del recettore ACE2, impedendo il legame virale. Anticorpi monoclonali o piccole molecole potrebbero essere usate contro il dominio chiave del recettore ACE2, attraverso tre diversi approcci. Il primo prevede la somministrazione del dominio di legame recettoriale della subunità S1 che si legherà ad ACE2 e saturerà i siti di legame<sup>36</sup>. In alternativa, un anticorpo o frammento di anticorpo potrebbe essere somministrato contro ACE2 per ottenere lo stesso risultato. Questo approccio è risultato efficace per bloccare l'entrata e la replicazione di SARS-CoV<sup>37</sup>.

La terza strategia, che sembra la più promettente, perché non interferisce con il sistema RAS, sarebbe quella di creare una molecola simile a un anticorpo che si leghi al coronavirus stesso, piuttosto che proteggere le cellule dall'infezione. Questa strategia prevede di utilizzare la forma solubile del recettore ACE2 come esca per neutralizzare il virus.

Poiché SARS-CoV-2 diminuisce i livelli di ACE2 (ma non ACE) legandosi con le spike, ACE2 solubile in eccesso potrebbe legarsi in modo competitivo a SARS-CoV-2, sebbene su siti attivi distinti, non solo neutralizzando il virus ma anche preservando l'attività del recettore cellulare ACE2, che regola negativamente il sistema RAS, proteggendo il polmone dall'insulto dannoso<sup>38</sup>. Il dominio extracellulare del recettore ACE2 può essere fuso al dominio Fc (frammento cristallizzabile) di una immunoglobulina umana per permettere al complesso biologico (ACE2-Fc) di restare più a lungo in circolo. Un precedente studio ha dimostrato che il dominio extracellulare di ACE2 fuso con il dominio delle IgG1 umane (ACE2-NN-Ig) è stato efficace nel neutralizzare SARS-CoV in vitro<sup>39</sup>. Una potenziale limitazione della strategia ACE2-Fc è che non si conoscono gli effetti dell'aumento dei livelli circolanti del recettore solubile, in particolare quando è legato al dominio Fc che gli permette un'emivita più lunga, dato che i livelli circolanti di ACE2 secreti in condizioni fisiologiche dai tessuti sono bassi.

In studi preliminari la somministrazione di una proteina ricombinante ACE2 (rhACE2) ha dimostrato di essere sicura in soggetti volontari sani e in una piccola coorte di pazienti con ARDS<sup>40,41</sup>. RhACE2 migliora la lesione polmonare acuta attraverso la riduzione dei livelli di Ang II e di interleuchina-6 (IL-6). La disponibilità di questa proteina ACE2 ha indotto un team multinazionale di interventisti, scienziati e biotecnologi ad avviare rapidamente uno studio pilota di rhACE2 in pazienti gravi affetti da SARS-CoV-2 (Clinicaltrials.gov # NCT04287686).

#### Spettro clinico dell'infezione da SARS-CoV-2

Dai numerosi e crescenti dati clinici pubblicati su questa epidemia<sup>3-5,42-45</sup> e da quelli che ormai i medici

di famiglia osservano quotidianamente nella pratica clinica, emerge che lo spettro clinico dell'infezione da SARS-CoV-2 presenta sostanzialmente due quadri clinici distinti e ingravescenti. Un quadro clinico in cui l'interessamento polmonare è lieve o addirittura assente e un quadro clinico in cui l'interessamento polmonare è presente fin dall'inizio e procede più o meno velocemente fino a un quadro di ARDS, che spesso sfocia in un esito fatale.

### **STADIO 1: colonizzazione, localizzazione bronco-polmonare e fase viremica**

Una volta entrato nell'organismo, con carica virale sufficiente, il CoViD-19 determina una sintomatologia delle alte vie respiratorie che si estrinseca soprattutto con tosse secca, talvolta con rinorrea. Sempre nelle primissime fasi, il virus può raggiungere gli alveoli polmonari e determinare quelle alterazioni polmonari precoci che si evidenziano meglio con le scansioni TAC polmonari e che sono descritte come infiltrati polmonari interstiziali (aree a "vetro smerigliato") localizzati soprattutto ai lobi inferiori<sup>46</sup>. Subito dopo, l'organismo ospite entra nella fase viremica che determina quei sintomi sistemici simil-influenzali quali ipotensione, brividi e febbre, che portano il paziente a rivolgersi al medico. In questa fase, l'iperpiressia è di cruciale importanza nella lotta alla progressione della malattia perché contribuisce a ridurre la replicazione del virus, prima ancora della sua internalizzazione cellulare. C'è una precisa fase in cui il virus è termolabile ed è quella durante il taglio proteolitico delle proteine virali, contemporaneo al taglio del recettore ACE2 da parte del dominio 17 della metallopeptidasi ADAM. Quando il complesso virus-recettore si è formato e il virus si è integrato con la membrana della cellula ospite, il complesso transmembrana diventa resistente al calore e all'azione delle proteasi<sup>47,48</sup>. Nei pazienti in grado di tollerare lo stato iperpiretico, sarebbe quindi preferibile non tentare di abbassare troppo la temperatura corporea.

### **INDIVIDUAZIONE DEI CASI SOSPETTI DI INFEZIONE DA SARS-CoV-2 SUL TERRITORIO, IN FASE PRE-OSPEDALIERA**

Secondo la casistica territoriale l'infezione da SARS-CoV-2 dà segni clinici dopo circa 5-6 giorni dal contatto, se identificato, altrimenti esordisce improvvisamente con brividi, nausea, febbre e tosse secca. Nei quadri più severi, in particolare nelle persone anziane, esordisce con ipotensione, sintomi neurologici da ipo-afflusso cerebrale e febbre. Al contrario, nei bambini si manifesta con rialzo febbrile, spesso con vomito e diarrea, sintomi non gravi a carico delle alte vie aeree. I recettori ACE2 sono presenti in prevalenza a livello polmonare, ma anche nel tratto gastro-intestinale, soprattutto nel piccolo intestino, per questo anche la diarrea è un sintomo correlato all'infezione

da SARS-CoV-2<sup>49,50</sup>. Un segno clinico patognomonico, non evidenziato nelle Linee guida cinesi, settima edizione del 3/03/2020, sembra essere quello della ageusia (perdita del senso del gusto) persistente, associata all'anosmia (perdita dell'olfatto) e presente dalle prime fasi di malattia fino a convalescenza inoltrata. Questo potrebbe essere dovuto all'alta concentrazione di recettori ACE2 presenti sulle cellule epiteliali della lingua e della cavità orale, che rende queste sedi altamente suscettibile all'infezione<sup>17</sup>.

Al momento, a causa del rapido propagarsi dell'infezione, non sempre è possibile eseguire tempestivamente il tampone diagnostico per CoViD-19 nei pazienti sospetti. Spesso il paziente sintomatico viene considerato altamente sospetto, vista anche la pressoché totale impossibilità di effettuare una diagnosi differenziale con i virus influenzali e para-influenzali di stagione, che presentano una sintomatologia d'esordio sovrapponibile a quella di CoViD-19. Al paziente viene raccomandato il più accurato isolamento all'interno del proprio domicilio secondo le indicazioni fornite fin dalla fine del mese di gennaio da un documento condiviso dalla Società Italiana Malattie Infettive e Tropicali e dalla Società Italiana di Medicina Generale (<https://bit.ly/2WZrGu1>) e viene monitorato sia per telefono sia, laddove possibile, con controlli saturimetrici continui, grazie anche al supporto della telemedicina. Se compare dispnea per sforzi lievi (test del cammino), con relativa desaturazione significativa ( $pO_2\%$  <93% dopo sforzi lievi) viene allertato il servizio di emergenza 118. Soltanto i pazienti con significativa riduzione della saturazione percentuale di  $pO_2$ , a riposo e/o con segni neurologici di ipoafflusso, e/o con aritmie o segni di insufficienza cardiocircolatoria acuta, vengono prelevati dal proprio domicilio e curati nei presidi ospedalieri.

Attualmente, le persone a stretto contatto con i pazienti positivi al test diagnostico vengono monitorate anch'esse, ma non sempre valutate mediante tampone diagnostico rino-faringeo. Sarebbe auspicabile che il Servizio Sanitario Territoriale si organizzasse al più presto per eseguire un maggior numero di tamponi diagnostici, e che venisse attivato un servizio per i prelievi ematici domiciliari, che fornirebbero informazioni cliniche determinanti sul decorso dell'infezione e sulla risposta sierologica anticorpale. Le ultime Linee guida cinesi citano la sierologia per evidenziare una sieroconversione del paziente nel periodo di convalescenza, considerando indicativo di sieroconversione un titolo IgG almeno quadruplo rispetto ai valori di base.

### **STADIO 2: interessamento polmonare dell'infezione da SARS-CoV-2**

Tutta la popolazione è impreparata ad affrontare il SARS-CoV-2, dato che questo agente infettivo è nuovo per il sistema immunitario. Pertanto quasi tutti siamo soggetti al contagio e a manifestare la malattia, ma non

tutti nella stessa modalità. Come già accennato, però, alcuni soggetti sono maggiormente predisposti a contrarre l'infezione in maniera grave. I bambini non sono immuni all'infezione, ma il decorso della malattia in loro sembra essere decisamente benigno. I casi in età pediatrica in Cina sono stati molto ridotti o addirittura non rilevati, proprio perché con decorso benigno<sup>51</sup>. Secondo un'ipotesi, che verrà testata in uno studio clinico, del prof. Mihai Netea, uno dei più importanti immunologi al mondo, i bambini potrebbero essere più protetti perché hanno un sistema immunitario più allenato, dovuto ai vaccini obbligatori dell'infanzia.

Nella maggior parte delle persone affette da CoViD-19, si scatena un'ondata infiammatoria locale, con il reclutamento di cellule immunitarie verso i siti di infezione (risposta immunitaria innata), e un rapido rilascio di citochine infiammatorie, come le interleuchine, il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  e l'interferone- $\gamma$ , che porta alla guarigione del paziente. Per avere un'azione immediata, le citochine vengono prodotte e secrete rapidamente, e normalmente non vengono accumulate. Una iper-attivazione del sistema immunitario con conseguente tempesta citochinica, che scatenerrebbe un accumulo di macrofagi, monociti e citochine nel focolaio di infezione polmonare sembrerebbe essere alla base della severa progressione polmonare, che interessa una ristretta percentuale di casi, ascrivibili perlopiù alla popolazione più anziana<sup>52</sup>.

La fase acuta dell'infezione da SARS nell'uomo è associata a una drammatica riduzione del numero di linfociti T (immunità acquisita), che svolgono un ruolo fondamentale nella rimozione del virus e delle cellule infette, e l'assenza di questa risposta antivirale potrebbe rappresentare un maggior aggravio sulla disfunzione della risposta immunitaria innata<sup>53</sup>. Recentemente, nei pazienti infetti da SARS-CoV-2 è stato osservato un aumento dei livelli serici di IL-1 $\beta$ <sup>54</sup>, che è un indicatore di piroptosi cellulare, un processo di morte cellulare programmata diverso dall'apoptosi, che coinvolge l'attivazione dell'inflammasoma. Quest'ultima modalità infiammatoria di morte cellulare, su base infiammatoria, potrebbe essere coinvolta nella patogenesi da SARS-CoV-2, specialmente a carico dei linfociti.

In questa fase, cosiddetta "immunopatologica", a livello tissutale si verifica una drammatica attivazione della fibrosi polmonare e si assiste a una differenziazione in senso pro-infiammatorio e pro-fibrotico, con produzione di citochine e metalloproteinasi<sup>55</sup>. In questo stadio, diventa critica la composizione e la quantità del surfattante alveolare prodotta dagli pneumociti tipo II. I vasi polmonari peri-lesionali appaiono di diametro sempre più aumentato in relazione all'estendersi delle lesioni polmonari, mentre il lume dei vasi si riduce drasticamente<sup>46</sup>.

La distruzione della componente interstiziale deputata agli scambi gassosi determina il passaggio alla ARDS della malattia, in cui si formano membrane ialine intra-alveolari e gran parte del parenchima alveolare diventa atelettasico, chiudendosi drammaticamente agli scambi gassosi.

## PAZIENTI VULNERABILI

I soggetti più predisposti a sviluppare polmonite severa sono i pazienti oncologici polmonari, i pazienti anziani, perché presentano una quota più o meno grave di enfisema polmonare<sup>56</sup>, con iperinflazione polmonare e aumentato volume respiratorio residuo, che favorisce il contatto del virus con l'epitelio alveolare, e i fumatori cronici<sup>57</sup>. Gli studi cinesi hanno evidenziato che i fumatori CoViD-19 presentava all'atto del ricovero una situazione clinica più severa dei non fumatori, e una maggiore necessità di ventilazione meccanica in oltre il doppio dei casi rispetto ai non fumatori<sup>56</sup>. Dal momento che la percentuale di fumatori in Cina è pari al 50% fra i maschi, mentre quella femminile è inferiore al 3%, una tale severità legata al fumo potrebbe in parte spiegare anche la differenza di genere nel tasso di letalità riscontrata, che sarebbe del 4,7% negli uomini contro il 2,8% nelle donne<sup>57</sup>. Tuttavia, in un altro studio l'associazione fra l'abitudine al fumo e la severità della malattia non raggiungeva la significatività statistica<sup>58</sup>.

Oltre alle differenze nello stile di vita fra uomini e donne, la minore incidenza di CoViD-19 fra i due sessi potrebbe avere spiegazioni metaboliche, ormonali e genetiche. Studi su modelli animali hanno evidenziato che i recettori per gli estrogeni potrebbero proteggere dalla progressione infausta della SARS-CoV che presenta numerose analogie con l'attuale SARS-CoV-2<sup>59</sup>. E anche la localizzazione del gene per l'ACE2 sul cromosoma X, che presenta diversi polimorfismi fra i due generi, potrebbe influenzare la risposta alla SARS-CoV-2<sup>60</sup>. Le differenze di genere sul sistema immunitario vedrebbero invece il genere femminile più predisposto a una deregolazione della risposta immunitaria come suggerito dalla maggiore prevalenza di autoimmunità e atopia fra le donne<sup>61</sup>.

In generale, però, sono gli anziani quelli a più alto rischio, i cosiddetti "pazienti fragili", che presentano comorbidità tali da predisporli alla progressione verso gravi complicanze polmonari<sup>4</sup>. Le principali comorbidità da tenere in considerazione sono: ipertensione, diabete non controllato, accumulo di chetoni e di acido lattico, insufficienza renale cronica, insufficienza epatica, scompenso cardio-renale. Altre abitudini e/o fragilità possono essere l'utilizzo cronico di diuretici, abuso di alcool, denutrizione, vomito o diarrea profusa, ingestione di particolari farmaci o tossine. All'accumulo di acido lattico sono soggetti anche gli atleti in over-training.

Anche i soggetti sottoposti cronicamente a inalazione di inquinanti ad alta concentrazione nell'aria, come coloro che abitano nelle città più densamente popolate, sviluppano un'infiammazione polmonare cronica, che potrebbe predisporre a una evoluzione infausta dell'infezione da SARS-CoV-2<sup>62</sup>.

La localizzazione cardiaca della malattia è descritta attualmente in una percentuale ridotta dei casi, ma si trovano descritti in letteratura sempre più casi di miocardite virale da CoViD-19, cui conseguono gravi complicanze aritmiche<sup>63</sup>. Considerando inoltre che i



recettori ACE2 sono ben rappresentati a livello miocardico e tenendo presenti i dati anatomopatologici relativi alla precedente epidemia SARS-CoV, che evidenziano cospicui infiltrati infiammatori anche a livello cardiaco, possiamo prevedere che il danno miocardico SARS-CoV-2 mediato sia maggiore di quanto attualmente stimato. Si potranno ricavare dati in futuro nel follow-up dei pazienti che avranno superato lo stadio 2 di malattia<sup>64</sup>.

#### IL PASSAGGIO ALLA FASE AVANZATA DI MALATTIA DA SARS-CoV-2: SEGNI CLINICI, RADIOLOGICI ED EMATOCHIMICI

Inizia a presentarsi un quadro di polmonite interstiziale clinicamente manifesta, cui può seguire un aggravamento drammatico del quadro clinico con interessamento alveolare e fibrosi massiva. La saturazione percentuale della pO<sub>2</sub> si riduce progressivamente, il paziente manifesta sintomi evidenti di tachipnea, tachicardia e dispnea per sforzi medio-lievi. In questo secondo stadio di malattia potrebbe anche comparire una diarrea profusa, che, in seguito alla perdita di bicarbonati con le feci, causerebbe acidosi. È molto frequente assistere in questa fase anche a un declino della funzionalità epatica, renale e cardio-renale.

Ovviamente, segni di polmonite interstiziale bilaterale con ombre a vetro smerigliato, di interessamento alveolare e vascolare e versamento pleurico possono essere rilevati e monitorati radiologicamente.

La medicina di laboratorio svolge un ruolo essenziale nella diagnosi precoce e nella gestione di molte malattie, compresa CoViD-19. La reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale (*real time-PCR*) consente l'identificazione diretta del virus sui tamponi orofaringei, mentre il rilevamento di anticorpi nel sangue mediante test immunologici è il fulcro della sorveglianza sierologica. Tuttavia, il ruolo della diagnostica di laboratorio va ben oltre la diagnosi eziologica e la sorveglianza epidemiologica, per cui test routinari diagnostici sono comunemente usati per valutare la gravità della malattia, per definire la prognosi, il follow-up dei pazienti, per guidare il trattamento e il loro monitoraggio terapeutico<sup>54,65,66</sup>.

Fra i dati di laboratorio prognostici, che possono essere più rilevanti per l'identificazione tempestiva dei pazienti a maggior rischio di esiti avversi, alcuni risultano significativamente differenti tra coloro che necessitano di ricovero in terapia intensiva e coloro che non presentano questa necessità imminente<sup>67</sup>. In particolare, i pazienti più gravi hanno più alti livelli della conta dei globuli bianchi (>1,5 volte), conta dei neutrofili (>1,7 volte), più bassa conta dei linfociti (<0,9 volte), nonché valori più alti della lattico deidrogenasi (LDH) (>2,1 volte), alanina aminotransferasi (>1,5 volte), aspartato aminotransferasi (>1,8 volte), bilirubina totale (>1,2 volte), creatinina (>1,1 volte), troponina cardiaca I (>2,2 volte), D-dimero (>2,5 volte) e procalcitonina (>1,2 volte). Per quanto riguarda

quest'ultimo parametro, il tasso di pazienti con valori anormali ammessi alla terapia intensiva era di 3 volte superiore a quella di coloro che non lo avevano alterato (75% contro 22%)<sup>67</sup>. È stato anche riferito che i non sopravvissuti hanno sviluppato linfopenia più frequentemente e leucocitosi, insieme a valori anormali di D-dimero, alti livelli di fibrinogeno, azoto ureico nel sangue e creatinina.

Tuttavia, va sottolineato che il quadro ematocimico deve essere letto precocemente, per un rapido e giusto orientamento diagnostico su tutti i possibili segni di deterioramento multi-organico. Sul nostro territorio, emerge, per esempio, che la comparsa di leucopenia anche severa, a volte anemia e trombocitopenia, rialzo della proteina C reattiva (PCR) e delle LDH, riduzione dei fattori del complemento, aumento della creatinina plasmatica, del D-dimero e degli indici di funzionalità epatica rappresenti un quadro di attivazione infiammatoria e pro-fibrotica che può verosimilmente essere infausta. Sono stati anche descritti casi di trombocitopenia grave, di verosimile natura autoimmune, nel corso di SARS<sup>68</sup>. La leucocitosi neutrofila, così come l'incremento della pro-calcitonina potrebbero essere invece indici di sovra-infezione batterica, cui si assiste in una significativa percentuale di casi afferenti ai reparti di terapia intensiva. Mentre la polmonite interstiziale da SARS-CoV-2, di per sé, sembra dare invece un quadro patognomonico di linfocitopenia, con conta leucocitaria totale normale o lievemente ridotta.

#### Trattamento e cura di CoViD-19

L'infezione da SARS-CoV-2 richiederebbe, diversamente da quanto si sta in realtà verificando, una diagnosi e un trattamento quanto più precoci possibile con i farmaci anti-virali, anti-infiammatori, anti-fibrotici e immuno-modulatori attualmente disponibili (tabella 1). Questo si potrebbe ottenere solo assicurando un'adeguata intensità di cure a livello di sanità territoriale.

#### FARMACI ANTIMALARICI PER I PAZIENTI PAUCISINTOMATICI

I dati presenti in letteratura, che evidenziano come la cloroquina e l'idrossicloroquina possano essere in grado di inibire l'invasività del SARS-CoV-2, rallentando l'ingresso del virus nella cellule ospite<sup>69</sup> ci offrono il razionale per introdurre la cloroquina anche a scopo profilattico in tutti i contatti stretti dei pazienti CoViD-19 e nei soggetti risultati positivi al tampone, ma non ancora sintomatici. Spesso sul territorio la cloroquina viene a mancare. In sostituzione, si potrebbe somministrare la meflochina, un farmaco attualmente in uso per la profilassi anti-malarica<sup>70</sup>. Idealmente, i positivi asintomatici potrebbero beneficiare di una terapia inalatoria con farmaci antivirali, in grado di ridurre la colonizzazione virale, soprattutto

Tabella 1. Trattamenti di CoViD-19.				
Classi di farmaci	Principi attivi	Dosaggio	Finestra di trattamento	Dati di efficacia e linee guida
Farmaci che inibiscono il legame di SARS-CoV-2 con ACE2	Clorochina	500 mg bis in die	14 gg dal contatto, se noto (in profilassi)	Non ancora testati a scopo profilattico
	Idrossiclorochina	200 mg bis in die		
	Meflochina 250 mg cps	1 cp al giorno		
Farmaci antibiotici, con associata attività inibitoria su catepsina L, ed effetto anti-citochinico	Teicoplanina	400 mg al giorno ev o im 200 mg per os bis in die	7-10 gg	Evidenze in vitro con SARS-CoV-2**
	Azitromicina	500 mg per os al giorno		
Farmaci anti-infiammatori con associato effetto anti-virale	Indometacina 25, 50, 75 mg cps	75-100 mg al giorno, max 200 mg al giorno	Al bisogno, limitandone l'uso	Non ancora disponibili
Farmaci che potenziano la risposta anti-virale innata	Interferone- $\alpha$	5.000.000 U alla volta oppure dosi equivalenti, con aggiunta di 2 mL di acqua sterile, per inalazione aereosol 2 volte/die	In fase precoce di malattia, in associazione ad antivirali	Linee guida cinesi, settima edizione 3/03/2020
Farmaci anti-retrovirali inibitori delle proteasi	Lopinavir/ritonavir cps	400/100 mg, 2 x 2/die in associazione con clorochina o idrossiclorochina	5-20 gg	Linee guida cinesi, settima edizione 3/03/2020 e SIMIT, Lombardia
	Remdesivir fiale 150 mg	1° giorno 200 mg ev in 30 minuti, poi 100 mg ev/die in associazione con clorochina o idrossiclorochina	5-20 gg	
	Ribavirina 200 mg capsule	In associazione con interferone- $\alpha$ oppure lopinavir/ritonavir 200 mg x 4-6/die in base al peso	Fino a 10 gg	
	Ribavirina ev	In associazione con interferone- $\alpha$ oppure lopinavir/ritonavir 500 mg ad ogni infusione ev, 2-3 infusioni ev/die	Fino a 10 gg	
	Umifenovir (non autorizzato in Europa)	200 mg x 3/die	Fino a 10 gg	
	Darunavir 150, 300, 600 mg cps	800 mg die + ritonavir 100 mg 1 cp/die o darunavir/cobicistat 800/150 mg 1 cp/die in associazione con clorochina o idrossiclorochina	5-10 gg	
	Favipiravir 200 mg cps	1600 mg bis in die giorno 1, 600 mg bis in die dal giorno 2	5 gg	
Farmaci cortisonici	Desametasone 4, 8 mg fiale iniettabili	20 mg/die per 5 giorni poi 10 mg/die per 5 giorni dopo 24 ore dall'insorgenza di ARDS o in pz con insufficienza respiratoria severa	Fino a 10 gg	Vademecum SIMIT Lombardia, 13/03/2020
Farmaci immunoterapici che agiscono sulla cascata citochinica	Tolecizumab (Ac monoclonale, inibitore del recettore dell'IL-6)	400 mg ev in soluzione fisiologica NaCl 0,9%, in 1 ora Dose massima: 800 mg ev in due somministrazioni	2 uniche somministrazioni a distanza di 12 ore	Linee guida cinesi, settima edizione 3/03/2020

*segue* **Tabella 1.**

Classi di farmaci	Principi attivi	Dosaggio	Finestra di trattamento	Dati di efficacia e linee guida
Terapia di supporto respiratorio		Ossigenoterapia basale, ad alto flusso, ventilazione meccanica non invasiva, invasiva, ECMO, in relazione agli stadi ingravescenti di insufficienza respiratoria		Riportati nelle Linee guida cinesi, settima edizione 3/03/2020
Farmaci stimolanti del surfattante alveolare, inibitori del rilascio di mediatori pro-infiammatori dagli pneumociti II	Ambroxolo N-Acetilcisteina	Da impiegare ad alte dosi in associazione con gli anti-virali		Non ancora chiare evidenze di efficacia clinica
Farmaci antitrombotici, con azione inibitoria sul fattore Xa ed associata attività anti-proteolitica del fattore Xa, sulle subunità S1 e S2 del virus S, azione immunomodulatoria e antifibrotica	Fondaparinux 2,5 mg fiale sc Rivaroxaban 10-15-20 mg cps Apixaban 2,5-5 mg cps	2,5 mg die s.c 10-20 mg die, fino a che la funzione renale è conservata 2,5-5 mg bis in die, fino a che la funzione renale è conservata	Per comorbidità a elevato rischio trombo-embolico e/o per il periodo di allettamento	In corso di verifica clinica in pazienti CoViD-19
Farmaci immuno-modulatori, anti-infiammatori, anti-fibrotici	Idrossiclorochina 200 mg cps Clorochina 500 mg cps Mesalazina 400 mg compresse	200 mg bis in die in associazione con antivirali 500 mg bis in die in associazione con antivirali 1-2 cps 3 volte al giorno in caso di localizzazione intestinale di CoViD-19	7-20 giorni e secondo il decorso clinico 7-20 giorni e secondo il decorso clinico 7-10 gg	Linee guida cinesi, settima edizione  Farmaco candidato ad applicazione in CoViD-19 †
Derivati plasmatici	Plasma di pazienti convalescenti		Malattia severa rapidamente progressiva	In corso di sperimentazione clinica
¶Farmaci di medicina tradizionale cinese coadiuvanti in associazione ai farmaci antivirali	Shufeng Jiedu Capsule (SFJDC, a traditional Chinese medicine)	In associazione ad antivirali e idrossiclorochina		In corso di sperimentazione clinica

Gli indici riportati in tabella si riferiscono alle referenze bibliografiche di seguito riportate: \*70; \*\*76; §84; †79; ¶85, 86. ECMO: ExtraCorporeal Membrane Oxygenation.

a carico delle vie aeree inferiori, quella più a rischio di determinare una polmonite letale.

I pazienti sintomatici per CoViD-19, anche prima della diagnosi microbiologica, dovrebbero essere messi subito a riposo assoluto e dovrebbe essere garantito loro l'introito calorico adeguato, l'omeostasi corporea idro-elettrolitica e glico-metabolica, il monitoraggio della frequenza cardiaca, della pressione arteriosa e della frequenza respiratoria, il monitoraggio della spO<sub>2</sub>, della temperatura corporea, dei parametri ematochimici, i controlli radiografici seriati attraverso un percorso territoriale dedicato.

Già al primo picco febbrile, insieme all'antimalarico dovrebbe essere intrapresa una terapia con gli antivirali lopinavir/ritonavir. Sull'utilizzo della combinazione di lopinavir/ritonavir, che sono entrambi inibitori proteasici, usati per combattere l'HIV, sono in corso numerosi studi clinici in tutto il mondo. Tut-

tavia, uno studio pubblicato di recente non ha riportato alcun beneficio per i pazienti con CoViD-19 severa<sup>71</sup>. Questo dovrebbe incoraggiare l'utilizzo della combinazione di due farmaci antivirali, in uno stadio più precoce della malattia, in cui ne ha dimostrato l'efficacia<sup>72,73</sup>.

In particolare nei pazienti più fragili, positivi per CoViD-19 con sintomi respiratori lievi ma di età >70 anni e/o con fattori di rischio (BPCO, diabete e cardiopatia) oppure sintomatici o con sintomi lievi (febbre >37,5 °C), tosse, dispnea da lieve a moderata e Rx torace con quadro di polmonite (vedi Linee guida SIMIT, sezione Lombardia), il ritardo nell'introduzione di questi farmaci, così come sta avvenendo nella maggior parte dei casi, potrebbe compromettere irreversibilmente la prognosi dell'infezione. In questo primo stadio di malattia è sconsigliato l'uso di cortisonici<sup>74</sup>.

Il fatto di non disporre di farmaci completamente efficaci spinge il medico di famiglia a non interferire, per quanto possibile, nel meccanismo fisiologico di limitazione della replicazione virale rappresentato dalla febbre nei pazienti sul territorio, in carico ai medici di medicina generale. Risulterebbe quindi sconsigliato l'uso dei FANS e anche del paracetamolo in questo tipo di pazienti.

Dai dati presenti in letteratura e relativi alla precedente epidemia di SARS, l'unico farmaco anti-infiammatorio non steroideo che sembrerebbe indicato per contrastare i primi sintomi sistemici sarebbe l'indometacina. Questo farmaco anti-infiammatorio non steroideo ha dimostrato di poter agire non solo come sintomatico, ma di poter essere in grado di contrastare anche la viremia<sup>75</sup>.

Il supporto respiratorio con ossigenoterapia è cruciale fin dal primo stadio della malattia.

L'ambroxolo ad alte dosi per bocca potrebbe essere utile come stimolante degli pneumociti di tipo II a una maggiore produzione di surfattante alveolare<sup>76</sup>.

Farmaci in grado di inibire il meccanismo di entrata del virus catepsina L dipendente potrebbero dimostrarsi utili nel ridurre la progressione della malattia da SARS-CoV-2. Il blocco della catepsina L potrebbe inoltre contribuire a ridurre il danno immunopatologico mediato dal complemento<sup>77</sup>.

La teicoplanina e gli altri antibiotici della stessa classe (glicopeptidici) sembrano essere in grado di bloccare in maniera efficace l'entrata dei coronavirus SARS correlati<sup>78</sup>. I macrolidi, spesso impiegati a domicilio nelle prime fasi di malattia non hanno ancora evidenziato una reale efficacia terapeutica, rimane però ragionevole associarli all'idrossiclorochina per evitare sovrapposizioni batteriche.

In caso di diarrea, sarebbe ragionevole somministrare mesalazina, perché dotata, oltre che di effetto anti-infiammatorio, anche di effetto immuno-modulatore<sup>79</sup>.

I segni prognostici sfavorevoli, secondo le ultime Linee guida cinesi, settima edizione, sono i seguenti: linfocitopenia progressiva, aumento progressivo di citochine infiammatorie come IL-6, PCR, aumento progressivo di LDH, progressione rapida di alterazioni radiologiche polmonari in poco tempo.

Purtroppo, allo stato attuale una percentuale di pazienti CoViD-19 positivi, pari a circa il 10%, specialmente di età avanzata e con comorbidità, accede ai reparti ospedalieri e alle terapie intensive per insufficienza respiratoria rapidamente progressiva. Qui i pazienti vengono trattati con l'anti-retrovirale remdesivir in associazione con la cloroquina per via naso-gastrica. Questo farmaco è stato sviluppato per combattere l'Ebola ma non si è dimostrato efficace. Tuttavia, su studi animali è stato dimostrato che remdesivir ha qualche effetto sia contro MERS che SARS<sup>80</sup>, legittimandone l'utilizzo contro SARS-CoV-2<sup>81</sup>. Non è chiaro come remdesivir funzioni, sebbene si pensi che esso possa bloccare la replicazione dell'RNA<sup>82</sup>. Ove non ancora disponibile il remdesivir, viene intrapresa terapia con lopinavir/ritonavir, sempre attraverso sondino naso-gastrico.

Nei pazienti con elevati valori plasmatici di IL-6, indicativi di una drammatica attivazione della "tempesta citochinica", viene iniziato il trattamento con tocilizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6. Questo farmaco frena la cascata citochinica che consegue all'attivazione delle vie di segnalazione intracellulare innescata dal legame dell'IL-6 con il suo recettore.

Il tocilizumab si è dimostrato migliorare la prognosi nei pazienti con polmonite interstiziale in fase avanzata di malattia<sup>83</sup>, riducendo la necessità del ricorso estremo a tecniche di purificazione ematica volte a ridurre la concentrazione ematica di citochine infiammatorie, di difficile attuazione.

Il ricorso alla terapia cortisonica è consigliato solo in casi selezionati, perché gli alti e prolungati dosaggi che sarebbero necessari per contrastare i danni infiammatori e fibrotici provocherebbero un ulteriore aggravamento dello stato immunodepressivo già severo in corso. La settima edizione delle Linee guida cinesi per il trattamento di CoViD-19 del 3 marzo 2020 mette costantemente in evidenza l'importanza di mantenere sempre costante l'equilibrio idroelettrolitico e acido-base dei pazienti, il compenso cardio-circolatorio e il buon controllo di eventuali altre comorbidità e sovra-infezioni batteriche. Come abbiamo visto nella sezione patogenetica della ma-

### Take home messages.

- La stratificazione dei pazienti ad alto rischio di sviluppare complicanze polmonari severe e il trattamento terapeutico tempestivo, sotto stretto monitoraggio clinico, ematochimico e radiologico rappresentano un'urgenza per il Sistema Sanitario Territoriale e l'unica strategia possibile per ridurre gli accessi ai reparti di terapia intensiva e la letalità per CoViD-19.
- I punti critici su cui è necessario intervenire sono rappresentati da:
  - Implementazione della capacità di individuare il maggior numero di casi possibili CoViD-19 positivi, tramite tampone diagnostico su segnalazione del medico di medicina generale.
  - Percorsi di radiodiagnostica CoViD-19-dedicati.
  - Servizi infermieristici territoriali per il prelievo ematico e il monitoraggio dell'emocromo, della PCR, della funzionalità epato-renale, dell'NT-pro-BNP, di altri indici di progressione fibrotica quali la beta-2-microglobulina o l'ACE.
  - Telemonitoraggio intensivo sul territorio dei pazienti CoViD-19 con saturimetri e sfigmomanometri laddove possibile in modalità bluetooth ed eventuale monitoraggio eco-toracico domiciliare
  - Erogazione dei farmaci anti-CoViD-19 sul territorio, da somministrare in fase iniziale (massimo entro 72 ore dall'esordio dei primissimi sintomi) ai pazienti CoViD-19 individuati dal medico di medicina generale.

lattia, la sindrome respiratoria acuta è determinata da uno stato di immunodepressione conseguente a CoViD-19 da una parte e da un'iperattivazione infiammatoria e pro-fibrotica dall'altra.

Pertanto il paziente critico potrebbe beneficiare anche di: trasfusione di plasma già sierconvertito da pazienti convalescenti da SARS-CoV-2, di immunoglobuline, di globuli rossi o piastrine concentrati, di stimolatori midollari per le diverse serie emopoietiche. In questi giorni, sta ormai entrando nel protocollo terapeutico delle forme avanzate di interessamento polmonare bilaterale l'impiego delle eparine a basso peso molecolare, anche ad alte dosi per il sempre più frequente riscontro di severe complicanze tromboemboliche.

*Ringraziamenti:* il lavoro è stato parzialmente cofinanziato dalla Regione Toscana dal progetto TelTeC (Telemonitoraggio Territoriale della Cronicità, delibera della Giunta Regionale n. 805 del 24-07-2017) coordinato dal prof. Luca Fanucci del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Pisa.

*Conflitto di interessi:* gli autori dichiarano l'assenza di conflitto di interessi.

## Bibliografia

- Chan JF, 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: 221-36.
- Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med* 2020; 382: 1199-207.
- Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the chinese center for disease control and prevention. *JAMA* 2020 Feb 24.
- Porcheddu R, Serra C, Kelvin D, Kelvin N, Rubino S. Similarity in Case Fatality Rates (CFR) of COVID-19/SARS-CoV-2 in Italy and China. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14: 125-8.
- Livingston E, Bucher K. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Italy. *JAMA*. 2020.
- Xu X, Yu C, Zhang L, Luo L, Liu J. Imaging features of 2019 novel coronavirus pneumonia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020.
- Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J Virol*. 2020.
- Imai Y, Kuba K, Penninger JM. [Lessons from SARS: a new potential therapy for acute respiratory distress syndrome (ARDS) with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)]. *Masui*. 2008;57(3):302-10.
- Kuba K, Imai Y, Rao S, Jiang C, Penninger JM. Lessons from SARS: control of acute lung failure by the SARS receptor ACE2. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(10):814-20.
- Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation and treatment Coronavirus (COVID-19). *Treasure Island (FL): StatPearls*, 2020.
- 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 Mar 4.
- Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *J Virol* 2019; 93(6).
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395: 565-74.
- Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M. The 2019-new coronavirus epidemic: evidence for virus evolution. *J Med Virol* 2020; 92: 455-9.
- Angeletti S, Benvenuto D, Bianchi M, Giovanetti M, Pascarella S, Ciccozzi M. COVID-2019: the role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. *J Med Virol* 2020 Feb 21.
- Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 2020; 12: 8.
- Wu Y. Compensation of ACE2 function for possible clinical management of 2019-nCoV-induced acute lung injury. *Virol Sin* 2020 Feb 7.
- Chen IY, Chang SC, Wu HY, et al. Upregulation of the chemokine (C-C motif) ligand 2 via a severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-ACE2 signaling pathway. *J Virol* 2010; 84: 7703-12.
- 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 Mar 17.
- Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* 2020; 104: 246-51.
- 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: 1177-9.
- Bai Y, Yao L, Wei T, et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. *JAMA* 2020 Feb 21.
- Cheng VCC, Wong SC, Chen JHK, et al. Escalating infection control response to the rapidly evolving epidemiology of the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) due to SARS-CoV-2 in Hong Kong. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020; 1-24.
- Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCoV. Disponibile su: <https://bit.ly/3bs4okz> (ultimo accesso 27 marzo 2020).
- Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005; 436: 112-6.
- Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J* 2010; 74: 405-10.
- Kuba K, Imai Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 271-6.
- Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 155-9.
- Muszalska I, Sobczak A, Dolhan A, Jelinska A. Analysis of sartans: a review. *J Pharm Sci* 2014; 103: 2-28.
- Gurwitz D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev Res* 2020 Mar 4.
- Casadevall A, Pirofski LA. The Ebola epidemic crystallizes the potential of passive antibody therapy for infectious diseases. *PLoS Pathogens* 2015; 11: e1004717.
- Zhou Y, Vedantham P, Lu K, et al. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res* 2015; 116: 76-84.
- Mire CE, Geisbert JB, Agans KN, et al. Passive immunotherapy: assessment of convalescent serum against Ebola Virus Makona Infection in nonhuman primates. *J Infect Dis* 2016; 214 (suppl 3): S367-S74.

35. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool? *Blood Transfus* 2016; 14: 152-7.
36. Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 2004; 279: 3197-201.
37. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003; 426: 450-4.
38. 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: 875-9.
39. Moore MJ, Dorfman T, Li W, et al. Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2. *J Virol* 2004; 78: 10628-35.
40. Haschke M, Schuster M, Poglitsch M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in healthy human subjects. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52: 783-92.
41. Zhang H, Baker A. Recombinant human ACE2: acting out angiotensin II in ARDS therapy. *Crit Care* 2017; 21: 305.
42. Li LQ, Huang T, Wang YQ, et al. 2019 novel coronavirus patients' clinical characteristics, discharge rate and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol* 2020 Mar 12.
43. Lake MA. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. *Clin Med (Lond)* 2020; 20: 124-7.
44. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med* 2020 Mar 4.
45. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020 Feb 28.
46. Albarello F, Pianura E, Di Stefano F, et al. 2019-novel Coronavirus severe adult respiratory distress syndrome in two cases in Italy: an uncommon radiological presentation. *Int J Infect Dis* 2020; 93: 192-7.
47. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005; 280: 30113-9.
48. Simmons G, Zmora P, Gierer S, Heurich A, Pohlmann S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Res* 2013; 100: 605-14.
49. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 2020; 7: 11.
50. Liang W, Feng Z, Rao S, et al. Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut* 2020 Feb 26.
51. Dong Y, Mo X, Hu Y, et al. Epidemiological characteristics of 2143 pediatric patients with 2019 Coronavirus Disease in China. *Pediatrics* 2020 Mar 16.
52. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020 Mar 12.
53. Rockx B, Baas T, Zornetzer GA, et al. Early upregulation of acute respiratory distress syndrome-associated cytokines promotes lethal disease in an aged-mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol* 2009; 83: 7062-74.
54. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497-506.
55. Venkataraman T, Frieman MB. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis. *Antiviral Res* 2017; 143: 142-50.
56. Liu W, Tao ZW, Lei W, et al. Analysis of factors associated with disease outcomes in hospitalized patients with 2019 novel coronavirus disease. *Chin Med J (Engl)* 2020 Feb 28.
57. Cai H. Sex difference and smoking predisposition in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med* 2020 Mar 11.
58. Lippi G, Henry BM. Active smoking is not associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Eur J Intern Med* 2020 Mar 16.
59. Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome Coronavirus infection. *J Immunol* 2017; 198: 4046-53.
60. Liu J, Ji H, Zheng W, et al. Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17beta-oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol Sex Differ* 2010; 1: 6.
61. Salvati L, Vitiello G, Parronchi P. Gender differences in anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019; 19: 417-24.
62. Johansson KA, Balmes JR, Collard HR. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease? *Chest* 2015; 147: 1161-7.
63. 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 Feb 24.
64. Oudit GY, Kassiri Z, Jiang C, et al. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 618-25.
65. Mattiuzzi C, Lippi G. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? *Ann Transl Med* 2020; 8: 48.
66. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* 2020 Feb 19.
67. 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 Feb 7.
68. Chan JF, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020; 395: 514-23.
69. Colson P, Rolain JM, Lagier JC, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020: 105932.
70. Fan HH, Wang LQ, Liu WL, et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J (Engl)* 2020 Mar 6.
71. Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020 Mar 18.
72. Lim J, Jeon S, Shin HY, et al. Case of the Index patient who caused tertiary transmission of COVID-19 Infection in Korea: the Application of lopinavir/ritonavir for the treatment of COVID-19 Infected Pneumonia monitored by quantitative RT-PCR. *J Korean Med Sci* 2020; 35: e79.
73. Li H, Wang YM, Xu JY, Cao B. [Potential antiviral therapeutics for 2019 Novel Coronavirus]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2020; 43: 170-2.
74. Russell CD, Millar JE, Baillie JK. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet* 2020; 395: 473-5.

75. Amici C, Di Caro A, Ciucci A, et al. Indomethacin has a potent antiviral activity against SARS coronavirus. *Antivir Ther* 2006; 11: 1021-30.
76. Zhang SJ, Jiang JX, Ren QQ, et al. Ambroxol inhalation ameliorates LPS-induced airway inflammation and mucus secretion through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 2016; 775: 138-48.
77. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 2013; 39: 1143-57.
78. Zhou N, Pan T, Zhang J, et al. Glycopeptide antibiotics potently inhibit cathepsin L in the late endosome/lysosome and block the entry of Ebola Virus, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV). *J Biol Chem* 2016; 291: 9218-32.
79. Zhou Y, Hou Y, Shen J, Huang Y, Martin W, Cheng F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discov* 2020; 6: 14.
80. Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *ChemBiochem* 2020; 21: 730-8.
81. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105924.
82. Brown AJ, Won JJ, Graham RL, et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 2019; 169: 104541.
83. Morrono CD, Zarza LP, Gil JG, Pinto Tasende JA, Diez PD, Lopez JM. Benefit of tocilizumab therapy for adult-onset still disease complicated with acute respiratory distress syndrome. *J Clin Rheumatol* 2016; 22: 291-3.
84. Du L, Kao RY, Zhou Y, et al. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 174-9.
85. Ren JL, Zhang AH, Wang XJ. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment. *Pharmacol Res* 2020; 155: 104743.
86. Zhang DH, Wu KL, Zhang X, Deng SQ, Peng B. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. *J Integr Med* 2020; 18: 152-8.