

Arcispedale S. Anna
Dipartimento di
Unità Operativa di Oculistica

Direttore Prof. Paolo Perri

Spett.le
Comitato Bioetica –AVEC
Emilia Romagna

Ferrara, maggio 2020

Oggetto: Richiesta approvazione del progetto di ricerca spontaneo dal titolo
**“Determinazione della risposta anticorpale nel fluido congiuntivale dei
pazienti affetti da Covid-19: significato funzionale e prospettive cliniche e
prognostiche”**

Responsabile Scientifico:

Prof. Carlo Contini Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Malattie Infettive,
Azienda Ospedaliero-Universitaria ‘S. Anna’, Ferrara

Co-Principal Investigators:

Prof. Paolo Perri Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico-Specialistiche,
Università degli Studi di Ferrara; U.O. Oftalmologia, Azienda
Ospedaliero-Universitaria ‘S. Anna’ di Ferrara

Dr. Giuseppe Lamberti U.O. Oftalmologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria ‘S. Anna’,
Ferrara

Prof.ssa Elisabetta Caselli, Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Sezione di
Microbiologia, Università di Ferrara.

LEGENDA

FES fase di esordio sintomatico
FP fase polmonare
FSI fase della super-infiammazione
PCR proteina C reattiva
IL-6 interleuchina 6
FIBR fibrinogeno
D-d D dimero
MALT mucosa associated linfocitic tissue
s-IgA Immunoglobuline A secretorie
IgM Immunoglobuline M
IgG Immunoglobuline G

INTRODUZIONE

Covid-19

La malattia respiratoria a carattere sistemico (COVID-19) causata dal nuovo Coronavirus (SARS-CoV-2) tende generalmente a svilupparsi con modalità trifasica sotto il profilo temporale della storia naturale e sotto il profilo della dinamica fisiopatologica. Le tre fasi cliniche, precedute da un periodo di incubazione, possono essere da noi denominate: **a.** fase di esordio sintomatico (FES) con interessamento delle mucose congiuntivale, orale e delle prime vie aeree; **b.** fase con severo interessamento dell'interstizio polmonare (FP) documentato dalla diagnostica per immagini; e **c.** fase della super-infiammazione con attivazione massimale delle citochine (FSI) individuata da livelli soglia del d-dimero, della IL-6 con conseguente severa cascata citochinica (cytokine storm Syndrome), del fibrinogeno, della proteina C-reattiva.

LA RISPOSTA OCULARE

Nel contesto del corredo semeiologico e sintomatologico della patologia, l'interessamento oculare rappresentato da una **congiuntivite follicolare micro-emorragica**, costituisce un evento apparentemente non comune, con una incidenza variabile in rapporto alla sensibilità e alla accuratezza diagnostica e alla tipologia dei pazienti selezionati (3).

Le possibili interazioni tra SARS-CoV-2 e la mucosa congiuntivale potrebbero derivare dalle seguenti ipotesi:

- 1) la mucosa congiuntivale può rappresentare la “**porta**” di ingresso del virus;
- 2) la mucosa ed il sacco congiuntivale possono rappresentare il “**campo**” di replicazione e/o eliminazione del virione infettante, dato il rapporto di continuità anatomica e funzionale tra il sacco congiuntivale, canale nasolacrimale e meato medio delle fosse nasali.
- 3) la mucosa ed il sacco congiuntivale possono rappresentare il “**balcone**” di osservazione di una risposta immunitaria ed infiammatoria successiva alla attivazione del tessuto congiuntivale follicolare della lamina propria della congiuntiva palpebrale e tarsale dei centri MALT con follicoli ricchi di linfo-monociti e plasmacellule in differenziazione. Le immunoglobuline prodotte nei centri MALT della lamina propria della congiuntiva verrebbero trasportate, coniugate con fattori di secrezione ed immesse in senso di “**vernice protettiva**” delle mucose, nel fluido congiuntivale da parte delle cellule epiteliali.

RAZIONALE DELLO STUDIO

Ad oggi non si hanno informazioni documentate sulla presenza, -tipologia e cronologia della risposta immunitaria anticorpale nel fluido congiuntivale dei pazienti affetti da Covid-19. L'interesse scientifico alla rilevazione di tale risposta nasce dalla facilità di accesso al sacco congiuntivale, e dalla estrema maneggevolezza dei test selezionati per effettuare il prelievo del fluido congiuntivale (test Schirmer con carta bibula).

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Obiettivi primari del nostro studio sono:

1. dimostrare la presenza di immunoglobuline di superficie (s) s-IgA, IgM e IgG nel fluido congiuntivale dei pazienti Covid-19. L'eventuale presenza di queste, grazie all'impiego del test di Schirmer, che consente il prelievo non invasivo del fluido congiuntivale, potrebbe consentire di determinare il fenotipo immunologico, come informativo della risposta immunitaria del paziente.
2. evidenziare la eventuale correlazione tra presenza di sIg e indicatori clinici e sierologici, in modo da ottenere un dato utile in senso prognostico, al fine di "guidare" un possibile approccio terapeutico.

Obiettivi secondari sono:

1. Determinare la presenza e il titolo di SARS-Cov-2 nel sacco congiuntivale dei pazienti sintomatici
2. Determinare l'eventuale associazione tra presenza/titolo del virus nel sacco congiuntivale (e/o nel TNF) e produzione/rilascio di immunoglobuline secretorie nel liquido lacrimale
3. Determinare la presenza di citochine proinfiammatorie nel liquido lacrimale e l'associazione tra la presenza di queste e gli altri parametri clinici, virologici e sierologici dell'infezione.

MATERIALI E METODI

Disegno di studio: studio caso-controllo

Popolazione di studio: pazienti Covid-19 positivi

Definizione caso vs controllo: i pazienti Covid-19 con tampone nasofaringeo (TNF) risultato positivo per RNA di SARS-Cov-2 e classificati in una delle tre fasi cliniche predefinite suesposte.

Caso: pazienti affetti da Covid-19 TNF positivi

Controllo: pazienti asintomatici e negativi al TNF

Fattore di esposizione

Primario: ricerca di S-IgA, S-IgM, S-IgG nel fluido congiuntivale

Covariate:

Presenza di congiuntivite clinicamente rilevante

Studio siero-immunologico, al fine di evidenziare la presenza di IgG e /o IgM

Valutazione quantitativa dell'RNA virale nel fluido congiuntivale e sua correlazione con la presenza rilevata nel nel TNF

Valutazione quantitativa di citochine pro-infiammatorie nel fluido congiuntivale

Sottoanalisi:

Risposta alle terapie approntate in relazione al quadro anticorpale di partenza rilevato nel fluido congiuntivale

Rilevazione plasmatica indici di flogosi (PCR) oltrechè di IL-6, Fibrinogeno, D- dimero

Reclutamento casi e controlli: i pazienti vengono reclutati nei reparti Covid della Azienda Ospedaliera Universitaria o della Azienda Usl Fe.

Strumenti di raccolta dati:

Test di Schirmer seriale effettuato su entrambi gli occhi dei pazienti all'atto del ricovero, dopo 3 giorni e all'atto della dimissione. Referenze (1,2) per il dettaglio delle modalità esecutive.

Per ogni paziente e per ogni occhio verranno raccolte tre tacche di striscia bibula "Schirmer" inserite nel sacco congiuntivale; le strisce verranno poi immerse in 400 microlitri di soluzione fisiologica NaCl 0.9% per 36 ore in modo da consentire il rilascio in soluzione dei fattori adsorbiti e prelevati. Il fluido sarà suddiviso in aliquote da 200 microlitri, congelate istantaneamente in azoto liquido e conservate a -80 gradi centigradi fino al momento dell'uso.

1) numero pazienti arruolabili minimo 60;

2) La presenza e il titolo di immunoglobuline IgA, IgG e IgM saranno valutati sia nel siero/plasma dei pazienti che nel liquido congiuntivale mediante specifici test kit immunoenzimatici (ELISA).

In particolare, le IgA saranno saggiate mediante "Anti-SARS-Cov-2 ELISA (IgA)" CE-IVD (EUROIMMUN), saggio semiquantitativo in vitro per la determinazione di anticorpi umani di classe IgA diretti contro il SARS-CoV-2, riconosciuto come dispositivo medico-diagnostico in vitro.

Analogamente, le IgG verranno analizzate mediante "Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)" CE-IVD (EUROIMMUN), saggio semiquantitativo anch'esso riconosciuto come dispositivo medico-diagnostico in vitro.

Le IgM saranno analizzate mediante il test "VIROTECH SARS-CoV-2 IgM ELISA" (EUROFINS), CE-IVD, in grado di evidenziare la specifica presenza di questa classe di anticorpi.

La presenza e quantificazione di RNA di SARS-Cov-2 sarà effettuata mediante estrazione degli acidi nucleici totali da un'aliquota di 200 microlitri di fluido congiuntivale (kit Viral TNA, Promega) e successiva analisi in real-time PCR quantitativa (Singleplex kit, CE-IVD, Thermo Fisher).

Database:

- Sesso
- Anno di nascita
- Comorbidità
- Sintomi di esordio della Covid-19
- Tipologia di trattamento del Covid-19
- Livelli ematici di PCR, IL-6, Fibrinogeno, D-dimero.

RISULTATI ATTESI E RILEVANZA CLINICA

Nel contesto della storia naturale della malattia Covid-19 i meccanismi della risposta immunitaria sono non sono ancora ben descritti e definiti:

La presenza di una risposta immunitaria rilevabile in maniera semplice e non invasiva attraverso una strisciolina di carta bibula inserita per circa 1 minuto nel sacco congiuntivale dei pazienti potrebbe essere una ulteriore e preziosa fonte di informazione epidemiologica e clinica da correlare ai dati ottenuti mediante TNF e determinazioni sierologiche su plasma.

La contemporanea analisi della presenza di virus nel sacco congiuntivale potrebbe fornire un ulteriore dato per associare la risposta locale secretoria al carico virale locale e alla presenza determinata mediante TNF.

I risultati potrebbero quindi essere estremamente utili per proporre l'utilizzo del test di Schirmer in aggiunta (o parziale sostituzione) dei test virologici e immunologici finora utilizzati.

Come già accennato, tale risposta potrebbe essere associata agli indicatori clinici e sierologici della storia naturale della malattia, consentendo la determinazione del fenotipo immunologico come informativo della risposta immunitaria del paziente e, nel caso fosse possibile individuare una correlazione clinica, come indicatore prognostico e, quindi, come guida all'approccio terapeutico.

1. CRONOGRAMMA

Attività									
Approvazione CE									
Definizione del protocollo e del team di ricerca									
Raccolta dati Schirmer test									
Raccolta dati clinici									
Analisi statistica dei dati									
Disseminazione preliminare dei risultati									
Disseminazione scientifica finale (pubblicazione)									

Bibliografia

- 1) J Cell Physiol. 2009 Jan;218(1):199-204. doi: 10.1002/jcp.21589.
Conjunctival sac fluid contains elevated levels of soluble TRAIL: implications for the anti-tumoral surveillance of the anterior surface of the eye.
Secchiero P1, Lamberti G, Corallini F, Melloni E, Guarnotta C, Sebastiani A, Zauli G.
- 2) Mediators of inflammation, (2015): 942948-942948
Kinetic Profiles of Inflammatory Mediators in the Conjunctival Sac Fluid of Patients upon Photorefractive Keratectomy.
Veronica Tisato, Paolo Perri, Erika Rimondi, Elisabetta Melloni, Giuseppe Lamberti, Daniela Milani, Paola Secchiero, Giorgio Zauli
- 3) The Lancet, online-report <https://www.researchgate.net/publication/340827789>
Ocular manifestations and tear or conjunctival swab Pcr positivity for 2019-ncov in patients with covid-19: a systematic review and meta-analysis, april 2020.
Ph.Sarma et al.

TEST ELISA PER IgM (quantitativo); eventualmente disponibili anche per IgG (quantitativo), solo RUO:

<https://www.listarfish.it/news/analisi-e-studio-dei-virus>



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Ferrara

