

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo 36

**Settore Concorsuale:** 06/G1 - PEDIATRIA GENERALE, SPECIALISTICA E NEUROPSICHIATRIA  
INFANTILE

**Settore Scientifico Disciplinare:** MED/38 - PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA

STUDIO DEL DANNO ENDOTELIALE NEI PAZIENTI PEDIATRICI CON  
DIAGNOSI DI MALATTIA DI KAWASAKI, SINDROME INFIAMMATORIA  
MULTISISTEMICA NEI BAMBINI E INFEZIONE ACUTA DA SARS-COV-2

**Presentata da:** Laura Andreozzi

**Coordinatore Dottorato**

Susi Pelotti

**Supervisore**

Marcello Lanari

**Co-supervisore**

Arianna Aceti

**Esame finale anno 2024**

# SOMMARIO

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
<b>MALATTIA DI KAWASAKI .....</b>	<b>3</b>
<i>Epidemiologia.....</i>	4
<i>Eziopatogenesi.....</i>	6
<i>Anatomia patologica.....</i>	9
<i>Clinica.....</i>	11
<i>Esami di laboratorio e strumentali.....</i>	17
<i>Trattamento.....</i>	20
<i>Prognosi.....</i>	23
<i>Danno endoteliale nella KD.....</i>	25
<b>KD E PANDEMIA DA SARS-COV-2: LA MULTISYSTEM INFLAMMATORY SYNDROME IN CHILDREN .....</b>	<b>27</b>
<i>Epidemiologia.....</i>	28
<i>Eziopatogenesi.....</i>	29
<i>Anatomia patologica.....</i>	32
<i>Clinica.....</i>	33
<i>Esami di laboratorio e strumentali.....</i>	35
<i>Diagnosi.....</i>	37
<i>Trattamento.....</i>	39
<i>Danno endoteliale nella MIS-C.....</i>	41
<b>INFEZIONE DA SARS-COV-2 IN ETÀ PEDIATRICA .....</b>	<b>43</b>
<i>Eziopatogenesi.....</i>	44
<i>Clinica.....</i>	45
<i>Terapia.....</i>	47
<i>Danno endoteliale nell'infezione da SARS-CoV-2.....</i>	49
<b>CELLULE ENDOTELIALI CIRCOLANTI.....</b>	<b>53</b>
<i>Cellule endoteliali circolanti e cellule endoteliali progenitrici circolanti.....</i>	54
<i>Impiego del dosaggio delle CECs.....</i>	58
<i>Il dosaggio delle CECs nella Malattia di Kawasaki.....</i>	59
<i>Il dosaggio delle CECs nell'infezione da SARS-CoV-2.....</i>	62
<b>RAZIONALE DELLO STUDIO .....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>66</b>
<b>PAZIENTI .....</b>	<b>66</b>
<b>SISTEMA CELLSEARCH®.....</b>	<b>67</b>
<b>ANALISI STATISTICA .....</b>	<b>69</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>70</b>
<b>PAZIENTI .....</b>	<b>70</b>
<b>CONTA DELLE CECs IN FASE ACUTA E SUBACUTA .....</b>	<b>75</b>
<b>CONTEGGIO DELLE CECs E DATI CLINICO-LABORATORISTICI E DI TERAPIA.....</b>	<b>78</b>
<b>CONTEGGIO DELLE CECs E GRAVITÀ DELLA MALATTIA .....</b>	<b>79</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>80</b>
<b>LIMITI .....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>87</b>

## **ABSTRACT**

**Background:** La malattia di Kawasaki (KD) e la Sindrome Infiammatoria Multisistemica nei bambini (MIS-C) sono malattie pediatriche caratterizzate da un'intensa infiammazione sistemica e danno vascolare, con potenziale sviluppo di lesioni delle arterie coronarie (CALs), nello specifico dilatazioni e aneurismi. Anche negli adulti con malattia acuta da SARS-CoV-2 (AC19) sono state documentate un'infiammazione multisistemica e una disfunzione endoteliale, principali responsabili del danno multiorgano. Nonostante nel bambino la clinica associata all'AC19 sia meno severa o paucisintomatica, i meccanismi di danno endoteliale sembrano gli stessi. L'obiettivo primario del presente studio è stato di indagare il danno endoteliale nei pazienti pediatrici con KD, MIS-C e AC19, tramite la conta delle cellule endoteliali circolanti (CECs), cellule mature che si distaccano dalla tonaca intima del vaso in risposta al danno endoteliale. Obiettivo secondario è stato di valutare un'eventuale correlazione tra le CECs e la gravità della malattia per tutte e tre le patologie indagate.

**Materiali e metodi:** È stato condotto uno studio prospettico, in cui sono stati arruolati tutti i pazienti con diagnosi di KD e MIS-C tra ottobre 2020 e giugno 2021 in 2 Unità Operative Pediatriche (IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna e Ospedale Ramazzini di Carpi) in Emilia-Romagna e tutti i bambini con diagnosi di AC19 ricoverati presso l'Unità Operativa di Pediatria d'Urgenza, Pronto Soccorso Pediatrico e Osservazione Breve Intensiva dell'IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna nello stesso intervallo di tempo. Le CECs sono state enumerate mediante la tecnologia CELLSEARCH®, metodica di separazione immunomagnetica associata a microscopia a fluorescenza per il target CD146 dal sangue intero.

**Risultati:** Sono stati arruolati in totale 39 pazienti, di cui 9 KD, 20 MIS-C e 10 AC19. Durante la fase acuta, i pazienti con AC19 e KD avevano livelli di CECs più elevati rispetto ai pazienti con MIS-C. Dalla fase acuta a quella subacuta, è stato osservato un aumento significativo delle CECs nei pazienti con KD, mentre è stata rilevata una lieve diminuzione nei pazienti con MIS-C. Non è stata trovata alcuna correlazione tra CECs e CALs nei pazienti MIS-C. L'incidenza dei CALs nel gruppo KD è stata troppo bassa per indagare questa correlazione. Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra CECs e la gravità di malattia.

**Conclusioni:** I risultati del presente studio suggeriscono una profonda differenza nella patogenesi del danno endoteliale tra KD e MIS-C, sebbene le possibili complicanze vascolari che possono verificarsi nelle due malattie siano simili. Inoltre, i livelli di CECs potrebbero rappresentare uno strumento aggiuntivo per differenziare la KD dalla MIS-C all'esordio di malattia e per formulare la prognosi cardiovascolare a lungo termine di questi pazienti. Ulteriori studi più ampi sono necessari per confermare i risultati ottenuti.

## INTRODUZIONE

### Malattia di Kawasaki

La malattia di Kawasaki (KD), conosciuta anche come sindrome muco-cutanea linfonodale, è una vasculite acuta sistemica che colpisce i vasi di piccolo e medio calibro di tutti i distretti dell'organismo, temporalmente autolimitat, ad eziologia sconosciuta, che interessa prevalentemente lattanti e bambini di età inferiore a 5 anni<sup>1</sup>.

È stata osservata per la prima volta in Giappone nel 1961 da Tomisaku Kawasaki, in un bambino di circa 4 anni, ricoverato per febbre alta persistente, congiuntivite, rash cutaneo diffuso e lingua a fragola. Questa particolare associazione di sintomi, la non responsività alla terapia antibiotica e l'autorisoluzione della patologia dopo circa 2 settimane, associata ad una specifica desquamazione delle dita delle mani e dei piedi, fece sospettare al Dott. Kawasaki di essere di fronte ad una nuova misteriosa malattia. Nel 1967, Kawasaki pubblica una raccolta di 50 casi affetti da tale patologia, che lui definisce "sindrome muco-cutanea linfonodale" su un giornale giapponese, non potendo dunque giovare la comunità scientifica internazionale<sup>2</sup>. Nel 1974, egli riporta i casi in un articolo pubblicato sul *Journal of Pediatrics*<sup>3</sup>. Non è noto se, prima di queste osservazioni, la KD fosse una patologia già presente, ma alcuni autori hanno addirittura ipotizzato, pur non conoscendone l'agente eziologico, che essa possa essere stata introdotta in Giappone durante il conflitto della Seconda guerra mondiale, diffondendosi poi verso occidente<sup>4</sup>. In quegli stessi anni la questione più dibattuta era se la patologia descritta dal Dott. Kawasaki, caratterizzata principalmente da febbre elevata e persistente e esantema cutaneo fosse un quadro patologico autolimitantesi senza complicanze oppure correlabile ad un numero cospicuo di casi con alterazioni cardiologiche. Tale disputa viene risolta al tavolo autoptico nel 1970, con il riscontro di anomalie coronariche in bambini con KD e morte improvvisa<sup>4</sup>. Da allora il link tra la compromissione cardiaca ed in particolare delle arterie coronarie e la KD è stato ben supportato da forti evidenze scientifiche, caratterizzandola come la principale e più temibile complicanza. In quegli stessi decenni, la KD fu riconosciuta come un'entità nosologica a sé stante in altre aree del mondo, ad iniziare dalle Hawaii, in particolare in bambini di etnia asiatica, elemento che tuttora lascia presupporre una predisposizione genetica di queste popolazioni a contrarla.

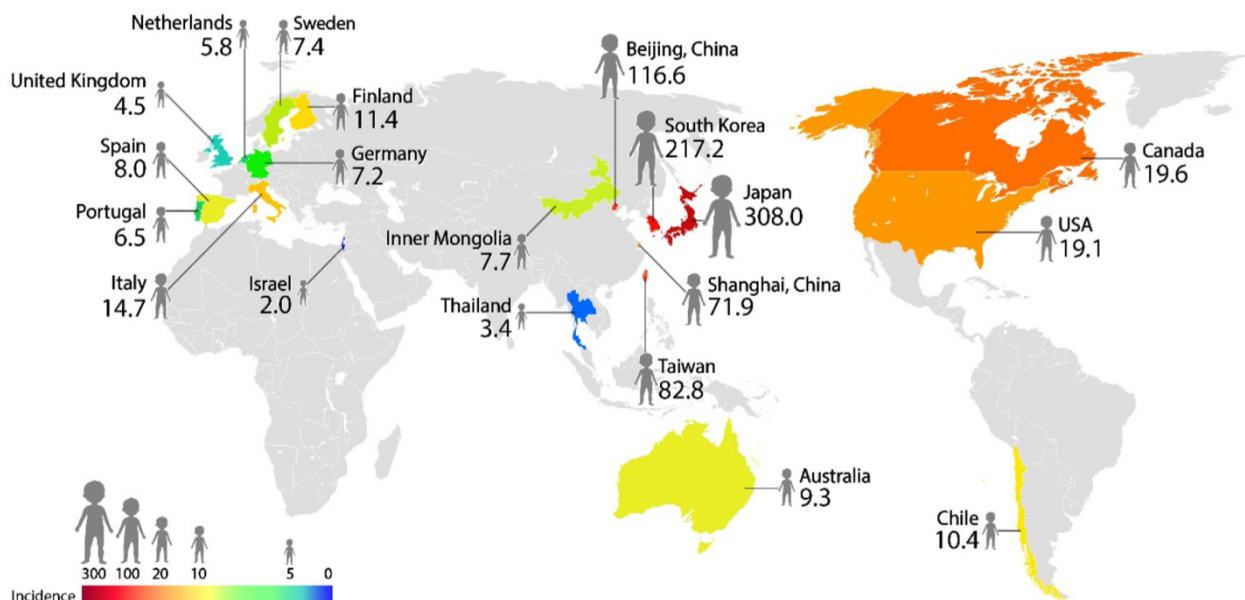
È del 1978 la prima definizione da parte dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dei criteri di identificazione della KD e dell'istituzione nel 1984 di un registro ufficiale, che permetteva di definirne un'incidenza annuale negli Stati Uniti compresa tra 4 e 15 casi per 100000 bambini di età inferiore a 5 anni, mentre in Giappone l'incidenza, ben maggiore, si attestava attorno ai 120, 150 casi per 100000 per la stessa fascia d'età.

Dal punto di vista clinico, la KD è caratterizzata da febbre di durata superiore a 5 giorni associata ad almeno 4 su 5 dei seguenti segni clinici: congiuntivite bulbare bilaterale non essudativa, alterazioni delle labbra e della mucosa orale, anomalie delle estremità, esantema polimorfo e linfadenopatia laterocervicale. I suddetti segni clinici costituiscono i criteri classici utilizzati per stabilire la diagnosi di KD<sup>1</sup>. Ai pazienti che non presentano sufficienti criteri clinici principali può essere diagnosticata una KD incompleta<sup>1</sup>.

Le complicanze più temibili della KD sono le lesioni a carico delle arterie coronarie (*coronary artery lesions* o CALs), che includono principalmente dilatazioni e aneurismi, da cui consegue il rischio di infarto miocardico acuto (IMA), cardiopatia ischemica e morte improvvisa<sup>1</sup>. Tali anomalie coronariche si sviluppano nel 15-25% dei pazienti non trattati, mentre l'incidenza scende a meno del 5% quando la terapia con immunoglobuline per via endovenosa (IVIG) viene correttamente somministrata entro il decimo giorno dall'esordio della febbre<sup>1</sup>.

### Epidemiologia

Nei paesi sviluppati la KD rappresenta la causa principale di cardiopatia acquisita nei bambini<sup>1</sup>. I dati della letteratura medica più recenti relativi all'incidenza della KD, indicano tassi differenti in diverse aree del mondo (**Figura 1**).



**Figura 1. Incidenza della KD nel mondo (indicata come numero di bambini affetti su 100000 bambini di età inferiore a 5 anni).**

L'incidenza nei paesi del Nord-Est asiatico, tra cui Giappone, Corea del Sud, Cina e Taiwan, è da 10 a 30 volte superiore a quella negli Stati Uniti o nei paesi europei<sup>5</sup>. Inoltre, l'incidenza della KD sembra essere in continuo aumento nei paesi del Nord-Est asiatico<sup>6</sup>, mentre sembra essere stazionaria in Nord America ed Europa<sup>7,8</sup>.

Gli ultimi dati in letteratura relativi al Giappone indicano un'incidenza di 308 per 100000 bambini di età inferiore ai 5 anni<sup>6</sup>, tassi di molto superiori ai dati di circa 15 anni prima, in cui l'incidenza era riportata pari a circa 112 casi su 100000 bambini di età inferiore a 5 anni<sup>9</sup>.

Al di fuori dei Paesi del Nord-Est asiatico, l'incidenza della KD è significativamente più bassa. Negli Stati Uniti è stata di 19.1 per 100000 bambini di età inferiore ai 5 anni nel 2015, mentre in Canada è stata di 19.6 per 100000 bambini di età inferiore ai 5 anni nel 2014<sup>8</sup>. Un dato interessante dell'epidemiologia della KD negli Stati Uniti è che i bambini di origine asiatica e delle isole del Pacifico hanno avuto la più alta incidenza di KD tra le varie etnie. Soprattutto nelle Hawaii, l'incidenza della KD nei nippo-americani è simile a quella del Giappone (più di 200 su 100000 bambini di età inferiore ai 5 anni), dato che suggerisce una profonda suscettibilità genetica all'insorgenza della KD<sup>1</sup>.

I dati epidemiologici relativi ai paesi europei sono scarsi. La maggior parte degli studi è stata condotta nei Paesi dell'Europa settentrionale e occidentale, mentre poco si sa dell'epidemiologia della KD nei Paesi dell'Europa orientale. Il range del tasso di incidenza è ampio, con un minimo di 1.6 per 100000 bambini sotto i 5 anni nella Repubblica Ceca e un massimo di 14.7 in Italia<sup>10</sup>. I tassi europei, come quelli americani, sembrano essere rimasti stabili nel tempo<sup>10</sup>.

La KD ha una maggiore incidenza nei maschi, con un rapporto maschi:femmine pari a 1.5-1.7:1<sup>1</sup>. Il picco della KD si registra tra i 9 e gli 11 mesi di età; il 50% dei bambini ha età inferiore a 2 anni ed il 76% inferiore a 5 anni<sup>1</sup>. Nei bambini di età superiore a 5 anni e nei bambini di età inferiore ai 12 mesi, la diagnosi risulta più difficile, con un aumentato rischio di trattamento ritardato e di complicanze coronariche<sup>1</sup>. Sebbene sia una patologia tipicamente dell'età pediatrica, sono stati descritti alcuni casi in adulti. In età adulta, la KD colpisce soprattutto giovani, con un'età media alla diagnosi di 31 anni (range 18-68 anni) e una leggera prevalenza di maschi (rapporto maschi:femmine pari a 1.2:1)<sup>11</sup>. La malattia è rara e spesso diagnosticata tardivamente, con un tempo mediano di diagnosi di 13 giorni, shock cardiogeno nel 5% dei casi e un'alta percentuale di aneurismi coronarici (pari a circa il 19% dei casi)<sup>11</sup>.

I tassi di recidiva e di familiarità della KD sono meglio documentati nella letteratura giapponese e sembrano essere inferiori nelle altre etnie. La letteratura giapponese riporta un tasso di ricorrenza

della KD pari a circa il 3%, una mortalità pari allo 0.015% e un tasso di incidenza pari a circa l'1% nei pazienti con una storia familiare positiva<sup>1</sup>.

In Europa, invece, la KD sembra avere una ricorrenza inferiore al 2.5% dei casi, con una mortalità inferiore allo 0.5%<sup>10</sup>. I casi familiari sono rari, riportati in meno dell'1% dei casi in parenti di primo e secondo grado<sup>12</sup>.

La mortalità nella KD è essenzialmente correlata alle sequele coronariche<sup>1</sup>. Il picco di mortalità si verifica da 15 a 45 giorni dopo l'insorgenza della febbre, durante i quali l'infiammazione delle arterie coronarie si associa ad un marcato innalzamento della conta piastrinica e ad uno stato di ipercoagulabilità<sup>1</sup>. Tuttavia, la morte improvvisa per IMA può verificarsi anche molti anni dopo in bambini e adulti con aneurismi e stenosi coronariche. Molti casi di IMA (fatale e non fatale) in giovani adulti sono stati attribuiti alla KD non diagnosticata nell'infanzia<sup>13</sup>. Infatti, uno studio del 2012 di Daniels et al., mostra che, tra gli adulti di età inferiore ai 40 anni con sospetta ischemia miocardica sottoposti ad angiografia coronarica a San Diego, circa il 5% presentava lesioni compatibili con le sequele tardive della KD<sup>14</sup>.

I casi di KD presentano una variazione stagionale con diffusione variabile, apparentemente ad ondate epidemiche<sup>1</sup>. Negli Stati Uniti la KD risulta essere più frequente nei mesi invernali e nei primi mesi primaverili<sup>1</sup>. In letteratura è stata riportata una stagionalità definita con un'ampia coerenza nelle fluttuazioni dei casi di KD alle latitudini extra-tropicali dell'emisfero settentrionale, con un picco da gennaio a marzo (circa il 40% in più rispetto ai mesi in cui il numero di casi era più basso) e un nadir durante i mesi di agosto e settembre<sup>15</sup>. I dati erano più scarsi per i tropici e per le latitudini extra-tropicali dell'emisfero meridionale, ma suggerivano un picco tra maggio e giugno, con un numero di casi superiore di circa il 30% rispetto ai mesi meno attivi di febbraio, marzo e ottobre<sup>15</sup>.

### *Eziopatogenesi*

L'eziologia della KD, dopo oltre 50 anni dalla sua scoperta, rimane ancora sconosciuta. L'analisi delle caratteristiche epidemiologiche e la comprensione della risposta immunitaria hanno permesso la formulazione di diverse ipotesi che delineano il quadro di una malattia a patogenesi multifattoriale<sup>1</sup>.

L'ipotesi più accreditata è che la KD sia causata da una risposta immunitaria disregolata a vari agenti infettivi ubiquitari, che determina una cascata citochinica e l'attivazione delle cellule endoteliali con conseguente danno vascolare in soggetti geneticamente predisposti<sup>16</sup>.

La predilezione della malattia per l'etnia asiatica, il tasso di ricorrenza e la maggiore incidenza nei fratelli dei soggetti, suggeriscono che la predisposizione genetica giochi un ruolo fondamentale

nella patogenesi della KD. Finora non sono stati identificati dei geni specifici associati alla malattia, ma gli studi di linkage familiari e del genoma umano, hanno evidenziato la presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in 6 loci genici nei bambini con KD<sup>1</sup> (**Tabella 1**).

Gene	Chromosome Location	Genetic Methods	Validation Populations	Potential Significance	Reference and Year
<i>FCGR2A</i>	1q23	GWAS	European descent, Taiwanese, Koreans, Han Chinese	Low-affinity receptor for Fc fragment of IgG; risk allele has lower binding affinity	Khor et al <sup>61</sup> 2011
<i>CASP3</i>	4q34-35	Linkage analysis Candidate gene study	Japanese, Taiwanese, Koreans, Chinese, Euro-Americans	Mediates apoptosis in immune cells and cardiomyocytes Risk allele decreases gene transcription	Onouchi et al <sup>62</sup> 2010
<i>HLA class II</i>	6p21.3	GWAS	Japanese, Taiwanese, Koreans	Activation marker for immune cells; antigen presentation	Onouchi et al <sup>63</sup> 2012
<i>BLK</i>	8p23-22	GWAS	Japanese, Taiwanese, Koreans	B-cell receptor signal transduction	Onouchi et al <sup>63</sup> 2012
<i>IPTKC</i>	19q13.2	Linkage analysis TDT	Japanese, Taiwanese, Koreans, Chinese, Euro-Americans	Negative regulator of calcineurin-NFAT signaling pathway; risk allele increases signaling	Onouchi et al <sup>64</sup> 2008
<i>CD40</i>	20q12-13.2	GWAS	Japanese, Taiwanese, Koreans	Risk alleles associated with increased translation	Onouchi et al <sup>63</sup> 2012

BLK indicates B-cell lymphoid kinase; CASP3, caspase 3; FCGR, Fcγ receptor; GWAS, genome-wide association study; HLA, human leukocyte antigen; IgG, immunoglobulin G; IPTKC, inositol 1,4,5-trisphosphate kinase-C; KD, Kawasaki disease; NFAT, nuclear factor of activated T cells; and TDT, transmission disequilibrium test.

**Tabella 1. Geni implicati nella suscettibilità alla KD individuati in coorti indipendenti.**

*Da McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. Circulation 2017;135:e927-99.*

Le principali mutazioni sono a carico di:

- Recettore della porzione Fc delle immunoglobuline (FCGR2A).
- CASP3: caspasi 3 responsabile del controllo dell'apoptosi cellulare e della maturazione citochonica.
- HLAII: *human leukocyte antigen*.
- BLK: chinasi linfocitarie B.
- ITPKC (inositolo 1,4,5-trifosfato3-kinasi): nella KD il meccanismo di segnalazione cellulare calcio-mediato che determina l'inibizione della produzione di interleuchina (IL)-2 e l'attivazione dei linfociti sembrerebbe essere *downregolato*.
- CD40-ligando (CD40-L), presente su monociti, piastrine, cellule T attivate e molte altre. Nella KD questo fattore è iper-espresso: una volta legato al suo recettore (CD40) sulle cellule presentanti l'antigene (APC) e sulle cellule endoteliali, determina l'aumento della sopravvivenza cellulare, dell'attivazione, della proliferazione e della produzione citochonica.



- MBL (*Mannose-binding lectin*): nella KD sono presenti numerosi polimorfismi di questa via, coinvolta nell'attivazione del sistema immune innato.
- TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ): di quest'ultimo nella KD sono state individuate diverse varianti geniche<sup>1</sup>.

Questi polimorfismi interferendo con il funzionamento del sistema immune potrebbero determinare una maggior suscettibilità alla formazione di CALs e potrebbero condizionare la risposta al trattamento con IVIG<sup>1</sup>.

Al tempo stesso, la natura endemica della patologia, le variazioni stagionali e il decorso autolimitantesi suggeriscono un trigger di natura infettiva, prevalentemente virale, sebbene siano stati individuati oltre 20 potenziali virus diversi e nessuno di questi sia stato correlato con certezza allo sviluppo della malattia<sup>16,17</sup>. Rowley et al. hanno dimostrato la presenza di una risposta immunitaria antigene-specifica con produzione di IgA nei tessuti coinvolti di pazienti con KD. Nello specifico, l'antigene è stato individuato in corpi inclusi citoplasmatici nell'epitelio bronchiale ciliato, suggerendo la trasmissione dell'eventuale agente eziologico per via inalatoria<sup>1,18,19</sup>.

Alcuni studi epidemiologici si sono concentrati su alcuni potenziali fattori di rischio di natura ambientale per la KD e le analisi hanno correlato l'incidenza dei casi in Giappone, Hawaii e San Diego con le correnti di vento troposferico originarie della Cina nord-orientale. Tali risultati suggeriscono che un agente trasportato dai venti potrebbe innescare la malattia<sup>20,21</sup>. Anche gli studi di Burns et al, che hanno analizzato i modelli stagionali della malattia di KD negli anni 1970-2012 in 25 paesi, supportano l'ipotesi che un fattore scatenante ambientale possa avere un ruolo nel determinare la stagionalità dei casi di KD in tutto il mondo<sup>15,22,23</sup>. Inserendosi in questo filone di ricerca, il nostro gruppo di lavoro sulla KD ha condotto uno studio epidemiologico in Emilia-Romagna riscontrando una correlazione negativa tra la temperatura e il numero di casi di KD ma nessuna correlazione con le precipitazioni o la qualità dell'aria<sup>24</sup>. La ridotta insorgenza durante la primavera e l'estate sembra escludere una relazione con pollini o fertilizzanti utilizzati in agricoltura<sup>24</sup>. Il verificarsi di due picchi epidemici nel 2005 e nel 2013 in Romagna e un possibile collegamento con venti meridionali e temperature più miti in Emilia supportano l'implicazione di un agente infettivo aereo operante durante i mesi invernali<sup>24</sup>.

La difficoltà, però, ad individuare un singolo agente infettivo suggerisce che la malattia derivi da una risposta immunologica disregolata innescata da diversi agenti microbici. A supportare questa ipotesi abbiamo la documentata infezione da parte di differenti microrganismi in diversi pazienti, la difficoltà ad individuare un singolo agente responsabile e le analogie presenti tra KD e altre patologie causate da agenti multipli<sup>1</sup>. Si ritiene plausibile che la KD sia innescata da un'infezione

(stadio acuto precoce) a cui facciano rapidamente seguito le manifestazioni cliniche determinate da reazioni immunomediate indotte dall'infezione iniziale<sup>25</sup>.

Nei pazienti con KD, è stata osservata una peculiare attivazione del sistema immunitario, in particolare durante la fase acuta, con un aumento della produzione di citochine proinfiammatorie e chemochine, tra cui tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-1, IL-6 e IL-8 e un'attivazione delle cellule endoteliali<sup>1,26</sup>.

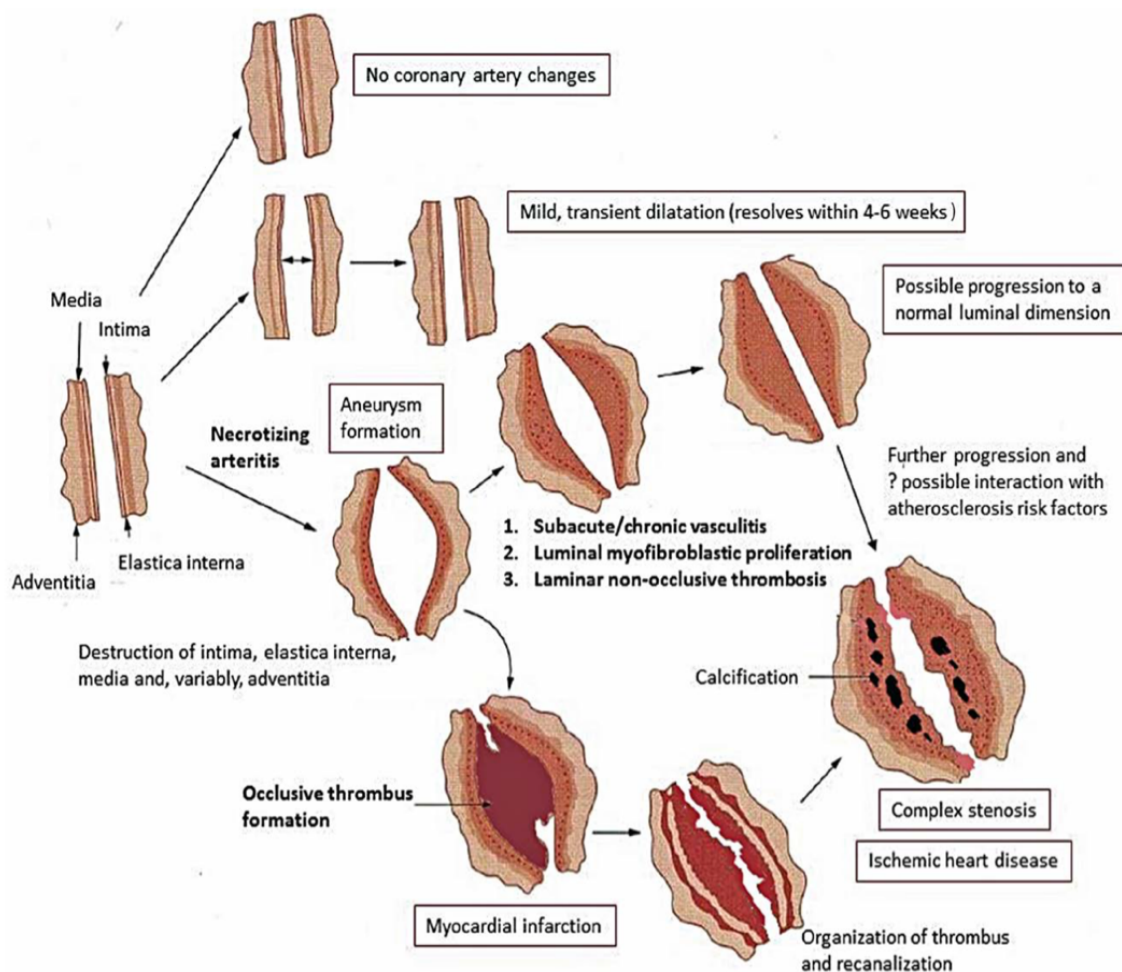
La teoria più accreditata al momento è che siano sia l'immunità innata e sia quella adattativa a determinare una risposta infiammatoria tale da indurre la clinica e le complicanze della KD<sup>27</sup>. Il sistema immunitario innato una volta attivato da Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) o da Damage-associated molecular patterns (DAMPs) determina il rilascio di citochine proinfiammatorie quali IL-1, IL-18, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e interferon (INF)- $\gamma$ <sup>27</sup>. Soprattutto l'IL-1 sembrerebbe avere un ruolo essenziale nel determinare il danno infiammatorio sull'endotelio coronarico, insieme al TNF- $\alpha$ , il quale induce l'attivazione delle metalloproteasi (MMP-9) determinando la lisi dell'elastina e la conseguente formazione di aneurismi e dilatazioni<sup>28</sup>. In associazione al sistema innato anche l'immunità adattativa ha un ruolo essenziale. È stato identificato un aumento dell'attivazione delle cellule Th-17 (cellule associate a malattie autoimmuni e allergiche, note anche per avere proprietà proinfiammatorie) e dei fattori proinfiammatori durante la fase acuta di KD<sup>28</sup>; così come un'espansione clonale delle cellule B e autoanticorpi diretti contro il miocardio, l'endotelio e la matrice extracellulare<sup>29</sup>. In seguito alla somministrazione di IVIG, infatti, si assiste ad una regolarizzazione dell'attività immune B e T mediata<sup>1,27</sup>. Inoltre, anche se il danno coronarico è il più temuto, in circa il 73% dei pazienti con KD sono state riscontrate post-mortem lesioni glomerulari da accumulo di IgA e frazione C3 del complemento. Ciò ribadisce come l'immunità svolga un ruolo fondante nella patogenesi della malattia<sup>30</sup>.

### *Anatomia patologica*

Sul piano istologico la KD è una vasculite sistemica dei vasi di medio e piccolo calibro, con un interessamento elettivo dei vasi coronarici, a livello dei quali possono comparire complicanze gravi, come lo sviluppo di dilatazioni, aneurismi e stenosi<sup>1</sup>.

Gli aneurismi possono interessare anche altre arterie muscolari extra-parenchimali, come le arterie celiaca, mesenterica, femorale, iliaca, renale, ascellare e brachiale. I diversi stadi dell'infiammazione e del rimodellamento vasale della KD sono stati studiati mediante l'analisi delle arterie muscolari di grande calibro<sup>1</sup>. Dal punto di vista anatomo-patologico il danno vascolare è stato riassunto in tre tappe fondamentali<sup>1,31</sup> (**Figura 2**):

1. Arterite necrotizzante: è mediata dall'azione sincrona dei neutrofili che si completa nelle prime 2 settimane dall'esordio della febbre. Distrugge progressivamente la tonaca intima, la media e parte dell'avventizia del vaso. Partecipano a questo processo anche le proteine della famiglia S100 (fra le quali la calprotectina) i cui livelli rimangono elevati durante la fase acuta e subacuta se sono presenti lesioni coronariche<sup>1,30</sup>.
2. Vasculite subacuta-cronica: è mediata dall'azione asincrona di linfociti, plasmacellule, eosinofili e macrofagi che ha inizio entro le 2 settimane dall'esordio ma può persistere anche per mesi o anni<sup>1</sup>.
3. Proliferazione intraluminale mio-fibroblastica (LMP): non è un semplice processo cicatriziale, ma si tratta della proliferazione attiva dei mio-fibroblasti derivati dal muscolo liscio della tonaca media dei vasi arteriosi. Anche quest'ultima fase inizia a 2 settimane dall'esordio e può persistere per anni fino a determinare una progressiva stenosi vascolare<sup>1</sup>.



**Figura 2. Storia naturale delle anomalie coronariche nella KD**

*Da McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. Circulation 2017;135:e927-99.*

Nella KD è stata dimostrata anche la sovra-espressione di una serie di microRNAs implicati nella proliferazione della tonaca intima vascolare, nell'attivazione del TGF- $\beta$ , nell'apoptosi cardiomiocitica e nella risposta infiammatoria<sup>30</sup>. L'outcome della malattia dipenderà dalla severità delle lesioni coronariche. Dilatazioni coronariche lievi possono regredire, mentre ciò non avviene negli aneurismi giganti sacciformi. Il vaso ha ormai perso la tonaca intima, media ed elastica che non possono essere rigenerate e la porzione di avventizia rimasta, può andare incontro a rottura o trombosi con conseguente organizzazione, ricanalizzazione e calcificazione. Questi aneurismi hanno un più elevato rischio di rottura entro le prime 3 settimane dall'esordio della febbre e raramente successivamente<sup>1</sup>.

### *Clinica*

La KD è una patologia temporalmente autolimitatesi, i cui segni e sintomi evolvono nei primi dieci giorni di malattia, per poi gradualmente regredire nella maggioranza assoluta dei bambini, anche in assenza di una terapia specifica<sup>1</sup>.

Dal punto di vista del decorso clinico si distinguono tre fasi:

- fase acuta (da 7 a 10-14 giorni dopo l'esordio), in cui si riscontrano la febbre e i segni clinici acuti della malattia.
- fase subacuta (dalla defervescenza fino alla quarta settimana circa) che ha inizio nel momento in cui scompaiono la febbre ed i segni acuti della malattia. Questa fase si associa a trombocitosi e desquamazione. Possono persistere irritabilità, anoressia e congiuntivite. È la fase a maggior rischio di morte improvvisa.
- fase di convalescenza o cronica (dalla quinta all'ottava settimana) che inizia nel momento in cui scompaiono tutti i segni clinici di malattia<sup>1</sup>.

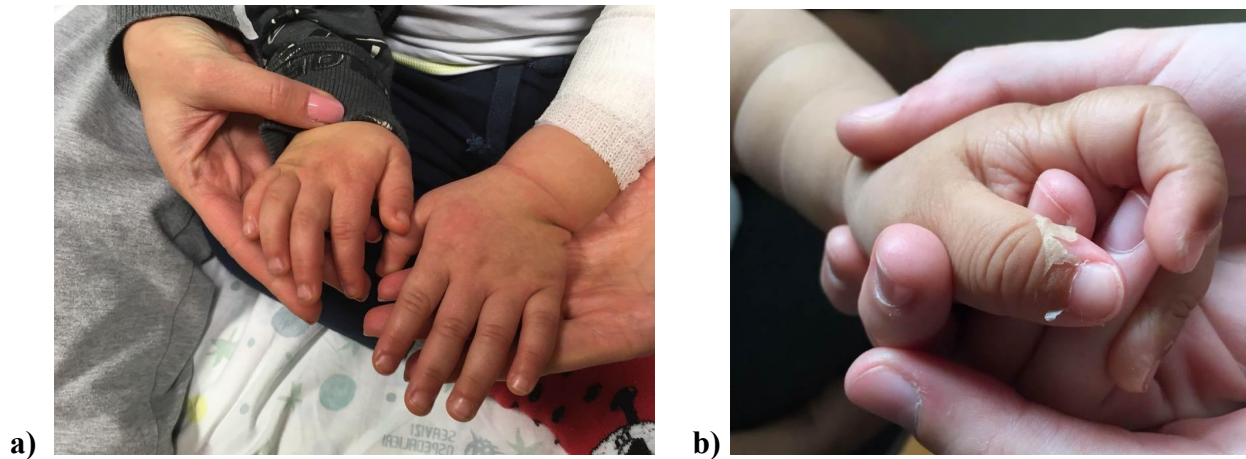
In assenza di un test diagnostico specifico o di caratteristiche cliniche patognomoniche, la diagnosi di KD si basa esclusivamente su criteri clinici. Inoltre, anche alcuni parametri laboratoristici sono di ausilio per supportare la diagnosi. In presenza di febbre persistente da almeno 5 giorni (il giorno di inizio corrisponde al primo giorno di febbre) e di almeno 4 dei criteri clinici (**Tabella 2**) è possibile diagnosticare la forma classica della malattia<sup>1</sup>.

<b>Tabella 2. Criteri per la diagnosi di KD classica</b>
Febbre da almeno 5 giorni e almeno 4 delle seguenti:
Eritema e fissurazioni delle labbra, lingua a fragola, e/o eritema della mucosa orale e faringea
Congiuntivite bulbare bilaterale non essudativa
Rash cutaneo: maculopapulare, eritrodermia diffusa o eritema multiforme
Eritema ed edema delle mani e dei piedi in fase acuta e/o desquamazione periungueale in fase subacuta
Linfadenopatia cervicale (diametro $\geq 1.5$ cm), di solito unilaterale

In accordo con le ultime linee guida del 2017 dell'*American Heart Association* (AHA), in presenza di almeno 4 caratteristiche cliniche principali (in particolare quando sono presenti eritema ed edema delle mani e dei piedi), la diagnosi di KD può essere formulata con solo 4 giorni di febbre, sebbene i medici esperti che hanno trattato molti pazienti con KD possono stabilire la diagnosi con 3 giorni di febbre in rari casi<sup>1</sup>. I segni di KD possono essere transitori e un'anamnesi accurata può rivelare che una o più caratteristiche cliniche principali si sono manifestate durante la malattia, ma si sono risolte al momento in cui il paziente giunge all'attenzione del pediatra<sup>1</sup>.

La febbre nella KD ha caratteristiche definite: è tipicamente elevata (superiore a 39°C), remittente e scarsamente responsiva alla terapia antipiretica. In assenza di una terapia adeguata persiste da 1 a 3 settimane e, infine, si risolve spontaneamente<sup>1</sup>.

Le alterazioni delle estremità sono tipiche della malattia (**Figura 3a**). Durante i primi 10 giorni (fase acuta) si verificano spesso eritema ed edema, talvolta dolente, palmo-plantare, con una netta linea di demarcazione a livello delle caviglie e dei polsi. Nella fase subacuta, in genere entro 2 o 3 settimane dall'inizio della febbre, si verifica una desquamazione, tipicamente lamellare, delle dita delle mani e dei piedi, che coinvolge la regione periungueale e che può estendersi fino a coinvolgere i palmi delle mani e le piante dei piedi (**Figura 3b**). Da 1 a 2 mesi dopo l'inizio della febbre, si possono notare profondi solchi trasversali sulle unghie (linee di Beau). In fase acuta, inoltre, si può osservare un eritema perineale che evolve precocemente in desquamazione<sup>1,32</sup>.



**Figura 3. a) Edema ed eritema delle mani in un paziente con KD. b) Desquamazione periungueale delle dita delle mani in un paziente con KD in fase subacuta**

Il rash cutaneo compare solitamente entro 5 giorni dalla comparsa della febbre (**Figura 4**) ed è tipicamente esteso, coinvolgendo tronco ed estremità. Si manifesta, nella maggior parte dei casi, come un'eruzione maculo-papulare, ma può anche assumere le caratteristiche di rash scarlattiniforme o eritema multiforme e, infine, meno comunemente, di un'eruzione orticarioide o micro-pustolosa<sup>1</sup>.



**Figura 4. Rash cutaneo in un paziente con KD.**

L'iperemia congiuntivale bilaterale (**Figura 5**) è bulbare e non purulenta, con risparmio del limbus (zona avascolare intorno all'iride), generalmente non dolorosa, e compare poco tempo dopo la comparsa della febbre. Occasionalmente si osservano emorragia subcongiuntivale e cheratite puntata<sup>1</sup>.



**Figura 5. Iperemia congiuntivale in un paziente con KD.**

Le alterazioni delle labbra e della mucosa orale (**Figura 6**) comprendono eritema, secchezza, fissurazioni, desquamazione e sanguinamento delle labbra, lingua a fragola, eritema diffuso della mucosa orofaringea, in assenza di vescicole, ulcerazioni del cavo orale ed essudato<sup>1</sup>.

La linfadenopatia laterocervicale (**Figura 6**) è la meno comune fra i segni clinici della KD (si osserva nel 25-70% dei casi): generalmente è unilaterale e confinata al triangolo cervicale anteriore, con uno o più linfonodi di diametro superiore a 1.5 cm, spesso fissi, ricoperti da cute integra, di consistenza parenchimatosa e senza segni di colliquazione. È ben noto che la linfadenopatia cervicale può essere associata a un'inflammazione profonda del collo che porta a un edema parafaringeo e retrofaringeo e a un flemmone non suppurativo, che può indurre una diagnosi clinica di ascesso da causa batterica, con un possibile ritardo diagnostico della KD<sup>1</sup>.

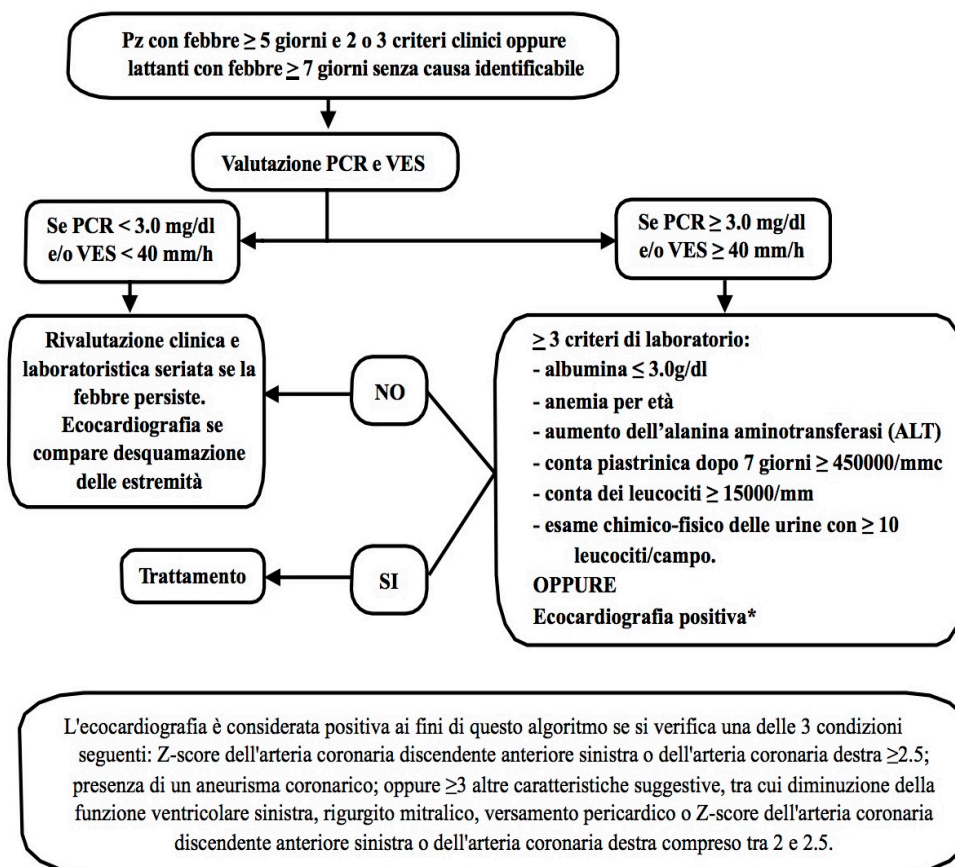


**Figura 6. Linfadenopatia laterocervicale e alterazioni delle labbra in un paziente con KD.**

Nella KD possono essere presenti anche altre manifestazioni cliniche atipiche, che possono interessare diversi apparati, quali ascesso tonsillare, meningismo, paralisi del facciale, pancreatite, edema scrotale, fino all'eritema o ulcerazione nel sito di inoculo del vaccino con il bacillo di Calmette-Guérin, nei paesi in cui viene effettuata la vaccinazione antitubercolare<sup>1</sup>.

Tra questi, di nota sono i sintomi gastrointestinali, come diarrea, vomito e dolore addominale, possono essere presenti fino ad un 30% dei casi<sup>33</sup>. In casi rari la KD può presentarsi con un addome

acuto<sup>34</sup>. Dal 4 al 21% dei casi possono presentare un'idrope della colecisti, generalmente lieve o moderata, mentre pancreatite e ittero sono riscontri meno comuni<sup>35</sup>. Inoltre, i bambini con KD presentano spesso irritabilità maggiore rispetto ai bambini con altre malattie febbrili<sup>1</sup>. Sebbene i criteri clinici permettano di individuare i pazienti con malattia di KD classica o completa, esiste una minore percentuale di pazienti che non soddisfa i criteri pur presentando la malattia. In questi casi si parla di KD incompleta (o atipica), che risulta più frequente nei bambini più piccoli (età inferiore a 6-12 mesi), i quali sono anche a maggior rischio di presentare un coinvolgimento cardiaco, richiedendo pertanto maggiore accuratezza diagnostica e tempestività nell'inizio di un trattamento specifico<sup>1,36</sup>. Nelle linee guida dell'AHA del 2004 viene proposto per la prima volta un algoritmo diagnostico per la diagnosi di KD incompleta che è risultato utile nell'identificare i pazienti che necessitano di terapia e nel prevenire il coinvolgimento coronarico<sup>37,38</sup>. L'algoritmo prende in considerazione l'aumento degli indici di flogosi, nello specifico la proteina C reattiva (PCR) e la velocità di eritrosedimentazione (VES) e la presenza di un'ecocardiografia positiva (Figura 7).



**Figura 7. Algoritmo diagnostico-terapeutico per pazienti con KD incompleta.**



La diagnosi differenziale della KD è principalmente con altre patologie acute febbrili infettive di natura virale (es. infezione da Adenovirus, mononucleosi, morbillo) o batteriche (es. faringotonsillite streptococcica/malattia reumatica), altre patologie sistemiche (es. sindrome da shock tossico) e reazione a farmaci (es. sindrome di Stevens-Johnson). La presenza di congiuntivite essudativa, essudato faringeo, ulcerazioni orali, splenomegalia e rash vescicolobollosa o petecchiale dovrebbe indurre a prendere in considerazione altre diagnosi<sup>1</sup>. Il morbillo condivide molte caratteristiche cliniche con la KD e dovrebbe essere considerato nella diagnosi differenziale nei bambini non vaccinati<sup>1</sup>. Nei bambini con alcune caratteristiche cliniche della KD e un test rapido o una coltura positivi per lo streptococco di gruppo A che non migliorano dopo 24-48 ore di terapia antibiotica efficace (possibili portatori di streptococco), la diagnosi di KD deve essere nuovamente considerata<sup>1</sup>.

Inoltre, come fattore confondente, un bambino con KD può avere un'infezione concomitante da parte di un patogeno virale respiratorio. In un bambino con reperti clinici compatibili con la KD classica, il rilevamento di virus respiratori come il virus respiratorio sinciziale, il metapneumovirus, i coronavirus, i virus parainfluenzali o i virus influenzali, infatti, non esclude la diagnosi di KD. In particolare, l'identificazione di Adenovirus in un campione nasofaringeo di un paziente con sospetta KD rappresenta una sfida, poiché le due malattie hanno caratteristiche cliniche simili. È noto che gli Adenovirus, in particolare del gruppo C, possono persistere nel tessuto tonsillare o adenoideo, rappresentando un'ulteriore difficoltà per la diagnosi differenziale<sup>39</sup>. Uno studio del 2013 ha riportato che nell'8.8% dei pazienti con i criteri clinici completi per la diagnosi di KD è stato rilevato il DNA dell'Adenovirus mediante reazione a catena della polimerasi inversa (RT-PCR)<sup>40</sup>. In tal senso, alla luce della difficoltà nella diagnosi differenziale e del rischio coronarico legato al trattamento ritardato nei pazienti con KD, il nostro gruppo di ricerca ha elaborato due punteggi clinici (score clinico e score clinico-laboratoristico) da utilizzare nei pazienti con febbre alta prolungata e segni e sintomi compatibili con la KD (o con la Sindrome Infiammatoria Multisistemica nei bambini - MIS-C, *vedi dopo*) e l'infezione da Adenovirus, che rappresentano un metodo semplice e utile per distinguere i pazienti che necessitano di un attento monitoraggio e di un trattamento più aggressivo e quelli che potrebbero essere gestiti in modo sicuro a domicilio<sup>41</sup>. La sensibilità e la specificità dei due punteggi clinici sono risultate elevate (score clinico: 100% e 80%, rispettivamente; score clinico-laboratoristico: 98.3% e 83.3%, rispettivamente)<sup>41</sup>. Nello specifico, i segni di infiammazione mucocutanea, come mucosite, cheilite, congiuntivite e rash cutaneo, sono risultati significativamente più frequenti nei pazienti con KD e MIS-C rispetto ai pazienti con infezione da Adenovirus<sup>41</sup>. Inoltre, la linfadenopatia cervicale e il rash dell'area perineale sono risultati peculiari nei pazienti con KD rispetto alle altre

condizioni. D'altra parte, i pazienti con infezione da Adenovirus avevano maggiori probabilità di avere sintomi respiratori rispetto ai bambini con KD e MIS-C. La faringotonsillite è stato il segno clinico più caratteristico dell'infezione da Adenovirus<sup>41</sup>.

### *Esami di laboratorio e strumentali*

Tipiche alterazioni degli esami ematici durante la fase acuta della KD sono la leucocitosi, con predominanza di popolazioni granulocitarie mature ed immature, e l'aumento degli indici di flogosi (PCR e VES)<sup>1</sup>. L'aumento di questi ultimi può essere variabile<sup>42</sup>. Valori di PCR al di sopra di 3.5 mg/dl sono presenti nell'80% dei casi e l'aumento della VES al di sopra di 60 mm/h nel 60%. La PCR si normalizza più rapidamente della VES con la risoluzione dell'infiammazione, anche perché quest'ultima risente della terapia con IVIG<sup>42</sup>. Per questo motivo nel follow-up è più utile il dosaggio della PCR per verificare la risposta al trattamento. Il riscontro di elevati livelli di VES durante la fase acuta della malattia è un fattore di rischio per lo sviluppo della coagulopatia intravasale disseminata (CID). Nella fase acuta può inoltre comparire anemia, in genere normocitica e normocromica, con valori di emoglobina (Hb) inferiori di 2 DS rispetto ai limiti fisiologici per età, che si risolve spontaneamente con la risoluzione dell'infiammazione<sup>1</sup>. In aggiunta, può riscontrarsi trombocitopenia, seguita tipicamente dalla trombocitosi, caratteristica peculiare della fase subacuta, con una media di circa 700000/mmc<sup>1</sup>. La comparsa di trombocitopenia durante la prima settimana di malattia è rara e rappresenta un segno prognostico negativo per rischio di CID<sup>1</sup>. Fino al 40% dei casi è possibile riscontrare un aumento da lieve a moderato delle transaminasi sieriche e nel 10% si sviluppa una iperbilirubinemia lieve<sup>1</sup>. Il valore della  $\gamma$ -glutamyl transferasi ( $\gamma$ -GT) è aumentato in circa il 67% dei pazienti<sup>1</sup>. Anche l'ipoalbuminemia è di riscontro comune ed è associata ad una fase acuta più severa e prolungata<sup>1</sup>. Il profilo lipidico è, nella fase acuta, di tipo pro-aterosclerotico con aumento delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e riduzione delle lipoproteine ad alta densità (HDL)<sup>43</sup>. L'esame delle urine può mostrare una piuria sterile fino all'80% dei casi, sebbene questo dato non sia specifico di KD<sup>1</sup>. Durante la fase acuta, oltre agli esami ematici, devono essere eseguiti alcuni esami strumentali. Dal punto di vista cardiologico devono essere sempre eseguiti un elettrocardiogramma (ECG) e un ecocardiogramma. L'ECG durante la fase acuta può mostrare alcune anomalie del ritmo, come tachicardia sinusale, ma anche aritmie, prolungamento dell'intervallo PR o QT, anomalie specifiche del tratto ST (per esempio un sottoslivellamento) e dell'onda T (per esempio inversione o appiattimento) e onda R di basso voltaggio in caso di coinvolgimento miocardico o pericardico<sup>1</sup>. Raramente, in caso di miocardite o ischemia miocardica, si possono osservare aritmie ventricolari maligne<sup>1</sup>.

L'ecocardiografia bidimensionale/color-Doppler transtoracica invece, è essenziale per identificare le anomalie cardiache e, nello specifico coronariche. Questa è la modalità di imaging ideale, perché non invasiva, ripetibile e dotata di alta sensibilità e specificità per i tratti prossimali delle arterie coronarie<sup>1</sup>. Le più severe complicanze della KD, infatti, sono le CALs che includono ectasie, aneurismi e fistole, con rischio di IMA, cardiopatia ischemica e morte improvvisa<sup>1</sup>. Il primo ecocardiogramma deve essere effettuato appena vi sia il sospetto di KD: il timing di questo esame è essenziale per stabilire una baseline utile come elemento di confronto per il successivo follow-up del paziente<sup>1</sup>. È poi raccomandata la ripetizione dell'ecocardiogramma dopo 2, e 6-8 settimane dall'esordio della malattia, nei casi non complicati<sup>1</sup>. Nei casi con CALs il *timing* del follow-up ecocardiografico è stabilito in considerazione del singolo caso e della sua gravità<sup>1</sup>. Le arterie che devono essere visualizzate sono: arteria coronaria sinistra (LMCA), arteria discendente anteriore (LAD), arteria circonflessa (Cx), arteria coronaria destra (RCA) e arterie discendenti posteriori. In ordine decrescente gli aneurismi delle coronarie interessano più frequentemente: LAD prossimale e RCA prossimale, seguite da LMCA, Cx e infine la porzione distale della RCA e la giunzione tra RCA e l'arteria coronaria discendente posteriore<sup>1</sup>. La valutazione delle arterie coronarie deve includere la misurazione del diametro interno dei vasi, escludendo gli osti e le biforcazioni dei vasi coronarici, che possono presentare una normale dilatazione focale<sup>1</sup>. Devono essere indicati il numero e la localizzazione degli aneurismi e la presenza o l'assenza di eventuali trombi intraluminali e lesioni stenotiche<sup>1</sup>. Gli aneurismi sono classificati in saccolari se i diametri assiali e laterali sono quasi uguali oppure fusiformi se si osserva una dilatazione simmetrica con una forma affusolata<sup>1</sup>.

Le linee guida giapponesi classificano le arterie coronarie in base al diametro assoluto o relativo del lume interno<sup>44</sup>. Si definiscono dilatazioni o piccoli aneurismi quando è presente una dilatazione localizzata del diametro del lume interno < 4 mm, oppure, se il bambino ha  $\geq 5$  anni, una dilatazione con un diametro interno di un segmento che misura  $\leq 1.5$  volte quello di un segmento adiacente. Gli aneurismi medi sono definiti come un diametro del lume interno >4 mm ma  $\leq 8$  mm, o se il bambino ha  $\geq 5$  anni, un diametro interno di un segmento che misura da 1.5 a 4 volte quello di un segmento adiacente. Gli aneurismi grandi o giganti sono definiti come un diametro del lume interno >8 mm o, se il bambino ha  $\geq 5$  anni, un diametro interno di un segmento che misura >4 volte quello di un segmento adiacente. Questi criteri non tengono conto delle dimensioni del paziente, che possono influenzare in modo sostanziale le normali dimensioni delle arterie coronarie. Uno studio effettuato da de Zorzi et al. ha dimostrato che le misurazioni, in particolare di RCA e LAD, dovrebbero essere corrette in relazione alla superficie corporea del paziente (BSA) (se possibile) ed espresse come unità di deviazione standard dalla media (Z-score), utilizzando

appositi nomogrammi o equazioni<sup>45</sup>. Sono state elaborate diverse formule per il calcolo dello Z-score, che differiscono per quanto riguarda il numero, l'età e l'etnia dei soggetti, la metodica utilizzata per calcolare la BSA e il metodo di regressione utilizzato per l'analisi<sup>1</sup>. L'utilizzo dello Z-score permette quindi una valutazione più accurata delle anomalie coronarie<sup>1</sup>. Nelle ultime linee guida dell'AHA, infatti, viene raccomandato il seguente schema di classificazione, basato esclusivamente sullo Z-score:

- Nessun coinvolgimento: Z-score sempre  $<2$ ;
- Dilatazione: Z-score compreso tra 2 e  $<2.5$ ; o se inizialmente  $<2$ , diminuzione del punteggio Z durante il follow-up  $\geq 1$ ;
- Aneurisma piccolo: Z-score compreso tra  $\geq 2,5$  e  $<5$ ;
- Aneurisma medio: Z-score compreso tra  $\geq 5$  e  $<10$ , e dimensione assoluta  $<8$  mm;
- Aneurisma grande o gigante: Z-score  $\geq 10$ , o dimensione assoluta  $\geq 8$  mm<sup>1</sup>.

Oltre allo sviluppo di dilatazioni e aneurismi, sono state individuate altre anomalie cardiache nei pazienti con KD, come disfunzione miocardica, valvulopatia, versamento pericardico e dilatazione della radice aortica<sup>1,46</sup>.

La disfunzione miocardica è un riscontro relativamente comune nelle prime fasi della KD (circa il 20% dei pazienti), ma sembra essere transiente e ben responsiva alla terapia antinfiammatoria<sup>46</sup>. Probabilmente la miocardite nella KD migliora rapidamente con l'attenuarsi del processo infiammatorio perché deriva principalmente dall'edema interstiziale e dall'infiammazione e solo raramente dalla necrosi delle cellule miocardiche<sup>47</sup>.

Le valvulopatie più frequenti includono insufficienza valvolare mitralica e insufficienza della valvola aortica<sup>1</sup>. Queste appaiono più comunemente nella fase acuta con un'incidenza rispettivamente del 23-27% e dell'1%<sup>46</sup>. In aggiunta, la dilatazione della radice aortica (indicata da un aumento della misura dello Z-score dell'aorta ascendente) è stata riportata in  $\approx 10\%$  dei pazienti durante la fase acuta di malattia<sup>46</sup>.

Infine, nei pazienti con KD può essere riscontrata una pericardite, spesso associata alla vasculite coronarica e alla miocardite. L'ecografia deve valutare la presenza e la severità del versamento pericardico. Raramente quest'ultimo risulta emodinamicamente significativo<sup>1</sup>.

Inoltre, circa il 7% dei bambini affetti da KD presenta shock cardiocircolatorio e ipotensione che richiedono la somministrazione di espansori di volume, l'infusione di agenti vasoattivi o il trasferimento in ambiente intensivo. Questa forma di malattia è definita Kawasaki Disease Shock Syndrome (KDSS)<sup>1</sup>. Le cause della KDSS sono imputabili al rilascio di molecole endogene che inducono la perdita delle resistenze periferiche vascolari, all'infiammazione del miocardio con o

senza insulto ischemico e all'aumentata permeabilità capillare, come dimostrato dall'incremento del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) in circolo. La KDSS, infatti è data da uno shock misto cardiogeno e distributivo che mima patofisiologicamente lo shock settico. Si manifesta quindi con vasodilatazione patologica, ipovolemia assoluta e relativa, disfunzione miocardica e alterata distribuzione del sangue<sup>1</sup>.

### *Trattamento*

L'infusione di IVIG è diventato il trattamento gold standard della KD fin da quando Furusho et al. ne hanno dimostrato l'efficacia nel 1984<sup>48</sup>. La terapia deve essere somministrata preferibilmente entro il decimo giorno dall'esordio della febbre per ridurre il rischio di CALs (dal 25% a meno del 5% dei pazienti)<sup>1</sup>. Ad oggi, insieme all'acido acetil-salicilico (ASA), rappresenta il trattamento di prima linea per i pazienti con KD. Il meccanismo con il quale le IVIG funzionano nel migliorare la clinica non è del tutto noto, ma si ipotizza un possibile ruolo nella modulazione dell'infiammazione e del danno endoteliale. Le IVIG agirebbero infatti sulla produzione citochinica, la neutralizzazione di tossine, l'aumento dell'attività dei linfociti T regolatori, l'inibizione della sintesi di immunoglobuline e la produzione di anticorpi anti-autoanticorpi, ma anche inibendo l'attivazione e modulando la disfunzione endoteliale<sup>1</sup>. Il dosaggio ottimale delle IVIG è di 2 g/kg in singola infusione in associazione all'ASA. Le IVIG vengono ottenute da plasma di donatore, quindi espongono il paziente a diversi rischi come l'anemia emolitica Coombs positiva (evidenziata nei pazienti con gruppo sanguigno AB) e la meningite asettica. La vaccinazione per morbillo, parotite e varicella nei bambini non immunizzati dovrebbe essere differita per almeno 11 mesi dalla somministrazione delle IVIG<sup>1</sup>. L'ASA va sempre associata alle IVIG nel trattamento della KD. Durante la fase acuta viene somministrato a dose antinfiammatoria ogni 6 ore per un totale di 30-50 mg/Kg/die<sup>1</sup>. A 48-72 ore dalla defervescenza viene ridotta a dosaggio antiaggregante (3-5 mg/kg/die) per 6-8 settimane se non si sono verificate CALs, per un tempo variabile in caso contrario<sup>1</sup>. La complicanza peggiore dell'utilizzo prolungato di ASA nel bambino è la sindrome di Reye, una rara forma di encefalopatia acuta e infiltrazione grassa del fegato che può insorgere in corso di alcune virosi acute soprattutto se trattate con ASA<sup>49</sup>. Anche se trattati con IVIG ad alte dosi e ASA nei primi 10 giorni della malattia, circa il 10% dei bambini va incontro a dilatazione coronarica transitoria, il 4-5% sviluppa aneurismi e l'1% aneurismi giganti. Nei casi ad alto rischio può essere opportuna l'associazione del trattamento corticosteroidico. Una relativamente recente metanalisi ha confrontato i diversi regimi steroidei e gli scores di rischio usati nei bambini di etnia asiatica<sup>50,51</sup>. I risultati hanno evidenziato che la combinazione di corticosteroidi e dose standard di IVIG come trattamento iniziale nei pazienti ad alto rischio riduca lo sviluppo di

CALs<sup>1</sup>. Purtroppo, l'affidabilità e la sensibilità di questi scores nelle popolazioni non giapponesi si è dimostrata molto bassa<sup>52</sup>. Nei pazienti in cui la febbre persiste o ricompare a 36 ore dal trattamento con IVIG si parla di KD resistente o di paziente non responder. In questi casi sono stati proposti trattamenti di seconda e terza linea dalle linee guida AHA (**Tabella 3**)<sup>1</sup>.

Farmaco	Dose
Più frequenti	
Seconda dose di IVIG	2 g/kg EV
IVIG + prednisolone	IVIG: 2 g/kg EV prednisolone: 2 mg/kg/die EV ogni 8 h fino alla defervescenza, poi prednisone per via orale fino alla normalizzazione della PCR, con successiva riduzione graduale nell'arco di 2-3 settimane
Infliximab	5 mg/kg EV, in singola infusione in 2 h
Terapie alternative	
Ciclosporina	EV: 3 mg/kg/die ogni 12 h PO: 4-8 mg/kg/die ogni 12 h La dose deve essere aggiustata per raggiungere un valore ematico minimo di 50-150 ng/mL Livello di picco in 2 ore: 300–600 ng/mL
Anakinra	1-6 mg/kg/die SC
Ciclofosfamide	2 mg/kg/die EV
Plasmaferesi	N/A
<i>Legenda: EV: endovena; PO: per os; SC: sottocute.</i>	

**Tabella 3. Opzioni terapeutiche per i pazienti con KD resistente alle IVIG.**

L'Infliximab è un anticorpo monoclonale inibitore del TNF- $\alpha$ , il quale è significativamente aumentato nella KD nelle forme ad alto rischio di CALs. I livelli di citochine pro-infiammatorie si riducono dopo il trattamento con Infliximab ma i markers di vasculite come il VEGF e le proteine S100 rimangono elevati<sup>53</sup>. Ciò suggerisce che, anche se Infliximab agisce risucendo l'infiammazione, esso non è in grado di interrompere del tutto il processo vasculitico. L'Etanercept è un altro farmaco che agisce come recettore solubile del TNF- $\alpha$ , su cui però, in accordo con le linee guida dell'AHA, non ci sono sufficienti evidenze al riguardo. Un recente trial clinico randomizzato controllato (RCT) ha mostrato l'efficacia dell'Etanercept nel ridurre la gravità dei CALs in pazienti di età superiore ad 1 anno e nessun effetto in pazienti di età inferiore<sup>54</sup>. Il suo

utilizzo ad oggi è limitato ai bambini con KD resistente al trattamento di prima linea in cui si temono infezioni secondarie. Il farmaco, infatti, ha un'emivita più breve rispetto all'Infliximab e, dato che il recettore solubile si lega solo al TNF- $\alpha$  circolante, ha anche un effetto ridotto<sup>1</sup>. Nelle forme resistenti alla seconda dose di IVIG, corticosteroidi e Infliximab si possono somministrare inibitori della calcineurina come la ciclosporina oppure farmaci immunomodulatori come Anakinra (inibitore di IL-1), plasmaferesi o agenti citotossici, come la ciclofosfamida<sup>1</sup>. A causa dei potenziali effetti collaterali queste linee di trattamento sono riservate ai casi refrattari che non hanno risposto a nessuno dei protocolli sopra descritti<sup>1</sup>.

Oltre al trattamento con IVIG nei bambini con KD è essenziale eseguire la profilassi antitrombotica. Ad oggi, nessun RCT ha valutato la sicurezza e l'efficacia dei regimi antitrombotici per la profilassi della trombosi coronarica nella KD, in parte perché la potenza di tali studi è limitata dal relativamente esiguo numero di pazienti e dalla rarità degli eventi trombotici<sup>1</sup>. Per questo motivo, le raccomandazioni sull'uso degli agenti antitrombotici si basano principalmente su studi retrospettivi, sulla pratica clinica relativa alla malattia coronarica aterosclerotica dell'adulto e sul consenso di esperti. La complicanza più severa della malattia, oltre alla rottura dell'aneurisma coronarico (che è un evento molto raro), è l'occlusione trombotica della coronaria danneggiata e conseguente IMA e morte improvvisa<sup>1</sup>. La prevenzione delle complicanze trombotiche è calibrata principalmente in base allo Z-score. Gli agenti antiplastrinici sono considerati lo standard di terapia per i pazienti con CALs<sup>1</sup>.

Nei pazienti senza CALs è sufficiente la monoterapia con ASA a basso dosaggio<sup>1</sup>. Se sono presenti aneurismi moderati si può associare all'ASA una tienopiridina come il Clopidogrel, che antagonizza l'attivazione piastrinica ADP-mediata<sup>1</sup>. I pazienti con aneurismi grandi o giganti sono a rischio particolarmente elevato di trombosi dell'arteria coronaria. Quest'ultima è favorita da condizioni di flusso marcatamente anormali, con basso stress di parete e stasi, insieme all'attivazione delle piastrine, dei fattori di coagulazione e dell'endotelio<sup>1</sup>. Nel corso del tempo, spesso si sviluppano stenosi, che, a causa della turbolenza del flusso, determinano l'attivazione piastrinica e la disfunzione endoteliale, con successiva ostruzione del flusso e peggioramento della stasi. Poiché sia le piastrine che i fattori umorali della coagulazione promuovono la formazione di trombi all'interno degli aneurismi giganti, i pazienti vengono trattati con una combinazione di terapia antiplastrinica e anticoagulante, più comunemente ASA a basso dosaggio, insieme a Eparina a Basso Peso Molecolare (EBPM), poi sostituita dal Warfarin (con INR target fra 2.0 e 3.0) quando le dimensioni delle coronarie si stabilizzano<sup>1</sup>.

In pazienti ad altissimo rischio che, oltre ad avere aneurismi giganti, sono stati trattati con trombolisi per trombosi coronarica, le linee guida AHA propongono la triplice terapia con ASA,

una tienopiridina e un anticoagulante<sup>1</sup>. I nuovi inibitori orali diretti del fattore Xa o gli inibitori diretti della trombina non sono ancora approvati per l'uso in pediatria, ma potrebbero soppiantare il Warfarin e l'EBPM in futuro<sup>1</sup>.

Se con la profilassi non si riesce comunque ad impedire l'occlusione coronarica e l'IMA, è necessario intervenire con farmaci trombolitici. La prima linea di trattamento sono farmaci attivatori del plasminogeno tissutale (tPA) 0.5 mg/Kg/h per 6 ore, in associazione ad ASA a basse dosi e EBPM, con un attento monitoraggio del paziente per il rischio di sanguinamento<sup>1</sup>. Nei pazienti a maggior profilo di rischio è stata dimostrata un'aumentata tendenza alla recidiva della trombosi. In questi casi si è proposta la combinazione di bassa dose di trombolitico e Abiciximab, anticorpo monoclonale inibitore della glicoproteina IIb/IIIa (0.25 mg/Kg in bolo in 30 min seguito da 0.125 µg/ Kg/ min in 12 ore) <sup>1</sup>. La rivascolarizzazione meccanica dovrebbe essere evitata nella fase acuta della KD. È raccomandata invece nei pazienti con angina stabile e alto rischio per lesioni coronariche, disfunzione ventricolare sinistra o diabete, in pazienti con ischemia silente di più del 10% del ventricolo sinistro o pazienti senza sopraelevazione del tratto ST in cui l'angiografia ha evidenziato un possibile miglioramento post-rivascolarizzazione<sup>1</sup>.

Infine, per le forme di KDSS, in aggiunta alla terapia standard, è necessario ricorrere a *plasma expanders*, agenti vasoattivi come Dobutamina, Adrenalina e Noradrenalina e al trasferimento in Terapia Intensiva. La stabilità emodinamica nella KDSS tende a migliorare rapidamente dopo trattamento con diuretici e vasopressori, ma in alcuni casi può persistere una lieve disfunzione diastolica ventricolare<sup>1</sup>.

### *Prognosi*

La prognosi dei bambini con KD si basa sull'estensione del coinvolgimento coronarico alla diagnosi e al follow-up. Circa la metà delle CALs mostra regressione all'angiografia entro 1-2 anni dall'esordio. Man mano che l'aneurisma si rimodella però, si assiste ad un aumentato rischio di stenosi e occlusioni trombotiche<sup>1</sup>. Per questo motivo le linee guida AHA hanno stratificato il profilo di rischio dei pazienti con KD, proprio sulla base dello Z-score. La gravità delle anomalie coronariche è in grado di definire la categoria di rischio per la gestione a lungo termine e per la prognosi. Vengono quindi distinte 5 categorie in base allo Z-score massimo e attuale e alle dimensioni assolute delle coronarie (**Tabella 4**)<sup>1</sup>.



Classe	Descrizione
1	Nessun coinvolgimento in nessun momento (Z-score sempre <2)
2	Solo dilatazione (Z-score da 2 a <2.5)
3	Aneurisma piccolo (Z-score da $\geq 2.5$ a <5)
3.1	Attuale o persistente
3.2	Riduzione a dilatazione o ritorno alla dimensione luminale normale
4	Aneurisma medio (Z-score da $\geq 5$ a < 10 e dimensione assoluta < 8 mm)
4.1	Attuale o persistente
4.2	Riduzione a aneurisma piccolo
4.3	Riduzione a dilatazione o ritorno alla dimensione luminale normale
5	Aneurisma grande o gigante (Z-score $\geq 10$ , o dimensione assoluta $\geq 8$ mm)
5.1	Attuale o persistente
5.2	Riduzione a aneurisma medio
5.3	Riduzione a aneurisma piccolo
5.3	Riduzione a dilatazione o ritorno alla dimensione luminale normale

**Tabella 4. Classificazione del rischio delle anomalie coronariche durante il follow-up.**

Il profilo va da un rischio 1, senza coinvolgimento coronarico in cui i pazienti faranno l'ecocardiogramma durante la fase acuta, la fase subacuta e a 6-8 settimane. Questi pazienti avranno un rischio di sviluppare IMA paragonabile alla popolazione sana e potranno interrompere l'ASA a 6-8 settimane. Nella classe di rischio 5, invece, sono inclusi i pazienti che presentano aneurismi giganti in cui si richiede un follow-up molto più stretto e un trattamento protratto nel tempo<sup>1</sup>. Oltre allo Z-score e alle dimensioni delle coronarie le linee guida dell'AHA inseriscono nella stratificazione del rischio anche altri parametri che possono essere presi in considerazione dal clinico, come il numero degli aneurismi, la loro localizzazione, le irregolarità intraluminali, le calcificazioni, la trombosi o la storia di IMA pregresso<sup>1</sup>.

In base al profilo di rischio viene definita anche la frequenza del follow-up, la valutazione del profilo di rischio cardiovascolare, l'eventuale esecuzione di esami strumentali di secondo livello (ad esempio la prova da sforzo, la scintigrafia cardiaca, la Tomografia a Emissione di Positroni - PET- e la Risonanza Magnetica -RM- cardiaca), l'utilizzo di esami strumentali invasivi (ad esempio l'angiografia, l'ecografia intravascolare o l'angio-tomografia computerizzata -TC- o angio-RM), e le eventuali modifiche terapeutiche.

### *Danno endoteliale nella KD*

L'endotelio, situato nella superficie interna delle arterie coronarie, funge da interfaccia tra il torrente circolatorio e l'avventizia e rappresenta uno dei bersagli delle cellule infiammatorie durante la fase acuta di KD. Inoltre, d'altra parte, le cellule endoteliali possono secernere una varietà di citochine proinfiammatorie, che partecipano all'induzione della risposta immunitaria sistemica e dell'attività infiammatoria<sup>55</sup>. La disfunzione endoteliale nella KD e la sua possibile associazione con la formazione di CALs sono state oggetto di interesse di vari studi in letteratura negli ultimi anni<sup>56,57</sup>.

Le metodiche che possono essere utilizzate per quantificare la presenza e la gravità del danno sono diverse. Tra i test funzionali non invasivi ricordiamo la dilatazione flusso-mediata (FMD), la tonometria arteriosa periferica (PAT), la flussometria laser-doppler, l'analisi con contrasto laser-speckle e la *near-infrared spectroscopy*<sup>56,57</sup>. La modalità più utilizzata per studiare il danno endoteliale è la FMD. La FMD è una metodica non invasiva, in cui la reattività vascolare viene studiata misurando la capacità dell'arteria brachiale di dilatarsi in risposta a un aumento del flusso ematico e più precisamente dello "shear stress". Il mediatore principale della FMD è l'ossido nitrico (NO), che viene generato dall'attivazione dell'eNOS, presente nell'endotelio: la FMD, pertanto, può realizzarsi soltanto in presenza di endotelio integro.

Gli studi sulla disfunzione endoteliale misurata mediante FMD nella KD, mostrano una ridotta FMD nei pazienti in fase acuta, subacuta e cronica della KD<sup>58,59</sup>. Nella quasi totalità degli studi i pazienti con CALs presentavano alterazione della FMD. Uno studio ha riportato una significativa correlazione negativa tra la gravità delle CALs e la FMD in fase acuta<sup>60</sup>. Lo et al., hanno confermato un'alterata FMD anche in pazienti con pregressa KD, soprattutto in quelli con CALs, suggerendo un danno endoteliale persistente, anche a distanza dalla fase acuta di malattia<sup>61</sup>. Più recentemente, Routhu al., hanno studiato la FMD nelle fasi acute e convalescenti della KD utilizzando una metodica innovativa e standardizzata, e cioè un software informatico di rilevamento automatico dei bordi, confermando una significativa riduzione della FMD nei pazienti durante la fase acuta e di convalescenza della KD rispetto ai bambini sani<sup>62</sup>.

Nel 2013 Tan et al. hanno utilizzato un'altra metodica che impiega il dosaggio dei livelli di microparticelle endoteliali (EMPs) per quantificare il danno dell'endotelio vascolare<sup>63</sup>. Le EMPs sono vescicole formate da componenti citoplasmatici e fosfolipidi di membrana in modo variabile e presentano diversi markers di superficie (ad esempio CD31, CD146 e altri). Nel paziente sano il rilascio di EMPs è stabile e ben definito, mentre in condizioni di attivazione dell'apoptosi o della lisi cellulare il numero di EMPs circolanti aumenta<sup>63</sup>.

Un'altra metodica in via di sviluppo e dalle ampie potenzialità di applicazione è il dosaggio delle cellule endoteliali circolanti (CECs) nel siero, tema centrale della ricerca argomentata nella presente tesi. Già nel 2003 Nakatani et al. hanno impiegato questa metodica per studiare il danno endoteliale nei pazienti con KD e l'eventuale associazione con le CALs<sup>64</sup>. Lo studio dimostra che il numero di CECs aumenta significativamente dalla fase acuta alla fase subacuta della KD rispetto sia alla fase convalescente della KD che ai bambini sani. Il numero medio di CECs, inoltre, risulta significativamente più elevato nei pazienti con CALs rispetto ai pazienti senza coinvolgimento coronarico<sup>64</sup>. I risultati suggeriscono, quindi, che il numero di CECs possa riflettere il danno endoteliale che avviene nella KD<sup>64</sup>. In aggiunta, Mostafavi et al. hanno impiegato questa metodica per comprendere quanto a lungo durasse la disfunzione endoteliale nei pazienti con KD. Nella loro ricerca hanno evidenziato come nei pazienti affetti in passato da KD, il numero di CECs rimanesse elevato nel sangue anche anni dopo la malattia<sup>65</sup>.

## **KD e Pandemia da SARS-CoV-2: la Multisystem Inflammatory Syndrome in Children**

Il 9 gennaio 2020 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato l'avvenuto isolamento da parte delle autorità sanitarie cinesi, di un nuovo ceppo di coronavirus mai identificato prima nell'uomo: il 2019-nCoV (conosciuto anche come COVID-2019), poi ridenominato SARS-CoV-2. Il virus è stato associato a un focolaio di casi di polmonite registrati a partire dal 31 dicembre 2019 nella città di Wuhan (Cina centrale). Il 30 gennaio l'OMS ha dichiarato l'epidemia da COVID-19, un'emergenza di sanità pubblica di rilevanza internazionale e successivamente, in data 11 marzo 2020 è stata ufficialmente dichiarata la pandemia.

Francia e Italia sono stati i primi Paesi europei ad essere colpiti, con un'epidemia che si stima sia iniziata a febbraio 2020. In Italia, un focolaio di infezioni da SARS-CoV-2 è stato rilevato il 21 febbraio 2020 a partire da 16 casi confermati a Codogno in Lombardia, aumentati a 60 il giorno successivo, con i primi decessi segnalati il 22 febbraio. La Lombardia è stata infatti la regione più interessata, nello specifico con 5510 (66.1%) su 8342 casi in tutta Italia al 9 marzo 2023<sup>66</sup>. A Marzo 2020 Verdoni et al. descrivono sul giornale *The Lancet* 10 casi (7 maschi e 3 femmine) di età compresa tra 5 e 7 anni, con una patologia simile alla KD (definita dagli autori *KD-like*) verificatasi a Bergamo (città con il più alto tasso di infezioni e decessi in Italia in quel periodo) durante il picco della pandemia nel paese, con un'incidenza mensile circa 30 volte superiore a quella osservata per la KD nei 5 anni precedenti<sup>67</sup>. Tra questi 10 casi, 5 avevano una clinica sovrapponibile alla KD, con congiuntivite non essudativa, eruzione cutanea polimorfa, alterazioni della mucosa orale ed anomalie delle estremità. Gli altri 5, invece, presentavano meno di 3 segni clinici diagnostici della malattia. Le alterazioni laboratoristiche riscontrate (alcune insolite nella KD), l'età più elevata di insorgenza, la maggiore gravità della malattia con rischio elevato di ipotensione, necessità di inotropi ed espansori di volume, l'incidenza estremamente superiore rispetto agli anni precedenti, suggerisce al gruppo di Bergamo, una possibile associazione con la pandemia<sup>67</sup>. La conferma dell'associazione tra la sindrome osservata e l'infezione da SARS-CoV-2 avviene con il riscontro di sierologia positiva per SARS-CoV-2 in 8 pazienti su 10.

Poche settimane dopo la diffusione dell'epidemia nella Provincia di Bergamo, altre Province italiane e altre città metropolitane del mondo tra cui Londra, Parigi e infine New York hanno assistito alla diffusione incontrollata del virus e all'insorgere, nei pazienti pediatrici, di forme simili a quella descritta da Verdoni et al<sup>67</sup>. I primi di maggio il Royal College of Paediatrics and Child Health di Londra ha emesso delle linee guida sulla "*Paediatric Multisystem Inflammatory Syndrome temporally associated with Covid-19*" (PIMS-TS) sulla scia di una prima segnalazione,

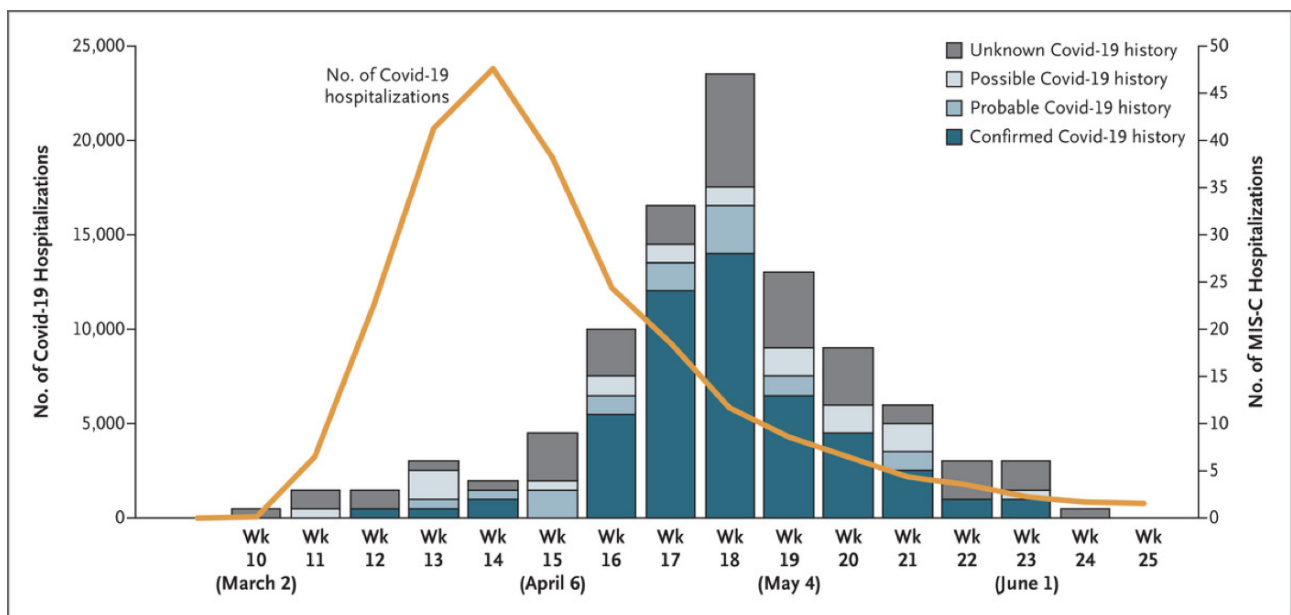
pubblicata il 6 maggio, di 8 casi pediatrici di shock iperinflammatorio raccolti nella metà del mese di aprile<sup>68,69</sup>. Gli autori hanno ricondotto tale sindrome ad una forma infiammatoria simile alla Kawasaki atipica, alla KDSS o alla sindrome dello shock tossico<sup>68</sup>. Contemporaneamente il Dipartimento di Salute dello Stato di New York ha diffuso anch'esso un *alert* sulla PIMS, mentre a metà maggio il CDC e l'OMS hanno definito i criteri diagnostici per la “*Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) associated with Coronavirus Disease 2019*”<sup>70,71</sup>. I report di casi si sono susseguiti nelle settimane successive in Francia, Inghilterra, Stati Uniti e Spagna fino a raggiungere i 662 casi al 25 luglio<sup>72</sup>. I vari studi pubblicati hanno permesso di identificare le principali caratteristiche di distinzione tra la MIS-C e la KD, tra cui un'età di insorgenza di elevata, una maggior incidenza nell'etnia africana e ispanica, alterazioni laboratoristiche diverse, una netta preponderanza di forme complicate da shock, un'incidenza di dilatazioni/aneurismi delle coronarie fino al 20% e una maggior prevalenza di sintomi gastrointestinali e neurologici<sup>70,71</sup>.

### *Epidemiologia*

La MIS-C sembra essere una complicanza relativamente rara dell'infezione da SARS-CoV-2 in età pediatrica, con un'incidenza inizialmente stimata tra i 45 e i 54 casi/100000 infezioni da SARS-CoV-2 nei bambini di età inferiore ai 15 anni<sup>73,74</sup>. Rispetto ai primi dati, l'incidenza della MIS-C sembra essersi ridotta nel corso del tempo<sup>75</sup>. Infatti, diversi studi condotti in tutto il mondo (Stati Uniti, Europa, Asia e Africa) concordano sulla minore incidenza della MIS-C durante le onde *Delta* e *Omicron* del virus SARS-CoV-2 rispetto alle varianti precedenti<sup>76-80</sup>. La stessa tendenza è stata confermata anche in Grecia, dove l'incidenza stimata della MIS-C è stata notevolmente ridotta da 3.5/1000 in *Alpha* a 0.25/1000 nel periodo di predominanza della variante *Delta*<sup>80</sup>. Anche in Israele, dopo la diffusione della variante *Omicron*, l'incidenza e la gravità della MIS-C sono risultate ancora più basse rispetto alle onde di variante *Alfa* e *Delta*, mentre in uno studio condotto in Sudafrica a novembre 2021 non è stato diagnosticato alcun caso di MIS-C<sup>80</sup>. È possibile che l'epidemiologia della MIS-C sia notevolmente cambiata in seguito all'esposizione diffusa della popolazione pediatrica a varie ondate di SARS-CoV-2, in particolare alla variante *Omicron*, caratterizzata principalmente da un aumento dei tassi di trasmissibilità o reinfezione. La riduzione del numero di casi di MIS-C potrebbe essere legata non solo all'immunità preesistente al SARS-CoV-2, dovuta a un'infezione naturale, ma anche alla vasta campagna di vaccinazione<sup>81</sup> che sembrerebbe essere protettiva nei confronti dello sviluppo della malattia<sup>82-84</sup>. Infatti, durante l'ondata *Omicron*, uno studio di Holm et al. ha dimostrato che l'incidenza della MIS-C era notevolmente ridotta tra i bambini vaccinati rispetto a quelli non vaccinati<sup>85</sup>.

Sebbene alcuni bambini con MIS-C soddisfino i criteri per KD completa o incompleta, l'epidemiologia differisce da quella della KD classica. La maggior parte dei casi di MIS-C si è verificata in bambini più grandi ( $\geq 5$  anni) e adolescenti<sup>86,87</sup>. Inizialmente sono stati riportati tassi più elevati di insorgenza della malattia in bambini neri e ispanici, sebbene questo trend non sia stato confermato con la variante *Omicron* del virus<sup>88</sup>.

Fin dall'inizio della descrizione della patologia, è stata individuata una correlazione temporale tra i picchi di infezioni da SARS-CoV-2 e i casi di MIS-C, con una latenza di circa 2-6 settimane<sup>89</sup> (**Figura 8**). Questo ritardo coincide con i tempi di acquisizione dell'immunità, suggerendo che la MIS-C rappresenti una complicanza post-infettiva del virus piuttosto che un'infezione acuta.



**Figura 8. Distribuzione temporale dei ricoveri per COVID-19 e MIS-C in Francia tra il 2 marzo e il 21 giugno 2020.**

*Da Belot A, Levy-Bruhl D. Multisystem inflammatory syndrome in children in the United States. The New England Journal of Medicine 2020;383:1793-4.*

### Eziopatogenesi

La fisiopatologia della MIS-C non è stata ancora ben compresa. L'ipotesi più probabile è l'insorgenza di una disregolazione immunitaria, quindi un'anomala risposta immunitaria al virus SARS-CoV-2, che determina uno stato iperinflammatorio e a una disfunzione endoteliale, causa aumento della permeabilità capillare (*capillary leak*) e insufficienza multiorgano. In particolare, esiste una sovrapposizione clinica e di laboratorio con alcune altre condizioni iperinflammatorie, come la KD, la KDSS, la linfoistocitosi emofagocitica (HLH), la sindrome da attivazione dei macrofagi (MAS) e la sindrome da shock tossico (TSS)<sup>90</sup>. Sulla base degli studi disponibili, però, la MIS-C sembra presentare un immunofenotipo distinto dalla KD<sup>91-93</sup>. I meccanismi esatti, però,

con cui il SARS-CoV-2 innesca la risposta immunitaria anomala sono sconosciuti e ancora oggetto di studio.

Gli studi finora condotti suggeriscono nella MIS-C una peculiare attivazione sia dell'immunità innata sia nell'immunità umorale. L'espressione di CD11b, CD66b, del *Leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1* (LAIR-1) e del *Programmed death-ligand 1* (PD-L1) nei neutrofili è risultata significativamente più alta nei pazienti con MIS-C<sup>94</sup>. Nella MIS-C, inoltre, vi è una notevole up-regulation di geni (ad esempio CCRL2, ELMO2, GPR84, IRF7, IFIT3 e MX1), che sono responsabili della chemiotassi dei neutrofili e sono coinvolti in molteplici vie immunologiche, tra cui l'attivazione dell'IFN di tipo I e II o la stimolazione dell'integrina  $\beta 2$ , sebbene l'espressione delle APC sia relativamente ridotta<sup>95</sup>.

In uno studio di de Cevins et al., il *signaling* del *Nuclear Factor kappa B* (NF-kB), i valori di VEGF e le vie infiammatorie (IFN di tipo I e II, IL-1, IL-6 e IL-17) erano sostanzialmente aumentati nei pazienti con MIS-C<sup>96</sup>. Un campionamento di monociti e cellule dendritiche di pazienti con MIS-C ha rivelato una diminuzione significativa dell'espressione degli inibitori di NF-kB (tra cui NFKBIA, NFKBID, NFKBIE e NFKBIZ)<sup>96</sup>. Nella MIS-C senza miocardite, l'espressione di TRAIL, IL-7, IL-2, IL-13, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha 2$ , IL-17A e Granzyme B era leggermente aumentata rispetto alla MIS-C con coinvolgimento miocardico<sup>96</sup>. Un'alterazione delle vie di segnalazione dell'IFN di tipo I e II, insieme alla sovraespressione di molti geni IFN-stimolati (ISG) (JAK2, STAT1, STAT2, IFITM1, IFITM2, IFI35, IFIT1, IFIT3, MX1, IRF1) nelle cellule dendritiche e nei monociti è stata dimostrata anche nei pazienti con MIS-C senza miocardite esclusiva<sup>96</sup>. L'aumento di VEGF, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  suggerisce una modulazione dell'angiogenesi e dell'omeostasi vascolare, mentre l'aumento delle chemochine (CCL2, CCL3, CCL20, CX3CL1 e CX10) può indurre una maggiore migrazione delle cellule verso i siti infiammati<sup>96</sup>. Le citochine infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL1 $\beta$ , IL-13, IL-4 e VEGF, possono potenziare lo sviluppo dei fibroblasti cardiaci in miofibroblasti cardiaci<sup>96</sup>.

Inoltre, nella MIS-C, alcune citochine, come TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-17 e chemochine, come CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL9, CXCL10 o CXCL11, risultano essere più elevate anche rispetto ai pazienti pediatrici con infezione COVID-19 non complicata<sup>97</sup>. L'IL-6 plasmatica è risultata elevata nei pazienti con MIS-C grave, ma i livelli non erano superiori rispetto ai livelli di IL-6 nei pazienti settici pediatrici<sup>98</sup>. Il mediatore infiammatorio IL-17 sembra svolgere un ruolo più importante nella KD rispetto alla MIS-C<sup>92</sup>, mentre i profili citochinici hanno dimostrato che i pazienti con MIS-C grave hanno livelli più elevati di IFN circolante rispetto a quelli con KD<sup>99</sup>. È importante sottolineare che i livelli di citochine e

chemochine possono variare significativamente tra gli studi che utilizzano proporzioni diverse di gruppi di età, tempi di campionamento o metodi diagnostici.

Le risposte immunitarie umorali nella MIS-C coinvolgono anticorpi totali, IgG, IgM e IgA, contro la proteina Spike del SARS-CoV-2 o altre proteine dello stesso. Sebbene la maggior parte dei pazienti abbia anticorpi anti-SARS-CoV-2 rilevabili all'esordio della MIS-C, solo il 30% di loro ha un test positivo di RT-PCR su un tampone nasofaringeo<sup>100</sup>. La diminuzione della carica virale di SARS-CoV-2 rilevata nel tratto respiratorio superiore dei pazienti con MIS-C è indicativa dell'efficacia delle risposte immunitarie innate dei bambini durante la fase acuta della malattia, che consente l'eliminazione precoce del virus nelle vie aeree superiori<sup>80</sup>. Questi dati supportano ulteriormente l'ipotesi che la MIS-C sia correlata alla disregolazione immunitaria che si verifica dopo che l'infezione acuta da SARS-CoV-2 si è risolta. A causa dell'insorgenza ritardata della MIS-C, i livelli di IgM risultano più bassi rispetto alle IgG<sup>101</sup>. Infine, nella MIS-C, i titoli di anticorpi IgA non mostrano differenze significative tra le fasi acuta e convalescente della malattia e sono associati a manifestazioni cliniche gastrointestinali<sup>102</sup>.

Due delle proteine più importanti sono codificate nel genoma del SARS-CoV-2: la proteina spike (S), che è il principale bersaglio antigenico dei linfociti citotossici che stimolano anche anticorpi neutralizzanti, e la proteina nucleocapside (N), responsabile della replicazione dell'RNA virale<sup>103</sup>. Confrontando le risposte anticorpali contro la proteina S (anti-S) e la proteina N (anti-N) del SARS-CoV-2 nei pazienti MIS-C, le prove attuali dimostrano la predominanza di IgG anti-S e un repertorio anticorpale limitato, con una maggiore capacità di attivare i monociti<sup>104-106</sup>. Secondo le attuali evidenze, i neutrofili e i monociti dei pazienti con MIS-C possono avere un'aumentata espressione di CD64, che ha una maggiore affinità con il frammento Fc delle IgG<sup>104</sup>.

Dal punto di vista dell'immunità cellulare, nella MIS-C è stata riportata la linfopenia, simile a quella descritta nei pazienti con infezione acuta da SARS-CoV-2. Sebbene lo studio di Ramaswamy et al. abbia mostrato un'aumentata proliferazione delle cellule T CD4+ nei pazienti con MIS-C rispetto ai controlli sani, altri studi sostengono che la linfopenia nei pazienti con MIS-C colpisca sia le CD4+ che le CD8+<sup>97</sup>. Le cellule T CD8+ nella MIS-C mostrano un aumento delle caratteristiche di citotossicità rispetto a quelle dei bambini sani<sup>107</sup>. L'attivazione delle cellule T CX3CR1+CD8+ è un'altra caratteristica distintiva della MIS-C rispetto alla malattia da COVID-19 in età pediatrica, che potrebbe avere conseguenze sullo sviluppo di complicanze cardiovascolari<sup>108</sup>. Nei pazienti con MIS-C, la percentuale di cellule T CX3CR1+CD8+ attivate diminuisce con il miglioramento delle condizioni cliniche, un dato che ha importanti implicazioni per la malattia<sup>108</sup>. Pertanto, sembra che le cellule T CD8+, in particolare quelle che esprimono CX3CR1, siano persistentemente attivate e disregolate<sup>108</sup>. Le cellule T CX3CR1+ CD8+ attivate e



le cellule T HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> o Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>eCD4<sup>+</sup> attivate sono risultate più abbondanti nella MIS-C rispetto ai pazienti con grave malattia pediatrica, ma la frequenza delle cellule CD8<sup>+</sup>T HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> diminuisce nelle prime due settimane di ricovero nella MIS-C<sup>108</sup>. Uno studio su pazienti affetti da MIS-C, ha dimostrato che il rilascio di IFN- $\gamma$  mediato da cellule T CD8<sup>+</sup> è risultato significativamente più elevato nei bambini affetti da MIS-C rispetto ai bambini ospedalizzati un mese dopo l'infezione acuta da SARS-CoV-2<sup>80</sup>. Pertanto, le risposte delle cellule T svolgono un ruolo importante nella MIS-C e coinvolgono l'attivazione dei linfociti CD4<sup>+</sup>e CD8<sup>+</sup> e le citochine prodotte dai linfociti. Tuttavia, come già accennato, a causa dei diversi metodi immunologici utilizzati per studiare le risposte immunitarie cellulari, i risultati degli studi attualmente pubblicati devono essere interpretati con cautela.

Infine, un'ipotesi controversa è quella che attribuisce alla proteina S del SARS-CoV-2 il possibile ruolo di superantigene nella patogenesi della MIS-C. I superantigeni sono proteine in grado di attivare un ampio repertorio di cellule T tramite il legame incrociato tra l'HLA di classe II e la catena  $\alpha$  o  $\beta$  del dominio variabile del recettore delle cellule T (TCR), aggirando così l'usuale specificità dell'antigene della risposta delle cellule T. All'inizio della pandemia COVID-19, modelli computerizzati hanno suggerito che una sequenza nella proteina S del SARS-CoV-2 avesse le caratteristiche di un potenziale superantigene in grado di legare la catena TCRV $\beta$ 4. Tuttavia, nel 2022 Amormino et al. non hanno riscontrato un'attività superantigenica intrinseca della proteina S<sup>109</sup>. Inoltre, Hsieh et al. hanno studiato la risposta delle cellule T a un pool di peptidi di SARS-CoV-2 in bambini nella fase subacuta della MIS-C<sup>110</sup>. Sebbene le cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> portatrici di V $\beta$ 21.3 fossero numerose, esse non facevano parte della popolazione di cellule T specifiche per il SARS-CoV-2. Questo dato suggerisce che nella maggior parte dei bambini questo repertorio di cellule T si sia espanso in risposta a un antigene non correlato al SARS-CoV-2.

### *Anatomia patologica*

I dati relativi ai riscontri anatomopatologici nei pazienti con MIS-C sono limitati. Uno studio di Dolhnikoff et al. riporta un'autopsia mini-invasiva eseguita su un paziente di 11 anni con MIS-C deceduta per shock cardiogeno refrattario alle terapie vasoattive e al riempimento volemico<sup>111</sup>. L'esame anatomopatologico cardiaco ha mostrato miocardite, pericardite ed endocardite caratterizzate da infiltrazione di cellule infiammatorie. L'infiammazione era principalmente interstiziale e perivascolare, associata a focolai di necrosi dei cardiomiociti ed era composta principalmente da macrofagi, alcuni linfociti CD45<sup>+</sup> e alcuni neutrofili ed eosinofili<sup>111</sup>.

L'analisi del tessuto cardiaco mediante microscopia elettronica ha identificato particelle virali sferiche di 70-100 nm di diametro, coerenti per dimensioni e forma con la famiglia Coronaviridae,

nel compartimento extracellulare e all'interno di diversi tipi cellulari: cardiomiociti, cellule endoteliali capillari, cellule endoteliali endocardiche, macrofagi, neutrofili e fibroblasti. All'autopsia sono stati rilevati anche microtrombi nelle arteriole polmonari e nei capillari glomerulari renali. La polmonite associata alla sindrome respiratoria acuta grave da SARS-CoV-2 era lieve. Deplezione linfoide e segni di emofagocitosi sono stati osservati nella milza e nei linfonodi, indicando una linfoistocitosi emofagocitica secondaria associata a infiammazione sistemica. Sono state osservate anche necrosi tubulare acuta nei reni e necrosi centrolobulare epatica, secondaria allo shock. Il tessuto cerebrale ha mostrato reattività microgliale<sup>111</sup>. L'angiogramma TC post-mortem, eseguita prima dell'autopsia, non ha mostrato alterazioni delle arterie coronarie. L'esame ecografico post-mortem ha mostrato un endocardio iperecogeno e diffusamente ispessito, un miocardio ispessito e un piccolo versamento pericardico<sup>111</sup>.

### *Clinica*

Le caratteristiche cliniche dei pazienti con MIS-C sono variabili ed è evidente che esiste un ampio spettro di gravità della malattia. I casi riportati all'inizio erano tendenzialmente più gravi, con conseguente elevata incidenza di shock, coinvolgimento miocardico e insufficienza respiratoria. È possibile che con il miglioramento dell'accuratezza diagnostica, i casi con shock, disfunzione ventricolare sinistra, insufficienza respiratoria e danno renale acuto siano effettivamente inferiori e che lo spettro della MIS-C vari da forme lievi a forme gravi. Non è chiaro quanto sia comune ciascuna presentazione, con quale frequenza i bambini progrediscono da manifestazioni lievi a manifestazioni più gravi e quali siano i fattori di rischio per tale progressione.

La patologia esordisce, come già accennato, da 2 a 6 settimane dopo l'infezione da SARS-CoV-2, sebbene siano stati riportati dei casi più tardivi, in cui la diagnosi è più difficile ed è fondamentale un'accurata diagnosi differenziale<sup>112</sup>. Tra i sintomi più comuni della patologia sono stati riportati febbre (nel 100% dei casi) e sintomi gastrointestinali (dal 60 al 100% dei casi).

La febbre è un criterio essenziale per la diagnosi di MIS-C, ed è generalmente persistente ed elevata<sup>113</sup>. La maggior parte dei pazienti presenta un coinvolgimento multisistemico, in genere di almeno 4 di sistemi. I più comunemente coinvolti sono: sistema gastrointestinale, cardiovascolare, ematologico, mucocutaneo e respiratorio<sup>114</sup>.

I sintomi gastrointestinali sono molto frequenti (92%) comprendono vomito, diarrea e dolore addominale e sono tipicamente prominenti, tanto da mimare un quadro di addome acuto<sup>114</sup>. Sono stati descritti dei casi di pazienti con MIS-C che hanno eseguito una laparotomia esplorativa, nel sospetto di un addome chirurgico, prima della diagnosi corretta di MIS-C<sup>115</sup>. Il coinvolgimento miocardico con la disfunzione del ventricolo di sinistra è un riscontro abbastanza frequente (dal

51% al 90% dei casi) che può determinare lo shock cardiogeno (dal 32% al 76% dei casi). Sono stati anche riportati: pericardite, valvulopatie e dilatazioni o aneurismi coronarici<sup>114</sup>. Il coinvolgimento cardiaco è stato correlato ad una maggiore gravità di malattia e al rischio di ricovero in ambiente intensivo<sup>116</sup>.

Altri sintomi e segni riportati con frequenza sono i seguenti:

- Rash cutaneo (dal 45% al 76% dei casi)
- Congiuntivite (dal 30% all'81% dei casi)
- Mucosite come alterazioni delle labbra e lingua a fragola (dal 27% al 76% dei casi)
- Sintomi neurocognitivi (dal 29% al 58% dei casi), che includono cefalea, letargia, confusione o irritabilità. Una minoranza di pazienti presenta manifestazioni neurologiche più gravi, tra cui encefalopatia, convulsioni, coma, ictus, meningoencefalite, debolezza muscolare e segni del tronco cerebrale e/o cerebellari.
- Sintomi respiratori (dal 21% al 65% dei casi), che comprendono tachipnea e difficoltà respiratoria. Sebbene alcuni bambini necessitino di ossigeno supplementare o di ventilazione a pressione positiva, il coinvolgimento polmonare primitivo grave (come ad esempio nel caso della sindrome da distress respiratorio acuto - ARDS) non è una caratteristica così frequente. Al contrario, questi sintomi possono essere secondari a shock o edema polmonare cardiogeno.
- Mialgie (dall'8% al 17% dei casi)
- Edema delle mani e dei piedi (dal 9% al 16% dei casi)
- Linfadenopatia (dal 6% al 16% dei casi)<sup>114</sup>.

Altri organi coinvolti possono essere, nello specifico:

- il rene, con grado variabile di disfunzione, fino all'insufficienza renale acuta;
- il fegato, con possibile epatite;
- le sierose, con possibile versamento pleurico, pericardico e ascite<sup>114</sup>.

In considerazione dell'elevata variabilità clinica e di severità di malattia con cui si può manifestare la MIS-C un gruppo di ricercatori americani a fine luglio 2020 hanno utilizzato un modello statistico computerizzato per identificare diversi sottotipi della patologia<sup>117</sup>. L'analisi ha identificato tre sottogruppi:

- MIS-C con sovrapposizione a KD o COVID-19 acuto: questo gruppo comprendeva il 35% della coorte. Quasi tutti i pazienti di questo gruppo presentavano un coinvolgimento cardiovascolare e gastrointestinale e la metà aveva un coinvolgimento di più di 4 organi aggiuntivi. I pazienti di questo gruppo avevano maggiori probabilità di avere shock,

disfunzione cardiaca ed indici di flogosi (PCR e ferritina) marcatamente elevati. Quasi tutti i pazienti di questo gruppo avevano positività della sierologia per SARS-CoV-2.

- MIS-C con sovrapposizione a KD: 35% della coorte. I bambini di questo gruppo erano più giovani rispetto agli altri due gruppi (età media 6 contro 9 e 10 anni, rispettivamente). I pazienti presentavano più comunemente coinvolgimento mucocutaneo e meno comunemente shock o disfunzione miocardica. Circa due terzi dei pazienti in questo gruppo avevano sierologia SARS-CoV-2 positiva con RT-PCR negativa e un terzo era positivo ad entrambi i test.
- MIS-C con sovrapposizione a COVID-19 acuto grave: questo gruppo comprendeva il 30% della coorte. Questi bambini presentavano un coinvolgimento respiratorio, tra cui tosse, apnea, polmonite e ARDS. La maggior parte di questi bambini avevano una RT-PCR per SARS-CoV-2 positiva con anticorpi negativi. Il tasso di mortalità era più alto in questo sottogruppo rispetto agli altri due sottogruppi (5.3 contro 0.5 e 0%, rispettivamente)<sup>117</sup>.

#### *Esami di laboratorio e strumentali*

Le anomalie di laboratorio rilevate nei pazienti con MIS-C sono compatibili con un'importante infiammazione sistemica. Alcune di queste sono simili a quelle riscontrate nella KD, mentre altre sono peculiari. Tipiche alterazioni degli esami ematici durante la fase acuta della MIS-C sono: leucocitosi, con una predominanza di neutrofilii, linfopenia (riscontrata dall'80% al 95% dei casi), anemia e trombocitopenia e aumento degli indici di flogosi, spesso marcatamente elevati<sup>87,114</sup>. Nello specifico si riscontra un aumento di PCR, VES, D-dimero, fibrinogeno, ferritina, procalcitonina (PCT) e delle IL. In aggiunta, si rileva un tipico aumento dei markers di danno miocardico, come troponina e peptide natriuretico cerebrale o peptide natriuretico di tipo B (BNP)<sup>87,114</sup>. Si riscontrano inoltre: ipoalbuminemia, aumento delle transaminasi, aumento della lattato deidrogenasi (LDH) e ipertrigliceridemia<sup>87,114</sup>. I markers laboratoristici di flogosi sono risultati essere correlati alla gravità della malattia<sup>116</sup>.

Alla luce del coinvolgimento cardiaco nei pazienti con MIS-C, come nei pazienti con KD, è importante eseguire ECG ed ecocardiografia all'esordio, seguite da uno stretto monitoraggio.

Nei bambini con MIS-C, l'ECG basale può mostrare anomalie non specifiche (ad esempio, alterazioni della ripolarizzazione con anomalie dei segmenti del tratto ST o dell'onda T), sebbene siano stati descritti aritmia e blocco cardiaco<sup>68,118</sup>. Il blocco atrioventricolare di primo grado si verifica in circa il 20% dei pazienti ospedalizzati<sup>119</sup>. In questi casi è opportuno il monitoraggio telemetrico poiché questo può progredire fino a un blocco atrioventricolare di alto grado.

All'ecocardiografia sono state descritte le seguenti anomalie: disfunzione del ventricolo di sinistra, anomalie coronariche comprensive di dilatazioni e aneurismi, insufficienza valvolare (soprattutto mitralica) e versamento pericardico.

La ridotta funzionalità del ventricolo sinistro è il riscontro più comune nei pazienti con MIS-C<sup>117,118,120</sup>. Nello specifico, in uno studio che ha arruolato 503 pazienti con MIS-C sottoposti a ecocardiografia, il 34% aveva una frazione di eiezione del ventricolo sinistro depressa (LVEF) e il 13% aveva aneurismi coronarici<sup>120</sup>. Tra i pazienti con funzione ventricolare sinistra depressa, la riduzione era lieve nel 55% dei casi, moderata nel 23% e grave nel 22%. La maggior parte degli aneurismi coronarici (93%) erano lievi, il 7% era moderato. Non sono stati rilevati aneurismi coronarici grandi o giganti. Nel 91% dei pazienti, la funzione del ventricolo sinistro si è normalizzata entro 30 giorni e quasi tutti i pazienti con dati di follow-up a 90 giorni disponibili avevano una funzionalità normale. Gli esiti per gli aneurismi coronarici sono stati altrettanto favorevoli, regredendo alla normalità ( $Z\text{-score} < 2.5$ ) in più di tre quarti dei pazienti affetti entro 30 giorni e in tutti i pazienti con dati di follow-up disponibili a 90 giorni. In un altro studio pubblicato su *Circulation* gli autori sottopongono 42 pazienti con MIS-C ad una RM cardiaca. La RM ha mostrato evidenza di edema del miocardio in un terzo dei pazienti valutati con un *late-enhancement* del gadolinio nel 14% dei casi, suggestivo di danno dei miocardiociti<sup>118</sup>. Diversi studi hanno dimostrato come la riduzione della funzionalità del ventricolo di sinistra sia più comune nei pazienti con MIS-C rispetto ai pazienti con KD, mentre le anomalie coronariche siano più peculiari dei secondi<sup>87,121</sup>.

Riguardo alle anomalie coronariche, già accennate, queste possono essere, come nella KD, dilatazione e aneurismi. La loro valutazione ecocardiografica si basa sullo Z-score, con lo stesso schema di classificazione utilizzato per la KD, precedentemente illustrato.

Infine, l'ecocardiografia deve anche valutare la funzione valvolare, la presenza e la gravità di un eventuale versamento pericardico e l'eventuale trombosi intracardiaca e/o trombosi dell'arteria polmonare (in particolare la presenza di trombosi apicale nella grave disfunzione ventricolare sinistra).

Oltre all'imaging cardiaco, nei pazienti con MIS-C possono essere eseguiti ulteriori accertamenti strumentali. Nello specifico:

- radiografia (RX) del torace: reperti anomali includono versamento pleurico, addensamenti e atelettasie.
- TC del torace: la TC del torace, quando eseguita, generalmente presenta risultati simili a quelli della RX del torace. L'opacizzazione a vetro smerigliato è un reperto comune.

- imaging addominale: i risultati dell'ecografia addominale o della TC includono falda liquida di lieve entità, ascite e infiammazione intestinale e mesenterica, tra cui ileite terminale, adenopatia/adenite mesenterica ed edema pericolecistico<sup>122</sup>.

### Diagnosi

Come la KD, per la diagnosi di MIS-C sono stati identificati dei criteri che comprendono caratteristiche cliniche, laboratoristiche e strumentali.

Quando sono stati riportati i primi casi sono stati creati criteri diagnostici diversi da diverse agenzie sanitarie, nello specifico l'OMS e il CDC<sup>70,71</sup>. Dal 1° gennaio 2023, però, i criteri del CDC sono stati modificati e sono in linea con la definizione dell'OMS (**Tabella 5**).

Criteri del CDC	Criteri dell'OMS
Tutti i 7 criteri devono essere soddisfatti	Tutti i 6 criteri devono essere soddisfatti
1. Età <21 anni 2. Febbre documentata (TC≥38.0°C) <b>oppure</b> riferita 3. Malattia grave che richiede il ricovero ospedaliero o che provoca la morte 4. Evidenza agli esami di laboratorio di flogosi sistemica (PCR ≥ 3 mg/dL) 5. Coinvolgimento multisistemico di nuova insorgenza in 2 o più categorie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Shock</li> <li>• Coinvolgimento cardiovascolare (troponina elevata o LVEF &lt;55% o dilatazione coronarica, aneurisma o ectasia all'ecodiagramma)</li> <li>• Coinvolgimento ematologico (conta piastrinica &lt;150000 cellule/microL o conta assoluta dei linfociti &lt;1000 cellule/microL)</li> <li>• Coinvolgimento gastrointestinale (dolore</li> </ul>	1. Età compresa tra 0 e 19 anni 2. Febbre di durata superiore a 3 giorni 3. Segni clinici di coinvolgimento multisistemico (almeno 2 dei seguenti): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rash cutaneo, congiuntivite bilaterale non purulenta o segni di infiammazione mucocutanea (bocca, mani o piedi)</li> <li>• Ipotensione o shock</li> <li>• Disfunzione miocardica, pericardite, valvulite o anomalie coronariche (inclusi risultati ecocardiografici o troponina/BNP elevati)</li> <li>• Evidenza di coagulopatia (PT o PTT prolungato; D-dimero elevato)</li> <li>• Sintomi gastrointestinali acuti (diarrea, vomito o dolore addominale)</li> </ul> 4. Aumento degli indici di flogosi (ad es. VES, PCR o procalcitonina)

<p>addominale, vomito o diarrea)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Coinvolgimento dermatologico (eritema o edema delle mani o dei piedi, mucosite orale, secchezza o screpolature delle labbra, lingua a fragola, congiuntivite o altre eruzioni cutanee)</li> </ul> <p>6.</p> <p>a. Conferma dell'infezione da SARS-CoV-2 con uno dei seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● RNA positivo (ad esempio, RT-PCR) durante il ricovero o entro 60 giorni prima o post mortem</li> <li>● Anticorpi positivi (sierologia) associati alla malattia in corso</li> <li>● Test antigenico positivo durante il ricovero o entro 60 giorni prima o post mortem</li> </ul> <p><b>oppure</b></p> <p>b. Anamnesi positiva per esposizione: stretto contatto con un caso confermato o probabile di COVID-19 nei 60 giorni precedenti il ricovero ospedaliero</p> <p>7. Nessuna diagnosi alternativa plausibile</p>	<p>5. Nessun'altra causa infettiva evidente di infiammazione, comprese sepsi batterica e sindromi da shock tossico stafilococcica/streptococcica</p> <p>6. Evidenza di infezione da SARS-CoV-2 - uno dei seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Positività per SARS-CoV-2 mediante RT-PCR</li> <li>● Sierologia positiva</li> <li>● Test antigenico positivo</li> <li>● Contatto con un individuo affetto da COVID-19</li> </ul>
<p><i>Legenda: TC: temperatura corporea; PCR: proteina C reattiva; LVEF: frazione di eiezione ventricolare sinistra; RT-PCR: reazione a catena della polimerasi inversa; PT: tempo di protrombina; PTT: tempo di tromboplastina parziale; VES: velocità di eritrosedimentazione.</i></p>	

**Tabella 5. Criteri diagnostici di MIS-C del CDC e dell'OMS.**

Entrambe le definizioni richiedono febbre, indici di flogosi elevati, almeno due segni di coinvolgimento multisistemico, evidenza di infezione o esposizione a SARS-CoV-2 ed esclusione di altre potenziali cause. Un'analisi dell'applicazione delle due definizioni a due ampie coorti di pazienti MIS-C non ha rivelato differenze significative nel numero di bambini che soddisfano le definizioni<sup>123</sup>.

## *Trattamento*

La gestione del MIS-C si è evoluta nel corso della pandemia. La maggior parte dei bambini affetti da MIS-C viene trattata inizialmente sia con IVIG che con glucocorticoidi sistemici. Le IVIG devono essere somministrate a dose elevate (2 gr/kg, come nella KD) in una singola infusione nell'arco di 8-12 ore<sup>100</sup>. Nei pazienti con obesità, la dose deve essere basata sul peso corporeo ideale. Per i pazienti con disfunzione ventricolare sinistra significativa, per evitare il sovraccarico cardiaco, è possibile somministrare le IVIG in dosi frazionate in due giorni.

Le prove a sostegno dell'uso delle IVIG nella MIS-C sono limitate a una serie di casi in cui circa il 70-95% dei pazienti è stato trattato con IVIG, con o senza farmaci aggiuntivi<sup>67,68,117,120,124,125</sup>. La maggior parte dei pazienti in questi studi è migliorata e ha avuto un recupero della funzione cardiaca. Le prove indirette a sostegno dell'uso delle IVIG provengono da studi che hanno coinvolto pazienti con condizioni simili, tra cui la KD. La terapia isolata con IVIG (senza steroidi) può essere presa in considerazione nei pazienti con malattia lieve (nessuna evidenza di disfunzione cardiovascolare), soprattutto se il paziente ha una condizione preesistente che può giustificare di evitare la somministrazione dei glucocorticoidi (p. es., diabete mellito, ipertensione, obesità).

La terapia con steroidi viene inizialmente somministrata per via endovenosa con Metilprednisolone alla dose di 1-2 mg/kg/die in due dosi frazionate (dose giornaliera massima da 60 a 80 mg)<sup>100</sup>. Una volta che il paziente è apiretico ed è migliorato clinicamente, è possibile passare a una dose orale equivalente di Prednisolone o Prednisone al momento della dimissione (dose massima 60 mg) e poi diminuire gradualmente nell'arco di due o tre settimane<sup>126</sup>. Non sono disponibili dati che confrontino i diversi regimi di dosaggio dei glucocorticoidi nella MIS-C.

Le prove a sostegno dei glucocorticoidi per MIS-C sono limitate a serie di casi in cui circa il 30-80% dei pazienti è stato trattato con glucocorticoidi a dosi variabili, da soli o con IVIG, e la maggior parte dei pazienti si è ripresa rapidamente<sup>117,120,125</sup>. Gli steroidi sembrano ridurre la necessità di terapia aggiuntiva, ridurre il rischio di non responsività alla terapia, determinare una possibile riduzione della necessità di supporto emodinamico con possibile miglioramento della funzione ventricolare, senza apparenti differenze nella mortalità<sup>125-127</sup>.

Inoltre, i pazienti con MIS-C sono a rischio di complicanze trombotiche<sup>128,129</sup>. Ad esempio, i pazienti con grave disfunzione del ventricolo sinistro (FEVS <35%) sono a rischio di trombosi apicale del ventricolo sinistro e quelli con aneurismi coronarici sono a rischio di IMA. Inoltre, i pazienti possono essere a rischio di tromboembolia venosa (TEV) ed embolia polmonare, a causa dell'ipercoagulabilità associata alla malattia COVID-19.

Pertanto, a tutti i pazienti viene somministrata aspirina a basso dosaggio (da 3 a 5 mg/kg al giorno) in genere per 6-8 settimane o fino alla normalizzazione dei marcatori infiammatori, della funzione



del ventricolo sinistro o degli aneurismi (se presenti). Ciò si basa in gran parte su prove indirette provenienti da pazienti con KD. Le eccezioni includono quelli con controindicazioni come piastrinopenia (piastrine -PLT-<100000) o sanguinamento attivo<sup>100</sup>.

I pazienti con TEV in atto o pregresso, grave disfunzione ventricolare sinistra (FEVS <35%) e aneurismi coronarici grandi o giganti devono ricevere una terapia anticoagulante (tipicamente con EBPM). Per i pazienti che non hanno nessuna delle indicazioni sopra elencate per l'anticoagulazione terapeutica ma che presentano un quadro clinico grave che richiede immobilizzazione, linee centrali e ricovero in ambiente intensivo, è consigliata una terapia con EBPM a dose profilattica, a condizione che il rischio di sanguinamento non sia alto<sup>100</sup>.

I pazienti sono considerati refrattari alla terapia iniziale (non responders) se non mostrano miglioramenti entro 24 ore dal trattamento (ad esempio, risoluzione della febbre, miglioramento della funzione d'organo, diminuzione dei livelli dei marcatori infiammatori). Per i pazienti con MIS-C che non rispondono a IVIG e glucocorticoidi a dose da bassa a moderata, sono state suggerite terapie aggiunte come i glucocorticoidi a dose pulsata (Metilprednisolone EV da 10 a 30 mg/kg/die per uno o tre giorni), Infliximab (un inibitore del TNF), Tocilizumab (inibitore dell'IL-6) o Anakinra (inibitore dell'IL-1)<sup>100</sup>. Di questi farmaci, Anakinra (da 5 a 10 mg/kg EV o sottocutanea al giorno per circa tre giorni, dose massima 400 mg/die) e Infliximab (da 5 a 10 mg/kg EV per una dose) sono i più comunemente utilizzati. Le prove a sostegno di questi farmaci per la MIS-C sono limitate a serie di casi e a prove indirette provenienti da studi su pazienti con condizioni iperinflammatorie simili come la MAS e la KD. Gli inibitori di IL-1, IL-6 e TNF sono stati utilizzati come terapia di seconda linea in circa il 10-20% dei pazienti con MIS-C che presentano infiammazione persistente o disfunzione miocardica, con esiti favorevoli in quasi tutti i pazienti<sup>113,114</sup>.

Ulteriori terapie dipendono dalla clinica, dalla gravità della malattia, dall'esito degli esami di laboratorio e strumentali e dalla risposta alla terapia iniziale.

Ad esempio, i bambini con shock cardiocircolatorio devono essere rianimati secondo i protocolli standard. Alcuni bambini affetti da MIS-C possono presentare uno shock vasodilatatore refrattario agli espansori di volume. La gestione si concentra sulla terapia di supporto per mantenere la stabilità emodinamica e garantire un'adeguata perfusione sistemica<sup>100</sup>. L'Adrenalina e la Noradrenalina sono gli agenti vasoattivi di scelta per la gestione dello shock refrattario ai liquidi nei bambini. L'Adrenalina è da preferire quando vi è evidenza di disfunzione ventricolare sinistra. Nei bambini che presentano una grave disfunzione ventricolare sinistra, l'aggiunta di Milrinone e di diuretici EV può essere utile. In caso di malattia fulminante, può essere necessario un supporto

emodinamico meccanico sotto forma di ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO) o di un dispositivo di assistenza ventricolare.

I pazienti che presentano un grave coinvolgimento multisistemico e shock dovrebbero anche ricevere una tempestiva terapia antibiotica empirica ad ampio spettro in attesa dei risultati delle colture, perché la MIS-C può presentarsi con segni e sintomi che imitano quelli dello shock settico e della sindrome da shock tossico<sup>130</sup>. Un regime empirico appropriato è costituito da Ceftriaxone più Vancomicina. Ceftarolina più Piperacillina-tazobactam è un regime alternativo, in particolare per i bambini con danno renale acuto. La Clindamicina viene aggiunta se sono presenti caratteristiche compatibili con una malattia mediata da tossine (ad esempio, eritrodermia diffusa). Gli antibiotici devono essere interrotti una volta esclusa l'infezione batterica in seguito a stabilizzazione clinica del bambino.

Il ruolo delle terapie antivirali SARS-CoV-2 (ad esempio, Remdesivir) nella gestione della MIS-C non è stato ben studiato, ma tali terapie vengono raramente eseguite, a meno che non vi siano caratteristiche cliniche sovrapposte dovute a malattia acuta da COVID-19 alla luce del fatto che la MIS-C rappresenta una complicanza postinfettiva e non un'infezione attiva<sup>114</sup>.

#### *Danno endoteliale nella MIS-C*

Ad oggi, pochi studi si sono concentrati sullo studio del danno endoteliale nei pazienti con MIS-C. Le evidenze, tuttavia, sono a favore del fatto che la disfunzione endoteliale sia uno dei fattori che contribuiscono al danno multisistemico.

Diversi studi hanno riportato un aumento dei valori sierici di una chemochina (monocyte chemoattractant protein 1 o MCP-1) nei pazienti con MIS-C<sup>102,131</sup>. La sovraespressione di MCP-1 durante la MIS-C attrae varie cellule immunitarie tra cui i monociti, che contribuiscono al danno infiammatorio con alterazioni microvascolari, in particolare a livello polmonare<sup>99</sup>.

Uno studio ha dimostrato una riduzione della FMD nei pazienti con MIS-C<sup>132</sup>. Gli autori riportano anche che il grado di disfunzione endoteliale correla con la riduzione della funzionalità del ventricolo di sinistra<sup>132</sup>.

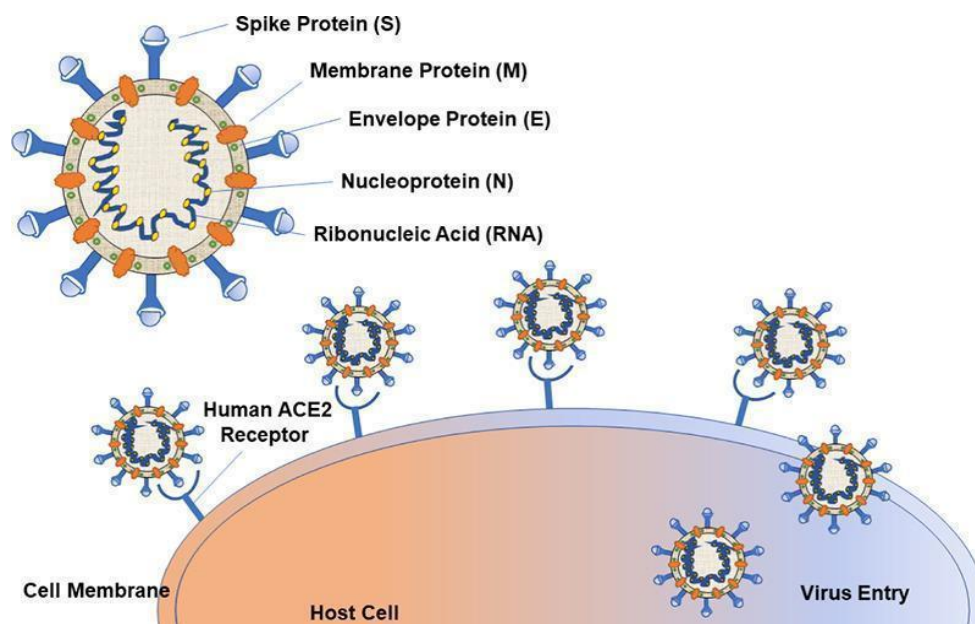
Kreslova et al. indagano la funzione endoteliale nella MIS-C mediante un approccio combinato: la misura dell'iperemia reattiva (RHI) mediante *EndoPAT*, metodo basato su misurazioni pletismografiche non invasive dei cambiamenti del tono arterioso nei vasi arteriosi periferici e il dosaggio di alcuni biomarcatori correlati alla disfunzione endoteliale. Lo studio conclude che i pazienti dopo MIS-C mostrano segni di disfunzione endoteliale, come dimostrato da una RHI ridotta e da biomarcatori endoteliali alterati, nello specifico la Cistatina C<sup>133</sup>.

In aggiunta, Borgel et al. riscontra una correlazione diretta tra le alterazioni dei valori sierici di alcuni markers di danno endoteliale, in particolare E-selectina, angiopoietina-2, antigene del von Willebrand (vW), D-dimero e fibrinogeno, e degli indici di flogosi e la gravità del quadro clinico del paziente con MIS-C<sup>134</sup>. Questa correlazione suggerisce agli autori l'ipotesi che l'iperinfiammazione possa essere responsabile della comparsa di shock nei pazienti con MIS-C, proprio attraverso un'alterazione della funzionalità dell'endotelio.

Il presente studio è stato il primo ad utilizzare l'enumerazione delle CECs come possibile marker di danno endoteliale nei pazienti con MIS-C.

## Infezione da SARS-CoV-2 in età pediatrica

SARS-CoV-2 appartiene alla famiglia dei Coronavirus (CoV), precisamente al genere dei betacoronavirus. Si tratta di un virus di forma sferica delle dimensioni di 100-150 nm dotato delle medesime proteine strutturali presenti negli altri Coronavirus. Esso è in grado di penetrare nelle cellule bersaglio mediante lo stesso recettore di SARS-CoV, ovvero l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE-2), che subisce un legame con la proteina S (**Figura 9**)<sup>135</sup>.



**Figura 9. Rappresentazione schematica della struttura nucleare di SARS-CoV-2 e del meccanismo di interazione con la cellula ospite.**

*Da Naqvi AA, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease 2020;1866:165878*

Il virus sembra essere stato originariamente trasmesso all'uomo da un animale ospite selvatico<sup>136</sup>, sebbene con il progredire dell'epidemia il contagio interumano sia diventato la via di trasmissione predominante. Nello specifico, la diffusione avviene attraverso il contatto a distanza ravvicinata, entro i 2 metri, con i *droplets* respiratori<sup>137</sup>. Sono state descritte in realtà anche altre forme di contagio, come il contatto con superfici contaminate e la persistenza di particelle di aerosol in luoghi chiusi e scarsamente areati, che restano però forme di diffusione secondarie e non sempre dirimenti nella propagazione della pandemia<sup>138,139</sup>. Il virus è stato isolato anche in secreti non respiratori, quali feci, secrezioni oculari, sangue e liquido spermatico<sup>140</sup>. La vicinanza e la durata del contatto correlano in modo diretto con il rischio di trasmissione da parte di un soggetto infetto, ma, nonostante ciò, va ricordato come anche individui asintomatici e pre-sintomatici possano

essere fonte di contagio<sup>141</sup>. Questo aspetto rende estremamente difficoltoso stabilire il rischio di esposizione su base individuale, nonché l'attuazione di precise misure di controllo dell'infezione. Nel corso dei mesi, si sono distinte le cosiddette Voc (*variants of concern*) che, nel corso della diffusione del virus, si sono distinte per il potenziale di trasmissibilità, di patogenicità e di *immune escape*. Ognuna di esse è stata denominata dall'OMS secondo le lettere greche in variante alfa, beta, gamma, delta, epsilon ed omicron<sup>142</sup>:

- la variante *Alpha* (B.1.1.7) è stata isolata nel Regno Unito nel 2020 e ha dimostrato per prima una trasmissibilità importante, tanto da rappresentare la forma dominante fino all'emergenza della variante *Delta*<sup>143</sup>;
- la variante *Beta* (B.1.351) è emersa dal Sudafrica nel 2020, dimostrando una tendenza all'*immune escape* e al rischio di re-infezione<sup>144</sup>. Nonostante sia stata riscontrata in diversi paesi, non è mai diventata una variante dominante a livello globale;
- la variante *Gamma* (P.1) si è sviluppata soprattutto in Brasile, anch'essa senza dare luogo ad un coinvolgimento su scala globale;
- la variante *Delta* (B.1.617.2) è stata identificata per la prima volta in India nel dicembre del 2020 e ha rappresentato la forma principale fino all'emergenza di *Omicron*. Essa ha dimostrato un maggior grado di trasmissibilità, di sviluppo di forme cliniche severe e di ospedalizzazione<sup>145,146</sup>;
- la variante *Omicron* (B.1.1.529) ha iniziato ad emergere nell'autunno 2021, divenendo ben presto la variante prevalente in tutto il mondo. Essa si caratterizza per la presenza di più di 30 mutazioni nella proteina S, che le conferiscono una maggiore trasmissibilità a fronte di una clinica meno severa<sup>147</sup>.

È stato dimostrato che anche i bambini possano sviluppare l'infezione, a qualunque età e con uguale frequenza per entrambi i sessi, con un'incidenza pressoché simile a quella dell'età adulta<sup>148,149</sup>. L'età media dei pazienti infetti è di circa 56 anni e gli uomini sono più colpiti delle donne (forse per la maggior espressione del recettore ACE2 al quale il virus si lega). La mortalità dell'infezione è variabile in base all'area geografica e caratteristiche del paziente e del virus, dallo 0.3 all'8.4%<sup>148</sup>. I dati provenienti dalla Cina e Dagli Stati Uniti mostrano che solo il 2% delle infezioni si verifica sotto i 18 anni di età<sup>150</sup>.

### *Eziopatogenesi*

Nella patogenesi della malattia svolgono un ruolo centrale l'attivazione disregolata del sistema immunitario e la disfunzione dell'endotelio. L'infezione determina l'attivazione della risposta immune CD4+ e CD8+ mediata e la formazione di anticorpi antivirali specifici. I livelli di INF sono

aumentati in molti pazienti e la produzione citochinica sembra essere correlata all'attivazione di cellule immunitarie residenti nei tessuti periferici piuttosto che alle cellule circolanti nel sangue<sup>151</sup>. Inoltre, l'infezione determina l'attivazione dei macrofagi dell'ospite e il rilascio di citochine proinfiammatorie (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , etc.) e di chemochine che inducono la cosiddetta "tempesta citochinica", con conseguente attivazione della cascata coagulativa e danno d'organo diffuso<sup>152</sup>. Nelle forme più severe di infezione da SARS-CoV-2 i pattern citochinici più espressi sono quello dell'IL-1 e IL-6, che rappresentano anche gli attuali target dei farmaci biologici usati in terapia. Negli stadi tardivi dell'infezione man mano che la replicazione virale aumenta, viene compromessa l'integrità della barriera epitelio-endoteliale. Nel polmone ciò si manifesta con polmonite interstiziale dovuta all'infiltrazione di cellule mononucleate e macrofagi all'interno degli spazi alveolari. L'edema interstiziale, che appare all'imaging con aree di ground-glass o patchy porta alla formazione di membrane ialine fino all'ARDS per lesione della barriera endoteliale, disfunzione degli scambi gassosi e ridotta diffusione dell'ossigeno<sup>152</sup>.

La disfunzione endoteliale, in parte causata dall'infiammazione, determina ischemia multiorgano che alimenta a sua volta l'infiammazione stessa, generando una condizione di ipercoagulabilità e aumento del rischio trombotico. L'endotelio svolge dei ruoli cruciali nella patogenesi di diversi processi: controlla la reologia del sangue, il tono vasomotorio, l'equilibrio osmotico e la funzione della barriera vascolare ed è essenziale per l'attivazione del sistema immunitario innato e in parte dell'adattativo. Per questo motivo è il target di molti agenti patogeni virali<sup>153</sup>. Il danno endoteliale in questi pazienti è dimostrato dall'aumento di markers circolanti come il fattore di fattore di vW (vWF), l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 (PAI-1), la trombomodulina solubile, l'angiopoietina 2 e la follistatina e in studi ancora sperimentali delle CECs<sup>154,155</sup>.

### *Clinica*

L'esito clinico dell'infezione da SARS-CoV-2 è estremamente vario, includendo sia forme asintomatiche sia forme evolutive in ARDS. Il virus presenta un periodo di incubazione medio di 4-5 giorni<sup>156</sup>, a seguito del quale possono manifestarsi i sintomi, più frequentemente costituiti da febbre (80%) tosse (60%), astenia (35%), dispnea (15%) associati a cefalea, debolezza muscolare, mal di gola e dolore toracico in una percentuale minore di casi<sup>157</sup>.

Le manifestazioni però possono essere molto più eterogenee e concernere anche l'apparato cardiocircolatorio, renale, endocrino, muscoloscheletrico, nervoso e gastroenterico. Probabilmente l'eterogeneità dei sintomi è legata sia alla distribuzione del recettore ACE2 e quindi del virus nei diversi tessuti ma anche alla sindrome emofagocitica e alla tempesta citochinica associate alle

forme più severe<sup>158</sup>. La maggior parte dei pazienti con tempesta citochinica presenta febbre alta e persistente, anoressia, astenia, cefalea, rash cutaneo, diarrea, artralgie e mialgie. Alcune forme progrediscono rapidamente in CID, emorragie diffuse, shock ipovolemico e morte; altre forme evolvono verso l'ARDS<sup>159</sup>.

Il COVID-19 sembra associarsi a forme più lievi nella popolazione pediatrica, sebbene siano state anche descritte delle forme gravi<sup>160-162</sup>. In una revisione delle cartelle cliniche elettroniche di 82798 bambini statunitensi di età <18 anni con infezione da SARS-CoV-2 confermata tra marzo 2020 e dicembre 2021, il 66% era asintomatico, il 27% presentava sintomi lievi, il 5% sintomi moderati (ad esempio polmonite, gastroenterite, disidratazione) e il 2% presentava una clinica grave, che richiedeva il ricovero in un'unità di terapia intensiva o ventilazione meccanica<sup>163</sup>.

I sintomi più comuni descritti in età pediatrica sono sovrapponibili a quelli di altre forme infettive (ad esempio polmonite, bronchiolite, croup, gastroenterite). La presentazione clinica è simile nei bambini immunocompetenti e immunocompromessi<sup>164</sup>. I sintomi più comuni includono febbre, tosse, difficoltà respiratoria, mialgia, rinorrea, faringodinia, cefalea, nausea e vomito, dolore addominale, diarrea, anosmia e ageusia<sup>165</sup>. Nei lattanti di età inferiore a 12 mesi sono stati descritti anche: difficoltà alimentari, bronchiolite, apnea.

Non è ancora chiaro il motivo della minore severità di COVID-19 in questa fascia di età: a questo riguardo sono state avanzate diverse ipotesi. Le principali sottolineano come le differenze dell'attività immunitaria e dell'espressione del recettore ACE2 nel bambino rispetto all'adulto possano limitare l'entrata del virus, l'infiammazione, l'ipossia ed il danno tissutale<sup>166-168</sup>. A ciò si aggiungono una minore esposizione a individui infetti e un numero ridotto di tamponi eseguiti in questa fascia di età<sup>169</sup>. Fra le complicanze dell'infezione, si annoverano complicanze a carico dell'apparato respiratorio (progressione della polmonite con possibile sviluppo di ARDS), dell'apparato cardiovascolare (aritmie, scompenso cardiaco, miopericarditi, shock cardiogeno, ischemia, tromboembolismo venoso), del sistema nervoso (atassia e convulsioni, deficit motori e sensitivi, encefalopatia, stroke, sindrome di Guillain-Barré) e di altri distretti, fra cui il rene, il tratto digerente e il fegato.

Il rischio di sviluppare una forma severa di malattia è correlato a molteplici fattori legati all'ospite, fra cui si distinguono<sup>170</sup>: obesità; malattie polmonari e cardiovascolari croniche; malattie neurologiche e dello sviluppo; prematurità; immunodepressione; tumori; disturbi ematologici; diabete mellito. Le evidenze mostrano una correlazione fra la presenza di condizioni sottostanti e il rischio di ricovero in Terapia Intensiva Pediatrica e di mortalità<sup>171,172</sup>. Secondo uno studio multicentrico italiano condotto su 759 bambini di età 0-18 anni, la presenza di comorbidità sembra peggiorare considerevolmente il decorso della malattia, aumentando il rischio di

ospedalizzazione, di sviluppo di complicanze, di necessità di supporto ventilatorio e di ricovero in Unità di Terapia Intensiva<sup>173</sup>. In linea generale, il ricovero in Unità di Terapia Intensiva è richiesto di fronte a quadri clinici importanti (tachipnea con dispnea, cianosi, ipossia e/o desaturazione, difficoltà di alimentazione, letargia, convulsioni), ARDS, necessità di supporto inotropo, instabilità emodinamica, insufficienza multiorgano (MOF), sepsi severa e coma. I criteri, pertanto, non si discostano dalle indicazioni per pazienti pediatriche non positivi a SARS-CoV-2 e derivano dalla diretta conseguenza dell'infezione virale (insufficienza respiratoria severa), dalle complicanze dell'infezione (MIS-C) e dallo sviluppo concomitante di altre condizioni (ad esempio sovrainfezione batterica) per cui è richiesto il ricovero<sup>174</sup>. Anche la valutazione del rischio associato alle molteplici varianti del virus non risulta semplice. Vi è tuttora incertezza sulla maggiore severità clinica dei pazienti colpiti dalla variante *Delta*<sup>175</sup>. D'altro canto, la diffusione su larga scala di *Omicron* non sembra correlare con forme più gravi di malattia: nonostante il maggiore tasso di ospedalizzazioni e di accessi in Pronto Soccorso, la durata dell'ospedalizzazione, il rischio di trasferimento in Unità di Terapia Intensiva e il ricorso a supporto di ossigeno sono risultati pari o inferiori alle varianti precedenti<sup>176</sup>.

### *Terapia*

Alla luce delle manifestazioni cliniche dell'infezione da SARS-CoV-2 in età pediatrica, la terapia è in genere come quella di altre forme virali, quindi prevalentemente di supporto<sup>177</sup>. Infatti, la maggior parte dei bambini affetti da COVID-19 migliora con le terapie di supporto, anche quelli con malattia grave<sup>177</sup>. La terapia di supporto include principalmente, nei pazienti con forme lievi, antipiretici, analgesici, utilizzo di soluzioni reidratanti orali ed eventuale terapia aerosolica. Nei casi ospedalizzati, invece, la terapia di supporto include: somministrazione di ossigeno con o senza supporto ventilatorio, infusione di fluidi ed elettroliti, eventuale copertura antibiotica in caso di sospetto di sovrainfezione batterica (seppur rara) ed eventuale profilassi antitrombotica nei casi gravi con fattori di rischio per tromboembolismo.

In pazienti selezionati può essere presa in considerazione, caso per caso, la terapia antivirale, sebbene non siano ancora sufficienti le evidenze in letteratura sull'efficacia e la sicurezza di tali terapie in età pediatrica. La terapia antivirale dovrebbe essere presa in considerazione per i bambini con malattia da COVID-19 grave o critica documentata, oppure per i bambini con malattia lieve o moderata e una condizione di base che aumenta o può aumentare il rischio di malattia grave (ad esempio cardiopatia congenita, immunodeficit, etc)<sup>177</sup>.

Tra i possibili farmaci antivirali, il Remdesivir, profarmaco di un analogo nucleotidico che inibisce la RNA polimerasi dipendente dall'acido ribonucleico e ha attività contro i coronavirus, è



preferibile perché i dati provenienti da studi randomizzati e osservazionali su pazienti adulti suggeriscono che potrebbe ridurre i tempi di recupero (in particolare nei pazienti che non sono critici) e, al tempo stesso, sembra essere ben tollerato<sup>177</sup>. L'autorizzazione per il Remdesivir nei bambini ospedalizzati di età <12 anni è stata supportata da studi condotti su pazienti adulti e da uno studio a braccio singolo, in aperto, condotto su 53 bambini, non vaccinati, di età ≥ 28 giorni con infezione confermata da SARS-CoV-2 lieve, moderata o grave, in cui il Remdesivir era associato a un miglioramento dello stato clinico<sup>178</sup>.

L'altro farmaco antivirale che può essere preso in considerazione in età pediatrica è il Baricitinib, un inibitore della Janus chinasi utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide. Oltre ai suoi effetti immunomodulatori, si ritiene che abbia effetti antivirali attraverso l'interferenza con l'ingresso virale. Il Baricitinib è approvato dalla FDA per il trattamento di pazienti adulti ricoverati in ospedale con COVID-19 e richiedono ossigeno o supporto ventilatorio o ECMO. Per i bambini di età compresa tra 2 e 18 anni, dispone di un'autorizzazione all'uso di emergenza (EUA). Tuttavia, esistono informazioni limitate sui benefici e sui rischi di Baricitinib nei bambini con COVID-19<sup>177</sup>. Idealmente dovrebbe essere utilizzato nel contesto di una sperimentazione clinica.

Ulteriori terapie in pazienti ospedalizzati includono: steroidi a basso dosaggio e la combinazione glucocorticoidi e Tocilizumab (anti IL-6) approvato dall'EUA per pazienti di età superiore ai 2 anni.

I vaccini sono ampiamente considerati la strategia più promettente per il controllo della pandemia da SARS-CoV-2. In Italia, le ultime raccomandazioni del Ministero della Salute, poi condivise anche dalle principali società scientifiche pediatriche nazionali, consigliano la vaccinazione anti-SARS-CoV-2 nei bambini di età superiore ai 6 mesi con condizioni di elevata fragilità (malattie croniche cardiovascolari, polmonari, neurologiche, diabete, insufficienza renale cronica, obesità, patologie oncologiche, immunodeficienze primitive e secondarie, malattie infiammatorie croniche e sindromi da malassorbimento intestinali, sindrome di Down, epatopatia cronica)<sup>179</sup>. Al momento, la campagna vaccinale in Italia, si avvarrà delle nuove formulazioni monovalenti del vaccino Comirnaty Omicron XBB 1.5 (Raxtozinameran). Raxtozinameran è un RNA messaggero (mRNA) a singola elica, prodotto mediante trascrizione *in vitro* senza l'ausilio di cellule (cell-free) dai corrispondenti DNA stampo, che codifica per la proteina S di SARS-CoV-2 (Omicron XBB.1.5). La dose di richiamo è raccomandata a distanza di 6 mesi dall'ultima dose di vaccino anti-COVID-19 ricevuta o dall'ultima infezione, mentre per i bambini non ancora vaccinati (come quelli di età compresa tra 6 mesi e 4 anni), le raccomandazioni del Ministero della Salute prevedono 3 dosi (di cui la seconda a 3 settimane dalla prima e la terza a 8 settimane dalla seconda).

Studi osservazionali hanno dimostrato una riduzione in termini di ospedalizzazione, di ricovero in Unità di Terapia Intensiva e di decesso nelle popolazioni di adolescenti vaccinati<sup>180,181</sup>. Inoltre, nonostante il decorso spesso più lieve rispetto alle altre fasce di età, è stato notato come nei bambini fra i 5 e gli 11 anni il tasso di mortalità per COVID-19 nel biennio 2020-2021 sia stato alto, se comparato alla mortalità pre-vaccinale di infezioni per cui oggi si dispone di strategie di prevenzione (meningococco, varicella, ecc)<sup>182</sup>.

Questo, unito ai rischi di MIS-C, di sequele a lungo termine (Long COVID ed effetti psicologici) e di complicanze severe nei pazienti a rischio, rappresenta il motivo per cui è stata strenuamente promossa la campagna vaccinale anche fra i più piccoli<sup>183,184</sup>.

### *Danno endoteliale nell'infezione da SARS-CoV-2*

Sono state formulate diverse teorie per spiegare la patogenesi del danno endoteliale nell'infezione COVID-19.

Secondo una prima ipotesi il danno endoteliale potrebbe essere il risultato dell'invasione diretta del virus nelle cellule dell'endotelio. Le cellule endoteliali presentano il recettore ACE2 sulla membrana, una volta internalizzato e ridotta la sua produzione in seguito al legame col virus, viene favorita la progressione infiammatoria e pro-fibrotica attraverso la ridotta produzione di angiotensina e quindi ridotta attivazione del recettore MAS (recettore del sistema renina-angiotensina). La riduzione dell'ACE-2 inoltre causa l'attivazione indiretta del sistema callicreina-chinina che induce l'aumento della permeabilità capillare. Dal punto di vista meccanico il SARS-CoV-2 determina la rottura della barriera endoteliale riducendo l'espressione di molecole di adesione di superficie e intracellulari (ICAM-1), VCAM-1 e zonulina<sup>185</sup>. Ci sono molte correlazioni fra infezioni virali e disfunzione endoteliale (HIV, Hantavirus, alcuni Herpesvirus umani come l'HHV-8, il virus Dengue, etc)<sup>186</sup>. I coronavirus sono in grado di legarsi anche ai residui di acido sialico acetilato, proteina abbondantemente espressa sulla membrana cellulare di megacariociti e cellule endoteliali<sup>154</sup>. L'aumentata mortalità nei pazienti anziani e con comorbidità severe potrebbe proprio essere data da un'alterazione della glicosilazione cellulare che si accentua con l'infezione virale. La glicosilazione dell'endotelio vascolare svolge un ruolo essenziale nella regolazione della coagulazione, dell'infiammazione, del flusso transcapillare e della permeabilità microvascolare. È a sua volta stabilizzata dallo *shear stress*, che è essenziale per la produzione di ossido nitrico. Con l'aumentare dell'età la glicosilazione endoteliale è compromessa<sup>187</sup>, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) aumenta e si riduce la quantità di molecole antiossidanti e di NO. Ciò promuove la vasocostrizione e l'attivazione piastrinica aumentando il rischio trombotico<sup>154</sup>. Altre condizioni possono generare la perdita dell'omeostasi della

glicosilazione endoteliale come stress cellulare, danno da ri-perfusione post-ischemica, endotossine, mediatori dell'inflammazone, iperglicemia, ipertensione, ipercolesterolemia, fumo e ridotta attività fisica. Questo fenomeno può quindi complicare numerose patologie come le infezioni acute, la disidratazione, traumi, sepsi, ARDS, preeclampsia, diabete gestazionale, patologie croniche (ipertensione e diabete), patologie renali, aterosclerosi, ictus, demenza, angina e scompenso cardiaco. Anche nelle infezioni virali dal decorso severo come la Dengue si è descritta un'alterazione di questo processo e probabilmente anche la patogenesi del COVID-19 sottende meccanismi simili<sup>187</sup>. A riprova del fatto che il SARS-CoV-2 causi endotelite in diversi studi autoptici sono stati riscontrati corpi inclusi virali all'interno delle cellule endoteliali in associazione a cellule infiammatorie<sup>188</sup>.

Un'altra ipotesi contempla il ruolo della tempesta citochinica nel determinare la disfunzione dell'endotelio nei pazienti con infezione acuta da SARS-CoV-2. IL-6 è in grado di aumentare la permeabilità vascolare e di promuovere la secrezione di altre citochine infiammatorie (come IL-8) da parte delle cellule endoteliali. Il TNF- $\alpha$  è in grado di attivare le gluconidasi che degrada la glicosilazione delle cellule endoteliali luminali e aumenta l'acido ialuronico nella matrice extracellulare promuovendo l'edema<sup>185</sup>. IL-2 attiva numerose cellule: linfociti T attivati e regolatori, linfociti B, monociti, NK e anche le cellule endoteliali polmonari determinando edema polmonare. Inoltre, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  inducono la perdita dei meccanismi antitrombotici ed antinfiammatori delle cellule endoteliali portando a disregolazione della coagulazione, attivazione del complemento, delle piastrine e dei leucociti nelle strutture microvascolari<sup>153</sup>. Anche i fattori C3, C4 e C5 del complemento (target dell'anticorpo monoclonale Eculizumab) sono iperespressi fino all'attivazione della via lectinica e classica una volta che gli antigeni virali e gli anticorpi (IgA e IgG) formano il complesso immune ed attivano il fattore C1. Nel SARS-CoV-2 è stata dimostrata la produzione di autoanticorpi anti-cellule epiteliali polmonari e anti-cellule endoteliali umane che mediano una citotossicità complemento-dipendente. L'attivazione endoteliale complemento-mediata oltre ad indurre la disfunzione aumenta l'esocitosi di multimeri insolitamente grandi VWF, l'attivazione piastrinica e la microtrombogenesi.

Inoltre, anche l'ipossia potrebbe essere un fattore promuovente il danno endoteliale. Essa induce la trascrizione dei fattori indotti dall'ipossia (HIF)-1 e HIF-2 che consentono la sopravvivenza durante l'ipossia attraverso l'espressione di numerosi geni che attivano il metabolismo anaerobio, la sopravvivenza e l'adattamento cellulare. La transizione da HIF-1 a HIF-2 consente l'adattamento dalla ipossia acuta alla cronica. HIF-2 $\alpha$  aumenta l'espressione di proteine tirosino-fosforilate da parte dell'endotelio che di contro riducono la fosforilazione della VE (*Vascular-Endothelial*)-caderina, consentendo di mantenere l'integrità delle proteine di adesione cellulari e prevenire la

perdita d'integrità di barriera. Al contrario l'espressione di HIF-1 $\alpha$  nelle cellule epiteliali polmonari aumenta l'infiammazione NF $\kappa$ B mediata (attraverso CD4+ e citochine) che a sua volta aumenta il danno endoteliale complemento dipendente e l'attivazione di cellule mieloidi<sup>189</sup>. L'ipossia da ARDS altera la funzione endoteliale anche riducendo la sintesi di NO e il rilascio del VEGF<sup>185</sup>.

Lo stato di ipercoagulabilità descritto nell'infezione da SARS-CoV-2 è generato e alimenta a sua volta la disfunzione endoteliale e l'infiammazione. Si parla di tromboinfiammazione (coordinata attivazione della risposta infiammatoria e trombotica), evento che determina eventi tromboembolici diffusi principalmente a livello polmonare, cardiovascolare e cerebrovascolare. Questo meccanismo è legato a diverse componenti dell'infezione da SARS-CoV-2 quali la coagulopatia, l'alterazione della funzione piastrinica, l'infiammazione e la disfunzione endoteliale. La coagulopatia è dimostrata dall'aumento del D-dimero circolante e dalla trombocitopenia moderata e presenta analogie e differenze con la CID. In particolar modo nella CID il tempo di protrombina è aumentato, la trombocitopenia è più severa, i livelli di fibrinogeno sono più ridotti, come la quantità di fattori antitrombotici (antitrombina e antiplasmina). L'alterazione della funzione piastrinica gioca un ruolo importante nella patogenesi del danno vascolare. Le piastrine hanno infatti diversi ruoli nella gestione dell'omeostasi vascolare e immunitaria interagendo con le cellule del sangue circolanti e le cellule endoteliali. Una spiegazione per la trombocitopenia è l'aumentata apoptosi piastrinica con iperattivazione delle piastrine sopravvissute, meccanismo già descritto in patologie cardiometaboliche come il diabete (ciò spiegherebbe l'aumentata mortalità dell'infezione in pazienti con comorbidità). Nell'infezione virale la morte piastrinica potrebbe essere determinata dal consumo piastrinico, dalla tempesta citochinica, dal reclutamento dei neutrofili e la formazione di NET's (*neutrophil extracellular traps*), dall'attivazione del complemento, dalla produzione di autoanticorpi contro antigeni di superficie piastrinici e dall'ipossia. Infine, la formazione del complesso immune è un'altra potenziale causa della iperattivazione piastrinica e della trombocitopenia in un meccanismo simile alla trombocitopenia indotta da eparina. Potrebbe spiegare l'alterata attivazione e produzione di piastrine anche la megacariocitopenia, caratterizzata dall'aumento dei megacariociti sistemici e soprattutto polmonari durante l'infezione<sup>154</sup>. L'infiammazione, attraverso il rilascio di citochine e chemiochine amplifica la trombosi attivando il sistema coagulativo ed inibendo i meccanismi anticoagulanti. I livelli di IL-6 sono direttamente proporzionali a quelli di fibrinogeno<sup>154</sup>, i macrofagi attivati presentano il TF e producono IL-1 $\beta$  e il TNF che aumentano l'espressione della P-selecrina, del vWF e del fibrinogeno sulle cellule endoteliali<sup>185</sup>. Molti studi hanno evidenziato anche la produzione di anticorpi anti-fosfolipidi in pazienti con COVID-19 che aumentano ancora di più il rischio tromboembolico<sup>154</sup>. Pertanto, danno endoteliale ed infiammazione ruotano in un circolo vizioso

nella patogenesi dello stato pro-trombotico. Il danno endoteliale generato dall'invasione virale, dall'attivazione coagulativa e dall'infiammazione, aumenta il rilascio di VEGF che a sua volta amplifica l'espressione del fattore tissutale sull'endotelio e stimola nuovamente la cascata coagulativa<sup>185</sup>. Questo processo compromette la funzione del microcircolo e determina ischemia multiorgano nelle forme più severe dell'infezione da SARS-CoV-2<sup>188</sup>.

## Cellule endoteliali circolanti

L'endotelio costituisce il rivestimento cellulare interno dei vasi sanguigni e del sistema linfatico, ed è quindi a diretto contatto con il torrente circolatorio (e linfatico) e con le cellule del sangue che circolano all'interno. Esso è un sistema cellulare altamente specializzato composto da  $1-6 \times 10^{13}$  cellule endoteliali disposte in fila su una superficie totale di 4000-7000 m<sup>2</sup>. Ha un turn over cellulare molto lento pari allo 0-1% al giorno<sup>190</sup>.

Esso svolge un ruolo essenziale di barriera e di primo sensore dei cambiamenti chimici e fisici che avvengono all'interno del flusso sanguigno. Nello specifico l'endotelio è un attore importante nel controllo della fluidità del sangue, dell'aggregazione piastrinica e del tono vascolare, nella regolazione del sistema immune, dell'infiammazione e dell'angiogenesi, nonché un importante organo metabolico ed endocrino<sup>191</sup>.

Le cellule endoteliali controllano il tono vascolare, e quindi il flusso sanguigno, sintetizzando e rilasciando fattori vasodilatatori e vasocostrittori come l'NO, i metaboliti dell'acido arachidonico attraverso le cicloossigenasi, le lipossigenasi e le vie del citocromo P450, vari peptidi (ad esempio l'endotelina), adenosina, purine, ROS e altre sostanze<sup>191</sup>.

Per svolgere le sue funzioni l'endotelio comunica attivamente con la risposta immunitaria innata e adattativa e con l'attivazione piastrinica. Le cellule endoteliali, infatti presentano pattern recognition receptors come toll-like receptors (TLRs) e NOD-like (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain) receptors in grado di riconoscere i PAMPs e attivare il sistema immunitario innato. Inoltre, comunicano con la risposta immunitaria adattativa poiché esprimono il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e II quindi sono in grado di presentare l'antigene ed esprimono il CD40 e CD40L.

Quando avviene un danno vascolare le cellule endoteliali perdono il loro strato protettivo ricco di glicosaminoglicani, il glicocalice endoteliale ed espongono selectine sovraregolate che sono state esternalizzate sulla superficie cellulare. Le cellule endoteliali attivate secernono citochine proinfiammatorie (ad esempio TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) che reclutano neutrofili e piastrine circolanti nella regione danneggiata. La produzione di ROS e l'omeostasi del calcio disregolata causano una riduzione della produzione dell'NO, vasocostrizione, aumento della permeabilità vascolare ed esposizione della sottostante matrice extracellulare ricca di collagene. In alcuni casi, i neutrofili catturati dalle selectine sovraregolate degranulano, rilasciando ulteriori ROS e MMP che degradano la matrice. I neutrofili aderenti agiscono come punti di cattura secondari per le piastrine circolanti (NET's). Le piastrine secernono a loro volta mediatori piastrinici che, oltre ad attivare l'infiammazione, controllano il tono vascolare e la permeabilità vasale<sup>192</sup>.

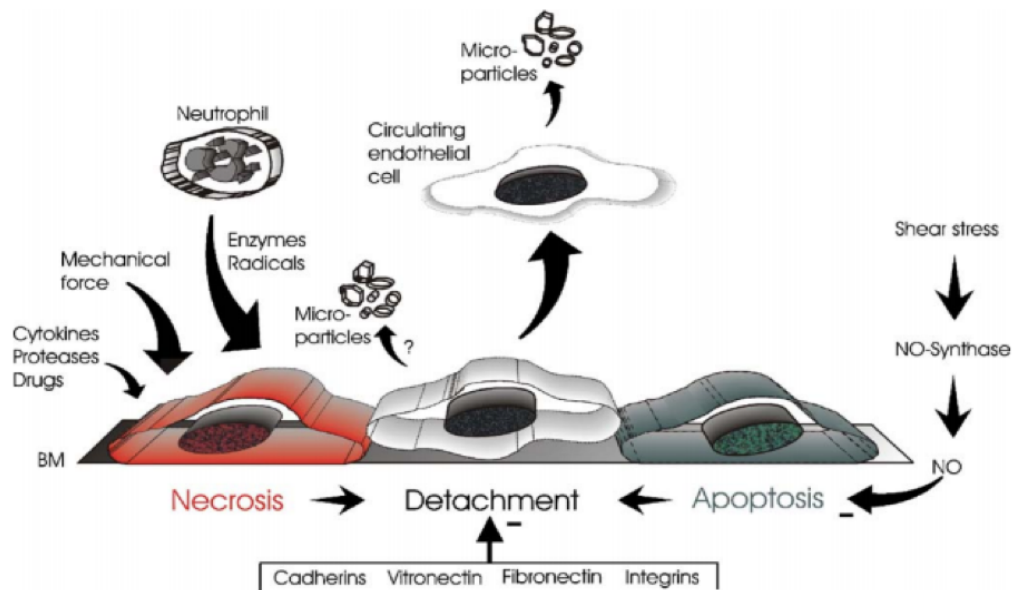
In aggiunta, l'endotelio, in condizioni normali svolge un'attività anticoagulante mediata dal legame trombomodulina/recettore della proteina C endoteliale e la proteina C. Questo legame attiva la suddetta proteina che agisce da anti-anticoagulante e antinfiammatorio. Se però l'endotelio è danneggiato viene ridotta l'efficacia di questo meccanismo e viene incrementata l'espressione del Fattore Tissutale sulle cellule endoteliali, implicato nell'emostasi, nella trombosi e nell'infiammazione<sup>192</sup>. Altri fenomeni in cui è coinvolto l'endotelio sono l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare, processi sono mediati dall'infiammazione e dalla produzione da parte delle cellule immunitarie attive di fattori di crescita endoteliali (es. VEGF). Le cellule endoteliali a loro volta contribuiscono all'infiammazione, attraverso modifiche funzionali (si espandono, aumentano la permeabilità e attivano la diapedesi) e strutturali. Considerando le molteplici funzioni dell'endotelio esso può essere quindi coinvolto in diversi processi patologici che ne determinano l'attivazione e la disfunzione<sup>193</sup>.

L'integrità strutturale e funzionale dell'endotelio è essenziale per mantenere l'omeostasi vascolare. Infatti, la disfunzione endoteliale modifica il fenotipo vascolare promuovendo la vasocostrizione, l'attivazione coagulativa e l'infiammazione. L'alterata funzione endoteliale è stata descritta in numerose patologie come diabete, aterosclerosi, sepsi, insufficienza renale cronica, iperlipidemia, ipertensione ed infarto, ma anche in condizioni para-fisiologiche quali invecchiamento e carenza di estrogeni. Infatti, la disfunzione endoteliale, indice di un'alterata omeostasi vascolare, è stata individuata proprio come uno dei più precoci segni di malattia aterosclerotica<sup>194</sup>. Questa correlazione precoce con diversi stati patologici ha reso la disfunzione endoteliale un potenziale marker in numerose patologie cardiovascolari (es. IMA).

#### *Cellule endoteliali circolanti e cellule endoteliali progenitrici circolanti*

Le CECs sono cellule mature che si distaccano dalla tonaca intima del vaso in risposta al danno endoteliale e vengono distinte dalle EPCs<sup>195</sup>, cellule provenienti principalmente dal midollo osseo che mantengono e promuovono l'integrità endoteliale e sono inversamente correlate al rischio cardiovascolare<sup>196</sup>.

In condizioni normali, infatti, le cellule endoteliali sono allineate all'albero vascolare, aderenti alla membrana basale e solo una piccola frazione di esse si stacca ed entra nel torrente circolatorio per poi essere eliminate dal sistema reticolo-endoteliale<sup>195</sup>. La disfunzione endoteliale (funzionale o meccanica) determina un'irreversibile perdita dell'integrità dello strato endoteliale con distruzione delle molecole d'adesione e conseguente apoptosi e necrosi (**Figura 10**)<sup>197</sup>. Ciò comporta il distacco delle cellule endoteliali e l'aumento della loro conta nel circolo.



**Figura 10. Meccanismi alla base del distacco delle cellule endoteliali**

Da Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clinica chimica acta* 2006;373:17-26.

Il danno meccanico determina il distacco delle cellule endoteliali come dimostrato dall'aumento delle CECs in seguito a puntura arteriosa o venosa, inserimento di stent coronarici e rottura acuta di placca ateromasica<sup>195</sup>. La perdita di funzionalità delle molecole di adesione cellulare come integrine e caderine, può essere generata dal danno da ROS, l'attivazione di citochine come il TNF e l'INF e il rilascio delle proteasi granulocitarie<sup>190</sup>. In molti casi la conta delle CECs si associa a elevati livelli di vWF, di attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), del PAI-1, di trombomodulina solubile, di molecola di adesione cellulare intercellulare tipo 1 (ICAM-1), di molecola di adesione cellulare vascolare; tipo 1 (VCAM-1), di E e P-selectina. Questo suggerisce che l'attivazione endoteliale cronica può essere un meccanismo coinvolto nel distacco cellulare<sup>197</sup>. Le cellule endoteliali apoptotiche ed i frammenti endoteliali da esse derivati attivano a loro volta la produzione di trombina e la via intrinseca della coagulazione attraverso l'espressione di fosfatidilserina sulla membrana, il rilascio di trombossano e l'inibizione di molecole anticoagulanti<sup>196</sup>. La distruzione delle molecole di adesione si traduce nella perdita dei segnali di sopravvivenza, con conseguente distacco e *anoikis* (ovvero una forma di morte cellulare programmata che è indotta dal distacco di cellule ancoraggio-dipendenti dalla matrice extracellulare) delle cellule endoteliali<sup>198</sup>. Solo il 10% delle CECs riscontrate nei pazienti con danno vascolare però è apoptotico con evidente frammentazione del DNA nucleare<sup>196</sup>, questo fa supporre che l'apoptosi non sia l'unico meccanismo responsabile della presenza di CECs. Diversi studi hanno correlato le CECs nel sangue periferico con il danno della barriera endoteliale. Nello specifico, è stato riscontrato un aumento della conta delle CECs in molte patologie associate



a danno endoteliale come ipertensione, diabete, pre-eclampsia e insufficienza renale cronica<sup>198</sup>. Inoltre, in pazienti con scompenso cardiaco il numero delle CECs è stato riscontrato essere inversamente proporzionale alla FMD e in pazienti con sindrome coronarica acuta, invece, direttamente proporzionale ai markers di danno endoteliale come vWF<sup>199</sup>. Il numero delle CECs sembrerebbe anche avere un valore prognostico ed essere predittivo del rischio di sviluppare futuri eventi vascolari in pazienti in emodialisi e di mortalità e morbidità cardiovascolare in pazienti con sindrome coronarica acuta<sup>200</sup>. Infine, la terapia con statine che riduce il rischio di complicanze cardiovascolari e migliora la funzione endoteliale, si associa alla riduzione dei livelli di CECs<sup>201</sup>.

I pionieri del concetto di CECs sono stati Biuvier e Lhadovec che per primi hanno descritto mediante colorazione Giemsa e separazione con centrifuga la presenza di cellule non ematopoietiche di possibile origine endoteliale nel sangue di coniglio, dopo iniezione di endotossine<sup>197</sup>. Poiché la colorazione Giemsa non è specifica per le cellule endoteliali, questi studi si basavano solamente sull'identificazione morfologica delle CECs<sup>190</sup>. Successivamente è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza con anticorpi anti markers endoteliali come il vWF, ma i target utilizzati erano o troppo aspecifici o poco accessibili perché, almeno inizialmente, intracellulari. All'inizio degli anni '90 sono stati individuati dei markers più specifici e si è iniziato ad utilizzare anticorpi monoclonali anti CD146, molecola coinvolta nella formazione del citoscheletro e nel *signaling* cellulare. In questo modo è stato possibile studiare le CECs in numerose patologie<sup>190</sup>. Da allora sono stati identificati altri markers come CD131, CD62e, CD54, CD106 e CD141 specifici di cellule endoteliali e altri markers che permettono di distinguere le CECs dalle altre cellule<sup>198</sup>.

Ad oggi i metodi più utilizzati sono la separazione immunomagnetica e la citometria a flusso in fluorescenza. La separazione immunomagnetica isola le CECs attraverso particelle paramagnetiche rivestite da anticorpi anti-endotelio, solitamente anti-CD146. Anche altre cellule, come i linfociti T esprimono questo marker ma in modo molto meno significativo, per questo non vengono attratti dal magnete. L'origine endoteliale delle cellule CD146 è poi confermata dalla positività di altri markers come UEA-1, vWF e CD31 e la presenza di corpi di Weibel-Palade (organelli citoplasmatici contenuti in cellule endoteliali vascolari e cardiache)<sup>202</sup>. Il processo è seguito dall'enumerazione manuale microscopica delle cellule marcate<sup>203</sup>. La variabilità nella forma e nella dimensione delle CECs aumenta il rischio di errore durante la metodica. La grandezza delle CECs varia da conglomerati di cellule multinucleate a microparticelle (EMPs). Solitamente le cellule hanno una dimensione di 10-70  $\mu\text{m}$ . Anche le piccole dimensioni delle EMPs (derivate dall'esocitosi di gemme formate da fosfolipidi e componenti citoplasmatiche) possono essere

problematiche perché confondibili con neutrofili, piastrine e frammenti cellulari che esprimono CD146. Per questo motivo le CECs sono state definite come cellule o particelle cellulari nucleate dalle dimensioni maggiori di 5  $\mu\text{m}$  e che si legano a più di 5 particelle immunomagnetiche rivestite da anticorpi anti-CD146 e positive per UEA-1<sup>190</sup>. La separazione con citometria a flusso consente invece di ricercare markers di superficie multipli per attestare l'origine endoteliale delle cellule e distinguerle da altre popolazioni (come linfociti e EPCs). La co-espressione di CD3 e CD45 differenzia i linfociti CD146 positivi dalle CECs, mentre le EPCs, a differenza delle CECs, esprimono il CD133. La metodica è in grado di distinguere se le cellule endoteliali sono necrotiche, apoptotiche o vitali e di valutare la presenza di markers funzionali come l'E-selectina, l'ICAM-1 e la VCAM-1<sup>202</sup>. Widemann et al. hanno descritto una metodica ibrida che unisce il meglio delle due tecniche combinando la selezione immunomagnetica delle cellule CD146 alla citometria a flusso<sup>204</sup>. Un numero elevato di CECs nel sangue rispecchia quindi la severità del danno endoteliale e la presenza di aree subendoteliali esposte che potrebbero causare l'attivazione piastrinica.

Riguardo invece alle EPCs, esse sono cellule rigeneratrici che si inseriscono sulla regione vascolare intimale danneggiata riparandola. Le EPCs sono delle cellule precursori, immature molto piccole (< 15  $\mu\text{m}$ ) contenute nel plasma, nel tessuto adiposo e nel midollo osseo. Vengono distinte dalle CECs in base alla dimensione e ai markers di stadio precoce come CD133<sup>198</sup>. La loro definizione rimane tuttora controversa perché anche i monociti possono esprimere temporaneamente i markers di superficie endoteliali e mimare il fenotipo delle EPCs. Le EPCs sono una rara popolazione cellulare dall'alta capacità replicativa in grado di dar vita a colonie clonali in 14 giorni su terreno di coltura. Anche se queste cellule *in vitro* si comportano come dei veri e propri progenitori non si è certi sul loro significato *in vivo* nella neoangiogenesi e nella riparazione endoteliale, vista la loro rarità<sup>205</sup>. Rispetto alle CECs che si correlano al danno endoteliale, queste cellule esprimono la capacità dell'organismo di riparare l'endotelio e, al contrario, la loro riduzione potrebbe contribuire alla disfunzione endoteliale. Il numero assoluto di EPCs, infatti, è ridotto in molte patologie come diabete, ipertensione, ipercolesterolemia, invecchiamento e patologie renali croniche. Stranamente le CECs sembrerebbero ridurre la funzione delle EPCs inibendone la proliferazione, la migrazione e l'espressione di eNOS<sup>198</sup>. Il processo in realtà è molto più complesso e dipende dalla patologia studiata. Nell'IMA, ad esempio è stato descritto l'aumento sia delle CECs sia delle EPCs. Nei pazienti con lesioni coronariche il trattamento con statine e l'attività fisica determinano l'aumento delle EPCs ma non la riduzione delle CECs. Altro aspetto ancora da comprendere è se CECs e EPCs siano due tipi cellulari diversi oppure se condividano un'origine comune: questo spiegherebbe il loro rapporto variabile e le difficoltà nella distinzione molecolare<sup>195</sup>.

### *Impiego del dosaggio delle CECs*

Anche se la misurazione delle CECs come parametro diagnostico e prognostico non è stata standardizzata e ha ancora molte sfide da superare, questo parametro presenta delle potenzialità non indifferenti. Il maggior vantaggio nel misurare biomarkers cellulari della funzione endoteliale è che forniscono informazioni dirette sullo stato dell'endotelio. Rispetto ai parametri surrogati biochimici che non sono endotelio-specifici, le CECs ma anche le EMPs e le EPCs hanno una specificità maggiore perché originano direttamente dall'endotelio. Esaminando questi tre biomarkers contemporaneamente è possibile verificare non solo lo stato di danno endoteliale (CECs e EMPs) ma anche lo stato di rigenerazione mediante le EPCs: questa combinazione di informazioni rispecchia lo stato dell'integrità endoteliale meglio di qualunque altro parametro<sup>198</sup>. Nell'uomo le CECs sono state riscontrate in diverse condizioni di danno vascolare come il danno meccanico (ad esempio prelievi arteriosi e venosi), drepanocitosi, rickettsiosi, infezione da CMV, shock settico, porpora trombotica trombocitopenica, sindromi coronariche acute e alcune vasculiti come la Bechet (e anche la KD, *vedi dopo*), insufficienza venosa cronica, aortite, ipertensione polmonare e cancro. L'endotelio svolge un ruolo essenziale nella diffusione delle cellule cancerose, nell'angiogenesi e nella metastatizzazione; l'aumento delle CECs è stato riscontrato nel cancro del polmone, nel carcinoma mammario e nei linfomi<sup>195</sup>. Le CECs sono state utilizzate anche come marker di danno endoteliale e potenziale rigetto nei trapianti di rene<sup>206</sup>. In questi casi, comunque l'isolamento delle CECs viene considerato evento raro con una concentrazione di 0-1500 cellule su mL di sangue (in condizioni normali i loro livelli non superano le 14 cellule per mL). La quantità di CECs nel sangue sembra variare, come accennato, in base all'entità del danno vascolare: una conta più alta è riscontrata nel danno diffuso da rickettsiosi e nella crisi acuta vaso-occlusiva nei drepanocitici; al contrario in vasculiti localizzate come quelle post-angioplastica coronarica percutanea (PCI) i valori di CECs superano di poco i valori normali. Le CECs tendono ad essere più alte nella fase acuta della malattia e a ridursi già a partire dalla fase subacuta in risposta al trattamento<sup>197</sup>. Quindi dal punto di vista prognostico il dosaggio delle CECs può essere utile per valutare lo stato di gravità della malattia poiché si riducono progressivamente con il miglioramento clinico e sono più elevati nei pazienti con malattia in progressione rispetto ai pazienti in cui la malattia si è stabilizzata<sup>195</sup>. Le CECs sono utili anche per valutare la risposta al trattamento. Si riducono rapidamente dopo la terapia con Ganciclovir e Foscarnet nelle infezioni da CMV, dopo i primi 9 giorni di antibiotico nelle infezioni da Rickettsia, dopo il trattamento con plasmaferesi e Vincristina nella porpora trombotica trombocitopenica, dopo Colchicina, Azatioprina, ormone adrenocorticotropo e Prednisone nella vasculite di Bechet<sup>197</sup>.

### *Il dosaggio delle CECs nella Malattia di Kawasaki*

Nella KD è stato descritto l'aumento delle CECs come risultato del danno endoteliale. Negli anni sono stati portati avanti diversi studi per confermare questa correlazione e valutare come il parametro si modifichi in base al decorso della malattia (con o senza CALs) alla risposta al trattamento (responder o non responder) e all'evoluzione nel tempo. Il primo a dimostrare l'aumento delle CECs nella KD è stato lo studio di Nakatani et al. del 2002<sup>64</sup>. Nel campione studiato, composto da 20 pazienti con KD e 10 controlli sani, le CECs venivano dosate con tecnica immunoistochimica. I risultati mostrano un aumento delle CECs nei bambini con KD in modo variabile in base alla fase della malattia e alla presenza di CALs, rispetto al controllo sano. Durante la fase acuta, bambini senza CALs hanno valori medi di CECs di 16/mL nella subacuta aumentano a 21/mL per poi ridursi nella convalescenza a 9/mL; in presenza di CALs questi valori aumentano ulteriormente a 23/mL nella fase acuta, 31/mL nella subacuta e 15/mL nella fase cronica rispetto a valori medi di circa 6/mL nel soggetto sano. L'incremento delle CECs durante la fase subacuta rispecchia il fatto che le CALs solitamente si formano in questa fase. Tutti i bambini sono stati trattati con IVIG prima del decimo giorno dall'esordio, quindi gli autori, giustamente, sottolineano che non è noto se le IVIG possano in qualche modo alterare la conta delle CECs. Altro dato importante analizzato nello studio è il numero delle EPCs. Viene evidenziato che solo una piccola parte delle CECs totali esprime i markers delle progenitrici. Questo suggerisce che oltre al danno endoteliale anche l'alterazione della funzionalità delle cellule progenitrici nella riparazione dell'endotelio possa avere un ruolo nella patogenesi della malattia<sup>64</sup>.

Da allora sono state portate avanti diverse ricerche per valutare sia il ruolo delle CECs sia delle EPCs nella KD. Nel 2004 lo studio di Yu et al. ha descritto il ruolo dell'ossido nitrico (NO) nella patogenesi delle lesioni endoteliali e la maggior espressione della NO-sintasi sia da parte delle cellule infiammatorie sia da parte delle cellule endoteliali circolanti<sup>207</sup>. Il numero di CECs, valutato con immunoistochimica, nella KD è più elevato rispetto ai controlli sani e continua ad aumentare anche dopo la somministrazione delle IVIG raggiungendo il picco a 2 settimane dall'esordio (circa 40/mL). Inoltre, le CECs sono molto più numerose nei pazienti con CALs sia a 2 che a 3 settimane dall'esordio. La maggior parte delle CECs esprime iNOS (quindi la forma inducibile) e non eNOS (forma endoteliale). Si ipotizza quindi che il danno endoteliale e la down-regulation di eNOS promuovano il rimodellamento aberrante e le alterazioni aneurismatiche della KD e che il numero di CECs sia direttamente correlato con l'entità del danno vascolare.

Altro studio che ha valutato la presenza di CECs nella KD sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo è stato portato avanti da Fu et al. nel 2010<sup>208</sup>. Attraverso la ricerca delle proteine S100A12 sulla superficie delle CECs, gli autori hanno dimostrato lo stretto rapporto fra

l'infiammazione e il danno endoteliale nella malattia. La proteina S100A12 è normalmente espressa da neutrofili, linfociti e monociti. La S100A12 extracellulare può attivare diversi segnali di trasduzione incluse fosfolipasi, proteina C chinasi, calmodulina chinasi 2 e MAP-K. Questa proteina è iperespressa nella KD e decresce progressivamente dopo il trattamento con IVIG<sup>209,210</sup>. Lo studio ha dimostrato che la S100A12 è espressa anche sulla superficie delle CECs valutando il rapporto CECs/cellule mononucleate (MNC) (in modo da escludere la quota espressa sulle cellule immunitarie mononucleate), il rapporto CECs-S100A12/CECs e l'intensità del segnale a fluorescenza della proteina sulle CECs (Fi-S100A12) con tecnica di citometria a flusso<sup>208</sup>. Il rapporto CECs/MNC è più alto nella fase acuta di KD e si riduce fino a livelli normali nelle fasi subacuta e cronica nei pazienti senza CALs in seguito all'infusione con IVIG; in pazienti con CALs invece rimane alto anche nella fase subacuta per poi ridursi in quella di convalescenza. Ciò suggerisce che il meccanismo di distacco delle cellule endoteliali aumenta nella fase acuta di malattia e si protrae per più tempo in presenza di lesioni coronariche. Il rapporto CECs-S100A12/CECs è aumentato nella KD indipendentemente dalla presenza di CALs. In assenza di lesioni si riduce lentamente nella fase subacuta e di convalescenza (rimanendo sempre più alto rispetto al controllo sano) mentre non decresce in presenza di CALs. In ultima analisi la Fi-S100A12-CECs è aumentata significativamente nella KD in fase acuta, si dimezza a partire dalla fase subacuta se non sono presenti CALs, oppure a partire dalla fase cronica in caso contrario. Il fatto che S-100A12 sia iperespressa sull'endotelio nella KD e correli con la severità di malattia suggerisce che abbia un ruolo nella patogenesi del danno coronarico. Infatti, se il CECs/MNC si riduce in seguito alla somministrazione di IVIG ciò non si verifica con Fi-S100A12. Le IVIG riescono a ridurre il numero di CECs agendo sull'infiammazione regolando i livelli di IL-6 e E-selectina<sup>211</sup> che attacca il vaso e ne determina il distacco. Le IVIG agiscono anche riducendo la S100A12 circolante, secreta dai neutrofili ma non riescono ad alterare la proteina legata alle cellule endoteliali<sup>208</sup>. L'espressione di S100A12 sulle CECs si correla anche all'attivazione del recettore della glicosilazione (RAGE) sulle stesse cellule. S100A12 è in grado di legare RAGE sulla superficie delle CECs e attivarlo così da aumentare la produzione di citochine infiammatorie (TNF e IL-1 $\beta$ ) da parte dei fagociti e di IL-2 da parte delle cellule mononucleate, che a loro volta stimolano i granulociti a secernere nuovo S100A12. L'espressione di RAGE è aumentata dalla presenza del suo ligando sulle CECs così da creare un circolo vizioso<sup>210</sup>.

Lo studio di Gong et al. ha dimostrato la maggior espressione di RAGE in pazienti con KD attraverso la valutazione del rapporto CECs-RAGE/CECs e i livelli di Fi-RAGE-CECS in modo parallelo a quello che Fu et al. avevano fatto con S100A12<sup>212</sup>. Il rapporto CECs-RAGE/CECs e il segnale FI-RAGE-CECs sono aumentati nei pazienti con KD. In presenza di CALs il rapporto

CECs-RAGE/CECs e la FI-RAGE-CECs sono maggiori nella fase subacuta e cronica rispetto a quella acuta e non si riducono nel tempo. Ciò suggerisce che l'infiammazione persiste più a lungo nei pazienti con lesioni coronariche. In pazienti non responder i livelli di FI-RAGE-CECs sono più bassi rispetto ai responder in fase acuta per poi aumentare progressivamente nella subacuta e nella convalescenza così come il CECs-RAGE/CECs. Ciò suggerisce che l'infiammazione è più severa nei pazienti che non rispondo al trattamento di prima linea con IVIG, che sono anche coloro a maggior rischio di CALs<sup>212</sup>.

Gli studi finora descritti hanno utilizzato il dosaggio delle CECs come parametro diagnostico di KD e prognostico di CALs durante le prime fasi di malattia. Un altro ambito della ricerca esplorato negli ultimi anni, riguarda la valutazione delle CECs per identificare la presenza o meno di danno endoteliale a lungo termine. Lo studio di Shah et al. ha posto come obiettivo la valutazione del danno endoteliale soprattutto nei pazienti senza CALs<sup>213</sup>. Se la prognosi per i pazienti con aneurismi giganti è nota, meno conosciuto è il destino dei pazienti che non hanno sviluppato CALs o che le hanno sviluppate con successiva regressione. Come descritto dallo studio di Daniels et al. molti pazienti con pregressa KD anche con dimensioni coronariche normali vanno incontro a sequele cardiovascolari, probabilmente perché la parete arteriosa rimane danneggiata, ispessita e calcifica<sup>14</sup>. Shah et al. dimostrano la persistenza di una vasculite cronica dopo anni dalla KD attraverso la ricerca ed il dosaggio delle CECs con metodica immunomagnetica rapportato a reperti ecocardiografici, elettrocardiografici e laboratoristici (profilo lipidico e markers di infiammazione: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, E-selectina, VCAM-e e ICAM-1). I pazienti con pregressa KD (almeno 12 mesi prima) hanno valori più alti di CECs rispetto al controllo, soprattutto se avevano sviluppato CALs, senza correlazione con le tempistiche del prelievo rispetto alla data d'esordio<sup>213</sup>. Anche altri markers di danno endoteliale VCAM-1, ICAM-1 e VEGF sono più alti nelle pregresse KD soprattutto se associate a CALs anche se altri fattori di rischio cardiovascolare risultano negativi. La permanenza della disfunzione endoteliale a lungo termine, dimostrata anche tramite altre metodiche, sottolinea la necessità di continuare la sorveglianza cardiologica in tutti i pazienti con pregressa KD<sup>213</sup>. Anche lo studio di Mostafavi et al. ha esaminato la possibile persistenza del danno endoteliale nelle KD indipendentemente dalla presenza di CALs attraverso il dosaggio delle CECs con citometria a flusso<sup>65</sup>. Sono stati arruolati 26 bambini, 13 dei quali con pregressa KD (da 4 a 9 anni prima) responder al trattamento standard. I pazienti presentano livelli di CECs maggiori rispetto al controllo sano (12/mL vs 2.38/mL). Questo suggerisce la persistenza di un lieve danno endoteliale anche anni dopo l'esordio della KD anche in pazienti che non hanno sviluppato CALs, esponendoli ad un maggior rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione sana<sup>65</sup>. Il dosaggio delle CECs potrebbe essere uno strumento utile per lo studio del danno

endoteliale nella KD per guidare diagnosi e valutazione del profilo di rischio a breve termine e a lungo termine. Affinché possa essere utilizzato è necessario che vengano standardizzati dei valori di riferimento in età pediatrica, in grado di distinguere il paziente con KD dal sano, e stratificare il rischio di sviluppare CALs e/o di essere non responder al trattamento standard.

#### *Il dosaggio delle CECs nell'infezione da SARS-CoV-2*

Nell'infezione da SARS-CoV-2 le possibili complicanze cardiovascolari come ictus, embolia polmonare, ipertensione e vasculite, suggeriscono un ruolo del danno endoteliale nella patogenesi della malattia. Lo studio di Guervilly et al. ha dimostrato la correlazione tra danno endoteliale e infezione da SARS-CoV-2 misurando la concentrazione delle CECs nei pazienti infetti<sup>155</sup>. Sono stati arruolati 99 pazienti con polmonite virale diagnosticata tramite esame radiologico e RT-PCR positiva per SARS-CoV-2 su tampone nasofaringeo, espettorato o lavaggio broncoalveolare (BAL). Le CECs, prelevate entro 48 ore dal ricovero dei pazienti, sono state analizzate con metodica di separazione immunomagnetica e microscopia a fluorescenza. Il 55% dei pazienti presentava livelli di CECs superiori a 20 cellule/mL. La conta delle CECs è risultata spiccatamente più elevata nei pazienti ricoverati in terapia intensiva (49 cellule/mL contro 18 cellule/mL) indipendentemente dalle comorbidità presentate, inversamente proporzionale al numero di piastrine e linfociti (i cui livelli ridotti sono considerati fattori prognostici negativi dell'infezione) e direttamente proporzionale alla durata della degenza ospedaliera<sup>155</sup>. I livelli di CECs sono anche stati correlati a quelli di VCAM- 1 e della chemochina Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), ma non ai livelli di E-selectina e IL-6. Secondo gli autori, questi risultati forniscono la prova *in vivo* che nelle forme più gravi di COVID-19 avviene un danno endoteliale marcato e diffuso. Il dosaggio delle CECs, quindi, potrebbe essere impiegato come biomarker specifico e non invasivo di danno endoteliale ed anomala risposta infiammatoria dell'ospite all'infezione da SARS-CoV-2<sup>155</sup>.

Uno studio simile è stato condotto in Italia da Nizzoli et al<sup>214</sup>. Gli autori hanno descritto l'aumento delle CECs nei pazienti COVID-19 positivi (> 30 cellule/mL) con citometria a flusso ed ha messo in evidenza la presenza di una finestra temporale entro i primi 5 giorni della malattia, in cui le CECs sono particolarmente elevate.

Mancuso et al. hanno invece analizzato oltre alla CECs anche i livelli delle EPCs attraverso metodica di citometria a flusso, durante l'infezione<sup>215</sup>. Il loro campione comprende 27 pazienti nella fase acuta dell'infezione e nella fase di convalescenza con tampone negativo da almeno 1 settimana. I dati raccolti hanno evidenziato che nei pazienti con presente o pregressa infezione da SARS-CoV-2 sia in forma lieve che in forma grave, i livelli di CECs non sono particolarmente

diversi rispetto al controllo sano, ma il rapporto cellule vitali/cellule apoptotiche è a vantaggio delle vitali. Le EPCs invece sia vitali che apoptotiche sono maggiori nel paziente con infezione in atto (severa o moderata). I meccanismi che conducono a questa perdita di equilibrio non sono ancora noti, ma gli autori ipotizzano che possano essere correlati al danno endoteliale e alla neoangiogenesi descritta da alcuni autori nei vasi polmonari durante l'infezione acuta da SARS-CoV-2<sup>188</sup>. Il danno dell'endotelio polmonare in primo luogo, ma anche negli altri organi nelle forme più severe, determinerebbe l'aumento delle CECs, mentre lo stimolo angiogenetico determinerebbe la mobilitazione delle EPCs dal midollo e dagli altri tessuti<sup>215</sup>. In ambito pediatrico l'infezione acuta da SARS-CoV-2 è spesso asintomatica ma può complicarsi, a circa 2-6 settimane dal contagio, con la MIS-C. Verificare la validità del dosaggio delle CECs nello studio del danno endoteliale nella MIS-C è uno degli obiettivi principali della presente tesi.



## RAZIONALE DELLO STUDIO

La KD e la MIS-C sono due patologie distinte, che sottendono, però, meccanismi patogenetici simili. Entrambe le patologie sono caratterizzate da un quadro di infiammazione multisistemica, caratterizzato da vasculite e conseguente disfunzione endoteliale, aumento della permeabilità capillare e danno d'organo. La KD è una vasculite necrotizzante dei vasi arteriosi di medio calibro che colpisce prevalentemente il circolo coronarico. L'infiammazione origina dall'endotelio della tonaca intima per poi diffondersi fino all'avventizia e causare il rimodellamento del vaso. La complicanza principale di questa patologia è la formazione di CALs di tipo ectasico o aneurismatico che possono più o meno regredire in seguito al trattamento o persistere in cronico, rendendo necessario un prolungato follow-up. La MIS-C è una vasculite di relativamente recente identificazione che si verifica circa 2-6 settimane dopo l'infezione o il contatto con il virus SARS-CoV-2. La patologia è conseguenziale all'aberrante attivazione del sistema immunitario fino alla tempesta citochinica responsabile del danno endoteliale con possibile shock vasoplegico (associato o meno a quello cardiogeno) e disfunzione multiorgano. Sebbene all'inizio questa condizione fosse stata assimilata alla KD (definita infatti inizialmente "malattia *KD-like*"), in un secondo momento sono state descritte differenze cliniche, laboratoristiche, strumentali e anche prognostiche fra le due patologie. Le principali complicanze della MIS-C sono a breve termine soprattutto nel mantenimento della volemia e nell'accumulo di liquidi nel terzo spazio. L'interessamento coronarico è meno presente rispetto alla KD, mentre la disfunzione della funzione ventricolare, il versamento pericardico, la valvulopatia e la miocardite sono invece più frequenti nella MIS-C, sebbene tendano a regredire rapidamente dopo il trattamento. Le cellule endoteliali fisiologicamente adese alla tonaca intima del vaso, in seguito al danno endoteliale, si distaccano ed entrano nel torrente circolatorio diventando CECs. La valutazione di queste cellule mediante metodica immunomagnetica o citometria a flusso è stata portata avanti in diverse condizioni patologiche associate a danno vascolare ed endotelite, come IMA, scompenso cardiaco, vasculopatia periferica, diabete, connettiviti, emoglobinopatie, trapianti, tumori e, più di recente, anche nell'infezione da SARS-CoV-2 nell'adulto. Nella popolazione pediatrica in cui i markers clinici e strumentali sono scarsi, il danno vascolare è molto difficile da studiare. Dato che le CECs sono state considerate un marker specifico e sensibile del danno endoteliale nell'adulto, nel presente studio si ipotizza la loro validità anche nella popolazione pediatrica. Obiettivo principale dello studio è, infatti, verificare la validità del dosaggio delle CECs tramite metodica immunomagnetica CELLSEARCH® come biomarker di danno endoteliale in un campione di pazienti con KD, in pazienti con MIS-C ed in pazienti con infezione acuta da SARS-CoV-2 (AC19). L'identificazione

precoce delle forme più severe di malattia è indispensabile sia nella KD sia nella MIS-C per guidare il trattamento ed il follow-up in modo personalizzato, volto a ridurre il rischio di sviluppare disfunzioni d'organo e la mortalità. Obiettivo secondario dello studio è valutare l'utilizzo delle CECs come potenziale marker di gravità di malattia per KD, MIS-C e AC19 in età pediatrica.

## **MATERIALI E METODI**

### **Pazienti**

Sono stati arruolati prospettivamente tutti i bambini con diagnosi di KD e MIS-C tra ottobre 2020 e giugno 2021 in 2 Unità Operative Pediatriche (IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna e Ospedale Ramazzini di Carpi) in Emilia-Romagna e tutti i bambini con diagnosi di infezione acuta da SARS-CoV-2 (AC19) ricoverati presso l'Unità Operativa di Pediatria d'Urgenza, Pronto Soccorso Pediatrico e Osservazione Breve Intensiva dell'IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna nello stesso intervallo di tempo. L'arruolamento è avvenuto prima della somministrazione della terapia. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico locale (Comitato Etico Area Vasta Emilia Centro-AVEC, Bologna, Italia; codici protocollo: N. 95/2021/Sper/AOUBo; N. EM44-2021\_340/2017/Oss/AOUBo). A ciascun tutore legale sono state fornite le informazioni riguardo a modalità, metodiche e fini dello studio attraverso colloquio e rilascio di documentazione esplicativa durante la raccolta del consenso informato.

Tutte le diagnosi di KD e i trattamenti specifici sono stati effettuati in conformità alle linee guida 2017 dell'AHA<sup>1</sup>.

Le diagnosi di MIS-C sono state effettuate secondo i criteri dell'OMS, comprese le caratteristiche cliniche, di laboratorio e microbiologiche, in pazienti con evidenza di pregressa infezione da SARS-CoV-2 (sierologia IgG positiva) o che erano un probabile contatto con casi confermati<sup>70</sup>.

Sia per la KD che per la MIS-C, l'esordio della malattia è stato definito come il primo giorno di febbre. L'intervallo di tempo tra l'esordio della malattia e il 10° giorno di febbre è stato definito "fase acuta", mentre quello tra l'11° e il 20° giorno dopo l'esordio della febbre è stato definito "fase subacuta". Considerando la responsività al trattamento con IVIG, i pazienti sono stati suddivisi responders e non responders. La non responsività alla terapia con IVIG è stata definita come la persistenza o la recrudescenza della febbre almeno 36 ore e meno di 7 giorni dopo il completamento della prima infusione di IVIG<sup>1</sup>. Il trattamento è stato considerato tardivo quando le IVIG sono state somministrate dopo il 10° giorno dall'esordio della febbre.

L'ecocardiografia è stata eseguita in tutti i bambini con diagnosi di KD e MIS-C in ciascun centro partecipante, alla diagnosi e in fase subacuta. Le CALs sono state classificate come ectasie e aneurismi in base ai valori di Z-score, come raccomandato dalle linee guida AHA sulla KD<sup>1</sup>. L'evoluzione delle CALs dallo stadio acuto a quello subacuto è stata registrata come variabile binaria, con due possibilità: persistenza o regressione. Sono stati registrati anche gli eventi cardiaci

non coronarici, che comprendevano: miocardite con disfunzione di grado variabile del ventricolo di sinistra, pericardite (con o meno versamento pericardico) e valvulopatie, tutte di recente insorgenza.

L'AC19 è stato diagnosticato nei pazienti che sono risultati positivi al virus SARS-CoV-2 mediante RT-PCR in campioni di tampone nasofaringeo e che hanno riferito sintomi compatibili con l'infezione. L'esordio della malattia è stato definito come il giorno in cui si è verificato il primo sintomo o segno.

È stato creato un database prospettico e successivamente rivisto retrospettivamente, in cui sono stati registrati i seguenti parametri: caratteristiche demografiche; manifestazioni cliniche (sintomi respiratori, iperemia congiuntivale, alterazioni delle estremità, rash cutaneo, alterazioni delle labbra e della mucosa orale, linfadenopatia laterocervicale, coinvolgimento addominale, ipotensione sistemica/shock); data della diagnosi; durata della degenza ospedaliera; terapia somministrata; tempo e risposta al trattamento (IVIG-responders, IVIG-non responders, trattamento ritardato); necessità di terapia con inotropi e/o di supporto respiratorio; esami di laboratorio (globuli bianchi [GB]; percentuale di neutrofili [N%], linfociti [L%] ed eosinofili [E%] e relativi valori assoluti; rapporto neutrofili-linfociti [NLR]; globuli rossi [GR]; emoglobina [Hb]; PLT; PCR; albumina sierica; alanina aminotransferasi [ALT]; sodio [Na], albumina, troponina, BNP; IL-10; ferritina). I dati di laboratorio dei pazienti con KD e MIS-C sono stati raccolti anche durante la fase subacuta. Gli esami di laboratorio sono stati raccolti in occasione di un prelievo ematico eseguito secondo il rispetto della normale pratica clinica.

Il coinvolgimento addominale è stato definito come presenza di vomito e/o diarrea e/o dolore addominale. I sintomi respiratori considerati sono stati: tosse, rinite, apnea, tachipnea, difficoltà respiratoria di qualsiasi gravità. L'ipotensione è stata definita come una pressione arteriosa sistolica inferiore al 5° percentile della norma per l'età<sup>216</sup>.

La malattia grave è stata definita in base a diversi parametri: risposta alla terapia con IVIG, presenza di CALs, presenza di eventi cardiaci non coronarici, giorni totali di ospedalizzazione, utilizzo di farmaci biologici, necessità di terapia inotropica e necessità di supporto respiratorio.

### **Sistema CELLSEARCH®**

La conta delle CECs è stata eseguita mediante il Circulating Endothelial Cell Kit in combinazione con il sistema CELLSEARCH® (Menarini Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Bologna, Italia), che consente di standardizzare l'intera procedura di selezione cellulare, marcatura con anticorpi monoclonali, analisi ed enumerazione delle CECs<sup>217</sup>.

Il dosaggio delle CECs è stato effettuato su campione di sangue venoso prelevato in concomitanza di esami routinari ed il campione è stato raccolto in provette CellSave Preservative Tube, sottovuoto, contenenti EDTA ed un conservante di cellule endoteliali. Il campione è stato agitato manualmente per 8 volte dopo il prelievo e processato entro 72 ore. Le CECs sono state analizzate attraverso il kit CELLSEARCH®, metodica di separazione immunomagnetica associata a microscopia a fluorescenza per il target CD146. Il kit prodotto dall'azienda Menarini è composto da CELLTRACKS® AUTOPREP® per la preparazione del campione e CELLTRACKS ANALYZER II® per l'enumerazione e l'identificazione delle sottopopolazioni CD 146+. La strumentazione utilizza reagenti a base ferro-fluida e immunofluorescenti. Il reagente ferro-fluido è determinato da microparticelle composte da una porzione centrale magnetica circondata da uno strato polimerico di anticorpi anti CD146, antigene delle CECs. Dopo la processazione immunomagnetica il campione è sottoposto ad immuofluorescenza i cui reagenti identificano diversi target: CD105-PE, CD45-APC e DAPI (antigene nucleare). In particolar modo il CD105-PE è un antigene specifico delle cellule endoteliali mentre il CD45 è espresso dai leucociti e serve per distinguere le cellule CD146+ che non hanno origine endoteliale come i monociti attivati, le cellule stromali e i linfociti pre-B.

Vengono inseriti all'interno di una provetta CELLSEARCH® Conical Centrifuge Tube 4,0 mL di sangue prelevato e 10.0 mL di Buffer diluitivo. Il campione è stato centrifugato a 800xg per 10 minuti per separare il plasma dalla parte corpuscolata ed analizzato entro 1 ora con la strumentazione CELLTRACKS® AUTOPREP®. Lo strumento dispone le cellule su una cartuccia magnetica all'interno del MAGNEST® Cartridge Holder, il campo magnetico causa il movimento delle cellule CD146+ sulla superficie. Successivamente il campione è inserito nel CELLTRACKS® ANALYZER II® e viene lasciato ad incubare al buio per almeno 20 minuti fino ad un massimo di 24 ore. Lo strumento fa una scansione automatica dell'intera superficie della cartuccia, acquisisce l'immagine e identifica le cellule in cui sia CD105 sia DAPI sono espressi. Le immagini sono poi visualizzate dall'operatore che verifica morfologia e fenotipo delle cellule. La definizione di CECs è determinata dalle caratteristiche morfologiche e dal fenotipo CD146+, CD105-PE+, DAPI+ e CD45-APC-.

I risultati sono espressi come numero di CECs per millilitro di sangue periferico. Occasionalmente, è stata osservata una colorazione citoplasmatica CD105 continua associata a due o più nuclei. Le CECs sono state enumerate durante la fase acuta (prima del trattamento standard) in tutti i sottogruppi e durante la fase subacuta nei bambini con KD e MIS-C. Il *cut-off* di normalità per il numero di CECs/ml è stato fissato a 14/ml, valore riportato in letteratura per gli adulti sani con il

sistema CELLSEARCH®, vista la mancanza di valori di normalità per i pazienti in età pediatrica con questa metodica<sup>218-220</sup>. La metodica CELLSEARCH® non permette di distinguere tra cellule vitali e apoptotiche e tra CECs e EPCs.

### **Analisi statistica**

Il test di normalità utilizzato per studiare la distribuzione delle variabili continue è stato il test di normalità di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili continue sono presentate come media  $\pm$  deviazione standard (SD) o mediana e intervallo interquartile (IQR), a seconda dei casi. Le variabili continue normalmente distribuite sono state confrontate utilizzando il t-test o l'ANOVA; i dati non parametrici sono stati confrontati utilizzando il test U di Mann-Whitney o il test Kruskal-Wallis. Per le variabili categoriche, la percentuale di pazienti in ciascuna categoria è stata calcolata e confrontata con il test Chi-quadro o il test esatto di Fisher, a seconda dei casi. Per testare la significatività statistica per l'analisi sono stati utilizzati il test dei segni per ranghi di Wilcoxon e il test di Friedman. Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $p < 0.05$ . L'analisi per questo studio è stata eseguita con il software SPSS Statistics (versione 25; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RISULTATI

### Pazienti

Sono stati arruolati in totale 39 pazienti, di cui 9 KD, 20 MIS-C e 10 AC19. I dati demografici e clinici sono riportati nella **Tabella 6**.

	<b>KD (n=9)</b>	<b>MIS-C (n=20)</b>	<b>AC (n=10)</b>	<b>p</b>	
Etnia, n (%)	Caucasica	8 (88.9%)	18 (90%)	8 (80%)	<i>n.s.</i>
	Asiatica	1 (11.1%)	0 (0%)	2 (20%)	<i>n.s.</i>
	Nera	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	<i>n.s.</i>
Sesso, n (%)	Maschile	3 (33.3%)	11 (55%)	5 (50%)	<i>n.s.</i>
	Femminile	6 (66.7%)	9 (45%)	5 (50%)	<i>n.s.</i>
Età in mesi, mediana (IQR)	22 (7.4-29)§	95 (69.8-115.6)§	26.5 (10.5-157.8)	<b>&lt; 0.001</b>	
Sintomi respiratori, n (%)	1 (11.1%)	6 (30%)	5 (50%)	<i>n.s.</i>	
Iperemia congiuntivale, n (%)	9 (100%)§*	12 (60%)§°	1 (10%)*°	<b>&lt; 0.001</b>	
Alterazioni delle estremità, n (%)	5 (55.6%)	6 (30%)	1 (10%)	<i>n.s.</i>	
Rash cutaneo, n (%)	9 (100%)§*	11 (55%)§°	1 (10%)*°	<b>&lt; 0.001</b>	
Alterazioni delle labbra e della mucosa orale, n (%)	6 (66.7%)	12 (60%)	3 (30%)	<i>n.s.</i>	
Linfadenopatia laterocervicale, n (%)	7 (77.8%)§*	3 (15%)§	2 (20%)*	<b>0.002</b>	
Coinvolgimento addominale, n (%)	6 (66.7%)	17 (85.0%)°	2 (20%)°	<b>0.002</b>	
Ipotensione, n (%)	0§	11 (55%)§°	0§°	<b>0.001</b>	
Durata totale della febbre, mediana (IQR)	9.0 (5.5-13.0)	6.0 (4.0-9.0)	-	<i>n.s.</i>	

Giorni di ospedalizzazione, mediana (IQR)	8.0 (6.5-15.0)	10.0 (8.0-13.0)	0 (0.0-0.75)	<i>n.s.</i>
Giorno di trattamento con IVIG, mediana (IQR)	8.5 (5.3-9.0)§	5.0 (4.0-6.0)§	-	<b>0.006</b>
Non-responders, n (%)	2 (33.3%)	5 (25%)	-	<i>n.s.</i>
Necessità di terapia con inotropi, n (%)	1 (11.1%)§	11 (55%)§°	1 (10%)°	<b>0.017</b>
Necessità di supporto respiratorio, n (%)	0	5 (25%)	1 (10%)	<i>n.s.</i>

Legenda: § indica una differenza statisticamente significativa tra KD e MIS-C; \* indica una differenza statisticamente significativa tra KD and AC; ° indica una differenza statisticamente significativa tra MIS-C and AC; IQR indica il range interquartile.

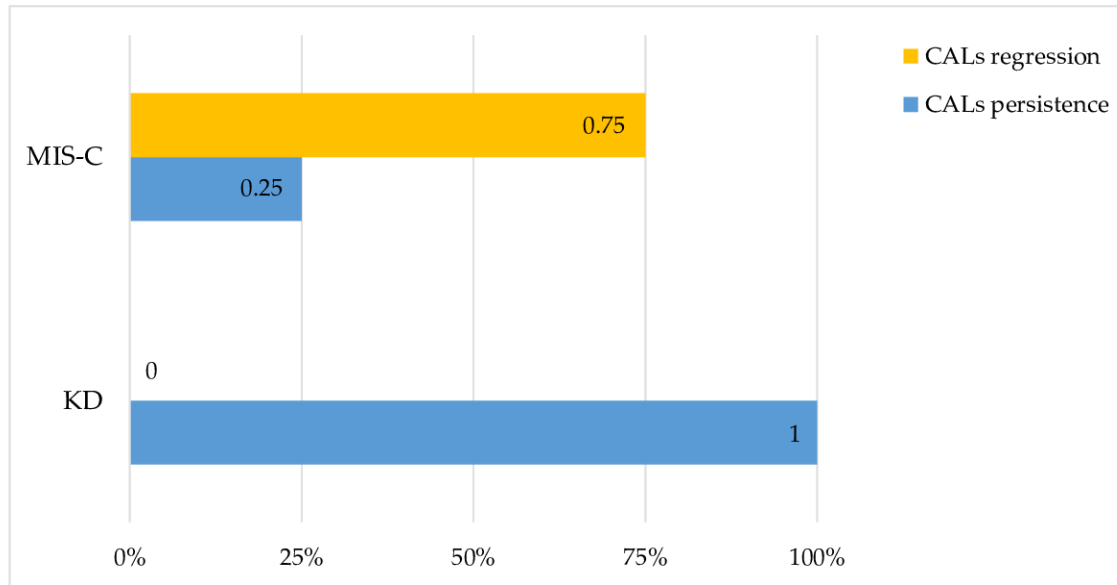
**Tabella 6. Caratteristiche cliniche e demografiche dei tre gruppi di pazienti (KD, MIS-C e AC19).**

Durante la fase acuta, sono state rilevate CALs solo in 1/9 (11.1%) dei pazienti con KD e in 8/20 (40%) dei pazienti con MIS-C, metà dei quali erano aneurismi. Le CALs nei pazienti con MIS-C hanno mostrato una tendenza maggiore a regredire rispetto ai pazienti con KD (Tabella 7, Figura 11).

	KD (n=9)	MIS-C (n=20)	p
<b>Fase acuta</b>			
CALs, n (%)	1 (11.1%)	8 (40%)	<i>n.s.</i>
Aneurismi, n (%)	1 (100%)	4 (50%)	<i>n.s.</i>
Eventi cardiaci non coronarici, n (%)	2 (22.2%)	15 (75%)	<b>0.030</b>
<b>Fase subacuta</b>			
CALs, n (%)	2 (22.2%)	1 (5%)	<i>n.s.</i>
Aneurismi, n (%)	2 (100%)	1 (100%)	<i>n.s.</i>
Eventi cardiaci non coronarici, n (%)	0 (0%)	3 (15%)	<i>n.s.</i>

**Tabella 7. Coinvolgimento coronarico in fase acuta e subacuta nei pazienti con diagnosi di KD e MIS-C.**





**Figura 11. Evoluzione dei CALs dalla fase acuta alla fase subacuta nei pazienti con MIS-C e KD.**

Tutti i pazienti con KD sono stati trattati con IVIG e tutti i pazienti con MIS-C hanno ricevuto steroidi per via sistemica in aggiunta alle IVIG (**Tabella 8**). Solamente 2 pazienti con AC19 hanno ricevuto terapia sistemica con lo steroide. Le terapie steroidea, eparinica e inotropica sono state eseguite con maggior frequenza nei pazienti con MIS-C. Inoltre, due pazienti con KD, non-responders, hanno ricevuto una terapia steroidea aggiuntiva. A due pazienti KD e a due pazienti MIS-C è stato somministrato Anakinra e a un paziente MIS-C è stato somministrato Infliximab quando questi pazienti non hanno risposto ai trattamenti standard.

	<b>KD (n=9)</b>	<b>MIS-C (n=20)</b>	<b>AC19 (n=10)</b>	<b>p</b>
Terapia con IVIG, n (%)	9/9 (100%)§	20/20 (100%)	0	-
Terapia con steroidi, n (%)	2/9 (22.2%)§	20/20 (100%)§°	2/10 (20%)°	<b>&lt;0.001</b>
Terapia con eparina, n (%)	2/9 (22.2%)§	18/20 (90%)§	0	<b>&lt;0.001</b>
Terapia con amine, n (%)	1/9 (11.1%)§	11/20 (55%)§°	1 (10%)°	<b>0.017</b>
Terapia con farmaci biologici, n (%)	2/9 (22.2%)	3/10 (15%)	0	<i>n.s.</i>

*Legenda: § indica una differenza statisticamente significativa tra KD e MIS-C; \* indica una differenza statisticamente significativa tra KD and AC; ° indica una differenza statisticamente significativa tra MIS-C and AC.*

**Tabella 8. Terapie sistemiche eseguite nei pazienti con KD, MIS-C e AC19.**

I valori di laboratorio durante le fasi acuta e subacuta sono riportati nella **Tabella 9**.

**a) Fase acuta**

	<b>KD (n=9)</b>	<b>MIS-C (n=20)</b>	<b>AC19 (n=10)</b>	<b>p</b>
Hb g/dl, mediana (IQR)	11.8 (10.8-12.0)	10.8 (10.0-12.0)	12.3 (11.2-12.5)	<i>n.s.</i>
GR x10 <sup>12</sup> /L, mediana (IQR)	4.2 (4.0-4.8)	4.0 (3.7-4.5)	4.5 (3.9-4.8)	<i>n.s.</i>
PLT x10 <sup>9</sup> /L, mediana (IQR)	338 (325-397)§	151 (124-263)§	312 (244-334)	<b>0.003</b>
GB x10 <sup>9</sup> /L, mediana (IQR)	14.4 (11.3-16.7)*	9.0 (6.3-13.1)	8.1 (5.5-11.3)*	<b>0.026</b>
N%, mediana (IQR)	71.4 (68.9-79.6)	78.2 (73.7-86.5)°	44.1 (24.5-59.2)°	<b>&lt;0.001</b>
L%, mediana (IQR)	18.9 (11.5- 22.9)	13.1 (9.6-20.5)°	41.1 (30.1-63.8)°	<b>&lt;0.001</b>
NLR, mediana (IQR)	4.1 (3.1-7.0)	6.0 (3.6-8.9)°	1.1 (0.4-2.3)°	<b>&lt;0.001</b>
E%, mediana (IQR)	0.7 (0.4-2.6)	0.2 (0.1-1.6)	2.1 (0.6-2.5)	<i>n.s.</i>
PCR mg/dl, mediana (IQR)	10.7 (5.1-17.1)	17.6 (11.6-22.0)°	0.5 (0.1-3.7)°	<b>&lt;0.001</b>
PCT, ng/ml, mediana (IQR)	0.8 (0.3-3.5)§	13.9 (3.3-39.5)§	0.8 (0.8-0.8)	<b>0.047</b>
Albumina g/dL, mediana (IQR)	3.4 (3.0-3.8)§	3.2 (3.0-3.8)§°	4.6 (4.1-4.8)°	<b>0.002</b>
Na mmol/L, mediana (IQR)	135 (133-138)	134 (131-136)°	138 (136-143)°	<b>0.005</b>
ALT IU/L, mediana (IQR)	23 (14-177)	27 (18-85)	16 (14-29)	<i>n.s.</i>
BNP pg/ml, mediana (IQR)	139 (91-202)	450 (57-1090)	-	<i>n.s.</i>
IL-10 pg/ml, mediana (IQR)	5.5 (2.3-9.0)	8.0 (2.8-34.5)	-	<i>n.s.</i>
Ferritina ng/ml, mediana (IQR)	128.0 (101.0-195.0)	377.5 (170.5-614.0)°	25.0 (19.0-112.0)°	<b>0.003</b>

**b) Fase subacuta**

	<b>KD (n=9)</b>	<b>MIS-C (n=20)</b>	<b>p</b>
Hb g/dl, mediana (IQR)	10.7 (9.5-12.2)	11.1 (10.1-11.8)	<i>n.s.</i>
GR x10 <sup>12</sup> /L, mediana (IQR)	3.9 (3.6-4.5)	4.1 (3.6-4.3)	<i>n.s.</i>
PLT x10 <sup>9</sup> /L, mediana (IQR)	695 (459-823)	391 (268-571)	<b>0.018</b>
GB x10 <sup>9</sup> /L, mediana (IQR)	13.3 (9.6-15.5)	12.7 (9.7-16.0)	<i>n.s.</i>
N%, mediana (IQR)	46.0 (28.4-55.6)	71.5 (53.3-76.3)	<b>0.012</b>
L%, mediana (IQR)	46.3 (32.6-60.5)	24.4 (19.1-35.9)	<b>0.001</b>
NLR, mediana (IQR)	1.0 (0.5-1.9)	2.9 (1.5-4.1)	<b>0.004</b>
E%, mediana (IQR)	1.9 (0.7-5.5)	0.2 (0.1-0.9)	<b>0.021</b>
PCR mg/dl, mediana (IQR)	1.0 (0.5-6.9)	1.4 (0.8-1.9)	<i>n.s.</i>
PCT, ng/ml, mediana (IQR)	4.1 (0.2-4-1)	0.8 (0.3-3.8)	<i>n.s.</i>
Albumina g/dL, mediana (IQR)	3.6 (3.2-3.8)	3.7 (3.3-4.2)	<i>n.s.</i>
Na mmol/L, mediana (IQR)	138 (137-141)	139 (136-140)	<i>n.s.</i>
ALT IU/L, mediana (IQR)	25 (16-44)	37 (22-60)	<i>n.s.</i>
BNP pg/ml, mediana (IQR)	24 (14-39)	81 (38-140)	<b>0.042</b>

*Legenda: § indica una differenza statisticamente significativa tra KD e MIS-C; \* indica una differenza statisticamente significativa tra KD and AC; ° indica una differenza statisticamente significativa tra MIS-C and AC; IQR indica il range interquartile.*

**Tabella 9. Esami di laboratorio della fase acuta (9a) e della fase subacuta (9b) dei pazienti con KD, MIS-C e AC19.**

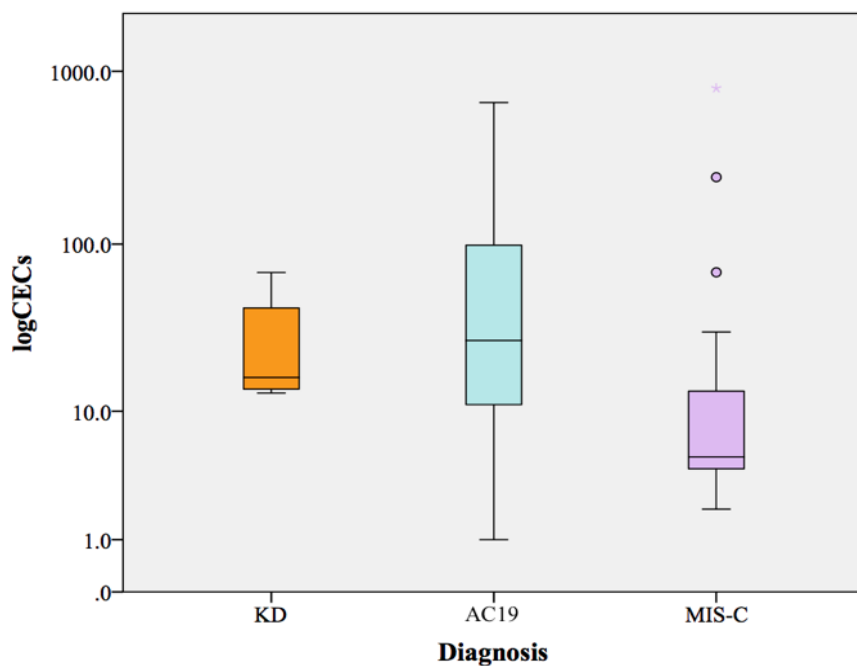
### Conta delle CECs in fase acuta e subacuta

La conta mediana (IQR) delle CECs/mL in fase acuta nei pazienti con KD è stata di 16.3 (13.6-48.8)/ml rispetto a 5 (4-15.5)/ml e 27.1 (9.3-101.7)/ml nei pazienti con MIS-C e AC19, rispettivamente (**Tabella 10, Figura 12**). In 3 pazienti KD e in 1 paziente MIS-C non è stato possibile valutare le CECs durante la fase acuta.

	KD (n=9)	MIS-C (n=20)	AC19 (n=10)	p
<b>Fase acuta</b>				
CECs - num/ml, mediana (IQR)	16.3 (13.6-48.8) <sup>§</sup>	5 (4-15.5) <sup>§</sup>	27.1 (9.3-101.7)	<b>0.042</b>
CECs>vn, n (%)	6/6 (100%) <sup>§</sup>	5/19 (26.3%) <sup>§°</sup>	7/10 (70%) <sup>°</sup>	<b>0.003</b>
Sincizi - num/ml, mediana (IQR)	2 (0-4.3)	0 (0-0)	0 (0-2)	<i>n.s.</i>
<b>Fase subacuta</b>				
CECs - num/ml, mediana (IQR)	45.8 (18.5-131.0)	3.6 (1.8- 21.6)	-	<b>0.01</b>
CECs>vn, n (%)	7/9 (77.8%)	6/18 (30%)	-	<b>0.046</b>
Sincizi - num/ml, mediana (IQR)	0 (0-4.5)	0 (0-0)	-	<i>n.s.</i>

Legenda: § indica una differenza statisticamente significativa tra KD e MIS-C; \* indica una differenza statisticamente significativa tra KD and AC; ° indica una differenza statisticamente significativa tra MIS-C and AC; IQR indica il range interquartile.

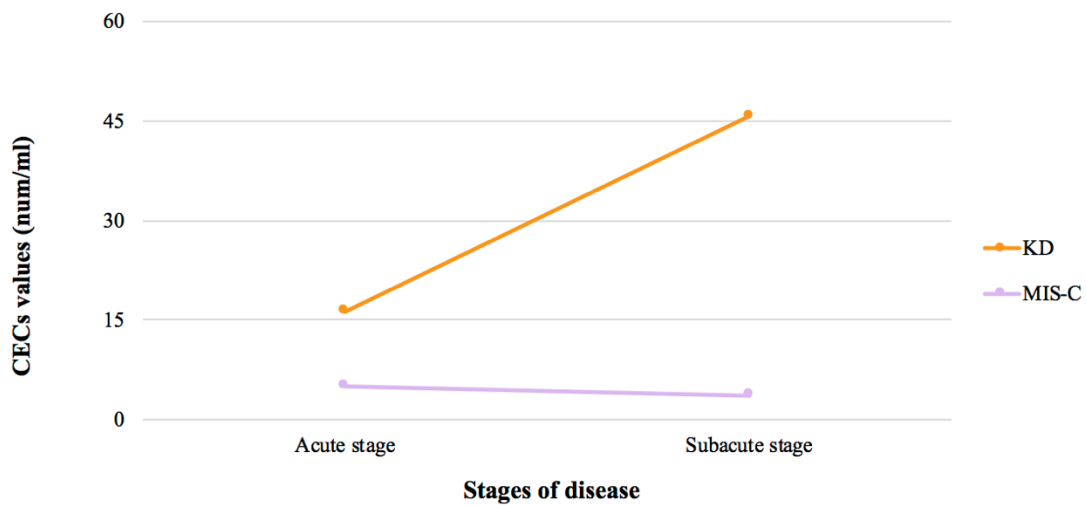
**Tabella 10. CECs durante la fase acuta e subacuta di KD, MIS-C e AC19.**



**Figura 12. Boxplot che raffigura i valori mediani (IQR) delle CECs in fase acuta nei pazienti con KD, MIS-C e AC19.**

I pazienti con AC19 hanno mostrato un numero mediano di CECs più elevato rispetto alla MIS-C e alla KD, senza raggiungere una differenza statisticamente significativa a causa dell'elevata variabilità dei valori (da 1 a 660 CECs/mL). Nella fase acuta i valori mediани di CECs erano più elevati nei pazienti con KD rispetto ai pazienti con MIS-C ( $p=0.042$ ). I pazienti con MIS-C presentavano valori mediани di CECs in fase acuta compresi nell'intervallo di normalità (1-14 num/ml), mentre i valori erano più elevati rispetto al *cut-off* di normalità sia nei pazienti con KD sia nei pazienti con AC19.

Durante la fase subacuta, è stato osservato un aumento significativo dei valori CECs nei pazienti con KD, nonostante la differenza tra i 2 stadi non fosse statisticamente significativa ( $p=0.11$ ). Al contrario, è stata rilevata una lieve riduzione delle CECs nei pazienti con MIS-C dallo stadio acuto a quello subacuto. Questo diverso andamento dei valori delle CECs tra i 2 stadi della malattia è mostrato nella **Figura 13**. Nella fase subacuta, i livelli CECs della KD erano significativamente più alti di quelli dei pazienti con MIS-C ( $p=0.01$ ) (**Tabella 10**).



**Figura 13. Variazione della conta delle CECs dalla fase acuta alla fase subacuta nei pazienti con KD e con MIS-C.**

L'età è risultata inversamente correlata ai valori CECs considerando l'intero campione di pazienti ( $p=0.011$ ). Questo risultato è stato confermato nei pazienti con KD ( $p=0.042$ ) ed è stata riscontrata una tendenza simile nei pazienti con AC19 ( $p=0.052$ ). Nello specifico, nel sottogruppo di pazienti con AC19 sono stati riscontrati valori significativamente più elevati di CECs nei pazienti di età inferiore a 6 mesi ( $p=0.042$ ).

Abbiamo osservato, in diversi campioni, alcune CECs con una colorazione citoplasmatica continua associata a due o più nuclei. Questo tipo di aberrazione cellulare è stata precedentemente descritta con la metodica CELLSEARCH® nell'IMA<sup>195</sup>. Poiché i confini cellula-cellula non sono chiaramente distinguibili nelle immagini in fluorescenza, non è possibile determinare rigorosamente se si tratta di cluster cellulari o, in alternativa, di singole cellule multinucleari (sincizi). Questi cluster cellulari/sincizi sono stati rilevati in 3/6 (50%) pazienti con KD, 3/10 (30%) pazienti con AC19 e 3/18 (1.7%) pazienti con MIS-C durante la fase acuta. Come previsto, è stata trovata una correlazione positiva tra le CECs e il numero di sincizi nell'intero campione durante la fase acuta e subacuta ( $p=0.006$  e  $p=0.001$ , rispettivamente), e nella coorte KD + MIS-C ( $p < 0.001$ ).

### **Conteggio delle CECs e dati clinico-laboratoristici e di terapia**

Considerando il campione nella totalità sono state riscontrate alcune correlazioni significative tra CECs in fase acuta ed esami di laboratorio. Nello specifico è stata riscontrata una correlazione inversa tra CECs e ferritina ( $p=0.047$ ) e una correlazione diretta tra CECs e sodio ( $p=0.016$ ), verosimilmente legate alle differenze già evidenziate di questi parametri laboratoristici tra i tre gruppi. Nello specifico, i pazienti con MIS-C, che sono anche coloro con valori di CECs inferiori, presentano una spiccata iperferritinemia e iposodiemia, che spiegherebbero la correlazione tra CECs e i parametri suddetti.

Considerando i singoli gruppi, nei pazienti con KD e AC19, non sono state individuate correlazioni statisticamente significative tra i valori di CECs e i parametri di laboratorio. Nei pazienti con AC19, invece, è stata riscontrata una correlazione inversa tra i valori di CECs e i valori dei neutrofili (N% e N in valore assoluto, rispettivamente con  $p=0.010$  e  $p=0.016$ ). Tale significatività si rispecchia anche nella correlazione tra CECs e NLR ( $p=0.010$ ). Considerando il gruppo MIS-C, invece, è stata trovata una correlazione positiva tra le CECs e il valore di N% ( $p=0.043$ ) e di IL-10 ( $p=0.014$ ).

Riguardo invece alla clinica, non sono state rilevate correlazioni significative tra i sintomi e segni clinici e il valore di CECs. Prendendo in considerazione solamente i gruppi KD e MIS-C, è stata osservata una correlazione diretta tra le CECs e le manifestazioni cutanee ( $p=0.027$ ) e inversa con i sintomi respiratori ( $p=0.030$ ). Anche questo dato, come per gli esami di laboratorio, può essere correlato alla maggiore frequenza di manifestazioni cutanee nei pazienti con KD, e alla maggiore frequenza di sintomi respiratori nei pazienti con MIS-C (sebbene quest'ultima differenza non sia risultata statisticamente significativa).

Infine, relativamente alla correlazione con le terapie, sono state riscontrate correlazioni inverse tra i valori di CECs e il trattamento steroideo, quello eparinico e quello inotropo ( $p=0.001$ ,  $p=0.025$ ,

$p=0.15$ , rispettivamente), anche in questo caso verosimilmente legate alla maggiore probabilità dei pazienti con MIS-C di ricevere tali terapie, visto che la correlazione non si conferma nei singoli sottogruppi di pazienti.

Nella fase subacuta, invece, la conta delle CECs è risultata correlata al valore assoluto di eosinofili ( $p=0.014$ ) nel campione in toto, confermata poi nel sottogruppo di pazienti con KD ( $p=0.010$ ).

Nel campione in toto, inoltre, i valori di CECs in fase subacuta sono significativamente inferiori nei pazienti trattati con steroidi ( $p=0.026$ ) ed eparina ( $p=0.031$ ), sebbene questo risultato non sia confermato nei singoli campioni.

### **Conteggio delle CECs e gravità della malattia**

Nel campione in toto, non è stata riscontrata alcuna correlazione tra le CECs e la presenza di CALs, quindi dilatazioni e aneurismi, durante le fasi acuta e subacuta di malattia. Tale risultato si conferma nei pazienti con MIS-C. Nel gruppo KD, invece, l'incidenza di eventi coronarici è stata troppo bassa per riuscire ad indagare questa correlazione.

La persistenza dei CALs nella fase subacuta era più probabile che si verificasse negli IVIG non-responder ( $p=0.012$ ), nei pazienti che hanno necessitato di farmaci biologici ( $p=0.02$ ) e che avevano una febbre di durata maggiore ( $p=0.014$ ).

Gli eventi cardiaci non coronarici erano correlati positivamente con PCR ( $p=0.014$ ), troponina ( $p=0.023$ ), BNP ( $p=0.019$ ) e N% ( $p=0.04$ ), ma non con i valori di CECs.

Non è stata inoltre riscontrata alcuna correlazione tra CECs e risposta alla terapia con IVIG, utilizzo di farmaci biologici, giorni totali di ospedalizzazione, necessità di terapia inotropica e necessità di supporto respiratorio.



## DISCUSSIONE

La KD e la MIS-C sono due patologie distinte che sottendono meccanismi patogenetici simili. Entrambe le patologie sono caratterizzate da un quadro di infiammazione multisistemica con vasculite e conseguente disfunzione endoteliale, aumento della permeabilità capillare e danno d'organo. Anche l'infezione acuta da SARS-CoV-2 nel paziente adulto ha dimostrato avvalersi di un meccanismo simile nelle forme più severe clinicamente associate ad ARDS e disfunzione multiorgano. Nonostante nel bambino la clinica associata all'AC19 sia meno severa o paucisintomatica, i meccanismi di danno endoteliale sembrano parzialmente condivisi con la KD e la MIS-C.

Questo è il primo studio in letteratura che utilizza l'enumerazione delle CECs per valutare il danno endoteliale in fase acuta e subacuta nei pazienti pediatrici con KD, MIS-C e AC19, mediante la procedura standardizzata del sistema CELLSEARCH®.

I risultati dello studio mostrano una differenza statisticamente significativa nella conta delle CECs nella fase acuta di malattia. Nello specifico, nella KD sono stati riscontrati valori più elevati rispetto alla MIS-C, mentre i soggetti con AC19 presentano valori mediamente elevati ma estremamente variabili da paziente a paziente, con un range molto ampio. La differenza tra KD e MIS-C si accentua in fase subacuta di malattia, dopo il trattamento, in cui i valori di CECs subiscono un sostanziale aumento nella KD e una lieve riduzione nella MIS-C.

Questi risultati suggeriscono una profonda differenza nella patogenesi del danno endoteliale tra la KD e la MIS-C, anche se le possibili complicanze vascolari che possono verificarsi nelle due malattie sono simili, nello specifico dilatazioni e aneurismi.

I nostri risultati nella KD sono in linea con quanto dimostrato da Nakatani et al. e Mostafavi et al. anche se con metodiche diverse (immunoistochimica e citometria a flusso)<sup>64,65</sup>. In particolar modo Nakatani et al. hanno riscontrato elevati valori di CECs che incrementano dalla fase acuta a quella subacuta<sup>64</sup>. Gli stessi autori documentano anche valori più elevati di CECs nei pazienti che sviluppano lesioni ectasiche o aneurismatiche a carico delle coronarie. Sebbene nel nostro studio non siano state riscontrate differenze statisticamente significative tra i pazienti con e senza CALs, verosimilmente a causa della bassa incidenza di CALs nel gruppo con KD, anche nel nostro studio si è evidenziato un progressivo incremento dei livelli di CECs dalla fase acuta a quella subacuta. Tale risultato potrebbe correlarsi al maggior rimaneggiamento della tonaca vascolare che si verifica dopo i primi 10 giorni dall'esordio, insieme all'aumento della conta piastrinica e alla formazione delle lesioni coronariche, che è stata dimostrata essere prominente durante la fase subacuta.

È già noto che l'arterite necrotizzante è il processo patogenetico responsabile dello sviluppo delle CALs durante la fase acuta della KD. L'infiltrazione delle coronarie da parte di cellule infiammatorie porta alla rottura delle fibre di collagene ed elastina e alla perdita di integrità strutturale, con conseguenti aneurismi e dilatazioni<sup>1</sup>. Uno dei passaggi di questo processo è la distruzione dello strato endoteliale che potrebbe essere responsabile del distacco delle cellule endoteliali e dei conseguenti elevati livelli di CECs nel sangue periferico, come riscontrato nella nostra coorte<sup>31</sup>.

Inoltre, come già discusso, il danno endoteliale sembra persistere anche anni dopo la malattia acuta<sup>213</sup>. È già stato dimostrato, infatti, che i pazienti con KD con CALs persistenti o in regressione mostrano una funzione vascolare compromessa a lungo termine<sup>221,222</sup>. La persistenza di elevati livelli di CECs durante la fase subacuta anche nei pazienti senza CALs, come documentato nella nostra coorte, rappresenta un risultato che conferma la disfunzione endoteliale persistente anche in pazienti senza coinvolgimento coronarico nelle fasi iniziali di malattia.

In aggiunta, in fase subacuta è stata riscontrata una correlazione diretta fra CECs e la percentuale di eosinofili. L'ipereosinofilia nella fase subacuta della KD è stata correlata al processo di vasculite subacuta cronica mediata dall'azione asincrona di linfociti, plasmacellule, eosinofili e macrofagi, che si verifica nella tonaca arteriosa entro 2 settimane dall'esordio, sebbene finora questo parametro laboratoristico non sia stato ancora correlato a lesioni coronariche o score di rischio<sup>1,42</sup>. Come già accennato, il basso numero di CECs riscontrate nei pazienti della nostra coorte con diagnosi di MIS-C durante la fase acuta, può rappresentare un ulteriore passo verso una comprensione più profonda del processo patogenetico coinvolto nello sviluppo di CALs negli stessi. Sebbene le particelle di SARS-CoV-2 siano state rilevate all'interno delle cellule endoteliali e siano state raccolte prove a favore di una disfunzione endoteliale nei bambini con MIS-C, il processo responsabile dello sviluppo di CALs potrebbe non includere la perdita dell'integrità dello strato endoteliale<sup>120,223,224</sup>.

È già stato dimostrato che nei bambini con diagnosi di artrite idiopatica giovanile o di malattie febbrili, le dimensioni delle arterie coronarie possono essere maggiori rispetto a quelle dei soggetti sani<sup>225</sup>. Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che un evento simile possa verificarsi nei pazienti con MIS-C: i CALs potrebbero svilupparsi a causa di alti livelli di citochine circolanti con conseguente disfunzione delle cellule endoteliali ed edema, piuttosto che a causa di un'alterazione della struttura vascolare, come accade nei pazienti con KD<sup>224,226</sup>.

Questa diversa patogenesi dei CALs potrebbe anche spiegare la maggiore tendenza delle anomalie coronariche a regredire dalla fase acuta alla fase subacuta dei pazienti con MIS-C rispetto ai pazienti con KD, come già riportato in precedenza e poi confermato nel presente studio<sup>87</sup>. La

persistenza dell'integrità endoteliale nei pazienti con MIS-C potrebbe contribuire a spiegare l'assenza di un aumento dei livelli di CECs in questi pazienti durante la fase acuta, anche in quelli con CALs. Inoltre, il rilevamento di cluster/sincizi nella metà dei pazienti con KD, a differenza della minore incidenza nei pazienti con AC19 e MIS-C, può contribuire a sottolineare il profondo danno endoteliale che distingue la KD da AC19 e MIS-C. Un sincizio è una massa multinucleata di citoplasma risultante dalla fusione di cellule. In condizioni normali gli eventi di fusione sono rari, ma aumentano in condizioni patologiche come dopo una lesione tissutale<sup>227</sup>.

Il diverso andamento dei valori di CECs tra KD e MIS-C dalla fase acuta a quella subacuta sembra supportare l'ipotesi di differenti processi patogenetici, evidenziando la possibile persistenza di anomalie generalizzate a lungo termine dell'endotelio anche dopo il trattamento standard nei pazienti con KD. D'altra parte, la lieve diminuzione dei livelli di CECs nei pazienti MIS-C dalla fase acuta a quella subacuta suggerisce una graduale risoluzione del processo infiammatorio responsabile dei sintomi clinici e delle complicanze durante la fase acuta della malattia. La parete vascolare, grazie all'assenza di distruzione endoteliale, potrebbe gradualmente ritornare alle condizioni preesistenti in assenza di un danno vascolare duraturo, permettendo a questi pazienti, a differenza dei pazienti KD, di avere un rischio cardiovascolare a lungo termine paragonabile a quello della popolazione generale.

Inoltre, il trattamento con steroidi in aggiunta alle IVIG nei pazienti con MIS-C potrebbe accelerare la riduzione dell'infiammazione, con un rapido ripristino delle normali funzioni endoteliali.

Infatti, nel nostro studio i pazienti trattati con steroidi (indipendentemente dalla patologia) hanno valori di CECs in fase subacuta (quindi dopo la terapia) significativamente più bassi. Non è noto se ciò sia correlato alla patologia oppure alla terapia stessa, alla luce del fatto che tutti i pazienti con MIS-C ricevono steroidi a differenza di una piccola percentuale di pazienti con AC19 e KD.

In aggiunta, il riscontro di diversi valori di CECs tra KD e MIS-C durante la fase subacuta contribuisce a colmare alcune lacune sull'influenza della terapia con IVIG sulle CECs<sup>64</sup>. Anche se i pazienti con KD e MIS-C hanno ricevuto entrambi l'infusione di IVIG durante la fase acuta, i livelli di CECs sono risultati significativamente diversi durante la fase subacuta, suggerendo che il numero di CECs non è influenzato dalla terapia con IVIG. D'altra parte, come già accennato, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire se la terapia con corticosteroidi condiziona i livelli di CECs.

Alla luce dei risultati dello studio, i livelli di CECs potrebbero rappresentare uno strumento aggiuntivo per distinguere la KD da MIS-C all'esordio della malattia, poiché queste due condizioni hanno una definizione prevalentemente clinica senza caratteristiche patognomoniche. Le CECs potrebbero quindi aiutare il pediatra a fornire il trattamento più adeguato al paziente.

Inoltre, come già accennato, la differenza delle CECs tra KD e MIS-C in fase acuta potrebbe avere un importante valore prognostico, suggerendo che i pazienti con MIS-C, con o senza CALs, potrebbero, a differenza dei pazienti con KD, non avere un maggior rischio di malattia cardiovascolare a lungo termine.

Riguardo all'infezione acuta da SARS-CoV-2, nel sottogruppo di pazienti con AC19 non è stata riscontrata alcuna correlazione tra le CECs e i parametri correlati alla gravità di malattia, verosimilmente per la bassa incidenza di forme gravi (1/10, 10% dei pazienti).

Un risultato degno di nota è stato il riscontro di valori di CECs significativamente superiori nei pazienti di età inferiore a 6 mesi con AC19. Anche nei pazienti con KD i valori di CECs sono risultati significativamente superiori nei pazienti di età più giovane. Tale risultato potrebbe essere correlato al fisiologico maggior rimaneggiamento vascolare, crescita e angiogenesi presenti in questa fascia di età. Questo risultato mette in evidenza il problema relativo alla mancanza di *cut-off* specifici delle CECs per l'età pediatrica, che potrebbero influenzare significativamente i risultati di tutti gli studi finora condotti sulle CECs nei bambini in diverse patologie.

Fino ad oggi, il conteggio e/o la cinetica delle CECs non sono mai stati studiati con il sistema CELLSEARCH® nei pazienti adulti con COVID-19. Gli studi eseguiti con la procedura di citometria a flusso convalidata per enumerare le CECs hanno riportato risultati diversi, a seconda che siano stati valutati il conteggio assoluto delle CECs oppure il conteggio del rapporto CECs vitali/apoptotiche. Mancuso et al. hanno evidenziato che il conteggio assoluto delle CECs CD146+ mature era simile nei controlli sani rispetto ai pazienti con COVID-19, ma il rapporto CECs CD146+ vitali/apoptotiche era significativamente a favore delle CECs vitali<sup>215</sup>. Nizzoli et al., invece, hanno riscontrato che nel 76.7% dei pazienti con COVID-19 il numero delle CECs era superiore alla soglia di normalità, con valori significativamente superiori rispetto ai controlli sani (16.7%)<sup>214</sup>.

Tra i risultati aggiuntivi degni di nota, nel presente studio sono state confermate alcune differenze tra KD e MIS-C già evidenziate in letteratura, a conferma che il campione, seppur esiguo, possa essere almeno parzialmente rappresentativo delle due popolazioni<sup>87</sup>. Innanzitutto, l'età dei pazienti con MIS-C è risultata significativamente più elevata rispetto ai pazienti con KD, dato già ampiamente documentato in letteratura. In aggiunta, nel nostro campione alcuni sintomi e segni clinici, nello specifico la congiuntivite non secretiva, le manifestazioni cutanee e la linfadenopatia laterocervicale, sono risultati più frequenti nei pazienti con KD rispetto ai pazienti con MIS-C e AC19, mentre i pazienti con MIS-C presentavano più frequentemente sintomi addominali e ipotensione rispetto ai pazienti con AC19. Inoltre, come già documentato in letteratura, i pazienti con MIS-C ricevono una terapia più precoce rispetto ai pazienti con KD e necessitano più

frequentemente di una terapia con inotropi. Inoltre, le alterazioni laboratoristiche riscontrate in fase acuta nelle due patologie rispecchiano i dati già evidenziati dagli studi clinici finora pubblicati: marcata leucocitosi neutrofila nella KD, piastrinopenia e linfopenia nella MIS-C con rialzo marcato degli indici di flogosi (PCR, PCT e ferritina), ipoalbuminemia e iponatriemia. Sono stati inoltre riscontrati la tipica piastrinosi che caratterizza la KD in fase subacuta e valori elevati di BNP nella MIS-C sia in fase acuta che in subacuta. Riguardo alla correlazione tra i parametri clinico-laboratoristici e le CECs, i risultati che abbiamo ottenuto possono essere correlati prevalentemente alle differenze clinico-laboratoristiche riscontrate tra KD e MIS-C.

## **Limiti**

Il presente studio ha alcune limitazioni. Innanzitutto, l'esigua dimensione del campione, in particolare per la coorte KD, a causa della relativa bassa incidenza della malattia in Italia. Inoltre, l'arruolamento è stato condotto in un periodo particolare (piena pandemia da SARS-CoV-2), in cui la circolazione dei virus, possibili trigger per la malattia, era estremamente ridotta a causa dell'isolamento sociale e del *lock-down*. In aggiunta, nel gruppo di pazienti con KD, l'incidenza di eventi coronarici è stata molto bassa, tanto da poter spiegare la mancanza di correlazione tra CECs e CALs. Al contrario, un numero relativamente elevato di pazienti con MIS-C è stato arruolato in un intervallo di tempo piuttosto breve, sia perché la nostra Unità Operativa dell'IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna è un centro di riferimento terziario, sia per l'elevata incidenza di casi di COVID-19 durante la pandemia nella nostra regione. Infine, anche il numero di pazienti con AC19 è stato esiguo, da un lato perché, come già accennato, la maggior parte dei pazienti in età pediatrica sono asintomatici o paucisintomatici e spesso non arrivano all'attenzione del medico ospedaliero. Dall'altro lato, come spiegato nella sezione dei Materiali e Metodi, essendo il prelievo venoso una procedura dolorosa e relativamente invasiva nel paziente pediatrico, la raccolta della provetta per l'analisi delle CECs è stata eseguita solamente in pazienti che necessitavano di eseguire un prelievo ematico per ragioni cliniche, i quali sono risultati essere una percentuale molto inferiore rispetto alla totalità dei pazienti valutati nel nostro centro per AC19. Questo è inoltre il motivo per cui non ci sono dati sulle CECs relativi alla fase subacuta dei pazienti con AC19.

Un altro limite è rappresentato sicuramente dalla mancanza di *cut-off* specifici delle CECs per l'età pediatrica. Sono quindi necessari ulteriori studi finalizzati alla valutazione delle CECs in controlli sani pediatrici al fine di identificare il range di normalità per questa fascia di età.

In terzo luogo, la metodica CELLSEARCH® non è in grado di distinguere tra CECs vitali e apoptotiche e tra CECs e EPCs. Queste ultime si ritiene provengano dal midollo osseo e circolino attraverso il flusso sanguigno per raggiungere i siti di lesione endoteliale e riparare il danno.

Infine, l'andamento delle CECs dalla fase acuta alla fase subacuta potrebbe essere stato influenzato dalla terapia eseguita, nello specifico la terapia immunomodulante più aggressiva ricevuta dai pazienti con MIS-C rispetto ai pazienti con KD, che potrebbe arginare più efficacemente l'infiammazione e il conseguente danno endoteliale.

Il presente studio rappresenta un ulteriore passo verso una comprensione più profonda del danno endoteliale nei pazienti pediatrici con KD, MIS-C e AC19. Sono necessari ulteriori studi con casistiche più ampie per confermare i presenti risultati, per identificare i parametri che influenzano la conta delle CECs nei pazienti pediatrici con AC19 e per valutare il danno endoteliale a lungo termine in tutte e tre le patologie al fine di quantificare il rischio cardiovascolare futuro dei pazienti affetti.

## CONCLUSIONI

Lo studio del danno endoteliale mediante l'enumerazione delle CECs con la metodica CELLSEARCH® nella KD e nelle patologie COVID-relate, sia l'infezione acuta da SARS-CoV-2 sia la MIS-C, ha messo in evidenza sostanziali differenze tra le tre patologie. In particolar modo nella KD il danno sembra essere più profondo e persistente. Questo risultato potrebbe sottendere una differente fisiopatologia del danno stesso, con una disfunzione persistente anche in fase subacuta della KD, come già suggerito da altri studi in letteratura eseguiti con altre metodiche di valutazione della funzione endoteliale. Inoltre, è stata identificata la presenza di sincizi, finora riscontrata solo in soggetti adulti con sindrome coronarica acuta, soprattutto nella KD, i quali rimarcano la presenza di un danno endoteliale più marcato. Le differenze riscontrate tra KD e MIS-C supportano l'ipotesi che queste malattie, inizialmente confuse a causa della loro presentazione clinico-laboratoristica sovrapponibile, siano due patologie infiammatorie con coinvolgimento multiorgano dalla fisiopatologia diversa, anche se tuttora non completamente conosciuta.

I valori di CECs, quindi, oltre a suggerire una diversa patogenesi, potrebbero anche essere di supporto per differenziare i pazienti con KD e MIS-C. Infatti, nonostante siano state riportate alcune differenze clinico-laboratoristiche, in alcuni casi la presentazione delle due patologie risulta estremamente sovrapponibile. In questi casi la distinzione tra KD e MIS-C è estremamente difficile, soprattutto per la sempre crescente prevalenza di sierologia positiva per SARS-CoV-2 nella popolazione pediatrica, legata all'infezione naturale o alla vaccinazione. Inoltre, le CECs potrebbero avere un ruolo nell'identificazione di quei soggetti che beneficerebbero di un trattamento aggiuntivo alla terapia standard per limitare il coinvolgimento cardiaco, migliorandone la prognosi.

Prospettive future includono: l'arruolamento di un numero superiore di pazienti per confermare i risultati ottenuti su KD e MIS-C dal presente studio e per identificare i parametri che condizionano la conta delle CECs nei pazienti pediatrici con AC19; lo studio delle CECs anche a distanza dalla fase acuta, sia nella fase convalescente, sia a distanza di anni dall'esordio della KD e della MIS-C, al fine di valutare l'eventuale regressione o persistenza del danno endoteliale in entrambi i gruppi di pazienti; l'utilizzo di metodiche in grado di distinguere tra CECs e EPCs e la vitalità delle cellule circolanti al fine di ottenere una maggiore comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle tre patologie analizzate.

## BIBLIOGRAFIA

1. McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation* **2017**;135:e927-99.
2. Kawasaki T. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children. *Aerugi* **1967**;16:178-222.
3. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, et al. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics* **1974**;54:271-6.
4. Burns JC. History of the worldwide emergence of Kawasaki disease. *International Journal of Rheumatic Diseases* **2018**;21:13-5.
5. Kim GB. Reality of Kawasaki disease epidemiology. *Korean Journal of Pediatrics*. **2019**;62:292.
6. Makino N, Nakamura Y, Yashiro M, et al. Epidemiological observations of Kawasaki disease in Japan, 2013–2014. *Pediatrics International* **2018**;60:581-7.
7. Uehara R, Belay ED. Epidemiology of Kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States. *Journal of Epidemiology*. **2012**;22:79-85.
8. Manlhiot C, O'Shea S, Bernknopf B, et al. Epidemiology of Kawasaki disease in Canada 2004 to 2014: comparison of surveillance using administrative data vs periodic medical record review. *Canadian Journal of Cardiology* **2018**;34:303-9.
9. Yanagawa H, Nakamura Y, Yashiro M, et al. Incidence survey of Kawasaki disease in 1997 and 1998 in Japan. *Pediatrics* **2001**;107:e33.
10. Píram M. Epidemiology of Kawasaki disease in Europe. *Frontiers in Pediatrics* **2021**;9:673554.
11. Fraison JB, Sève P, Dauphin C, et al. Kawasaki disease in adults: observations in France and literature review. *Autoimmunity Reviews*. **2016**;15:242-9.
12. Fernandez-Cooke E, Barrios Tascon A, Sanchez-Manubens J, et al. Epidemiological and clinical features of Kawasaki disease in Spain over 5 years and risk factors for aneurysm development. 2011-2016: KAWA-RACE study group. *PLoS One* **2019**;14:e0215665.
13. Burns JC, Shike H, Gordon JB, et al. Sequelae of Kawasaki disease in adolescents and young adults. *Journal of the American College of Cardiology* **1996**;28:253-7.
14. Daniels LB, Tjajadi MS, Walford HH, et al. Prevalence of Kawasaki disease in young adults with suspected myocardial ischemia. *Circulation* **2012**;125:2447-53.
15. Burns JC, Herzog L, Fabri O, et al. Seasonality of Kawasaki disease: a global perspective. *PloS one* **2013**;8:e74529.
16. Rigante D. Kawasaki disease as the immune-mediated echo of a viral infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. **2020**;12:e2020039.
17. Principi N, Rigante D, Esposito S. The role of infection in Kawasaki syndrome. *Journal of Infection* **2013**;67:1-10.
18. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, et al. Detection of antigen in bronchial epithelium and macrophages in acute Kawasaki disease by use of synthetic antibody. *Journal of Infectious Diseases* **2004**;190:856-65.
19. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, et al. Cytoplasmic inclusion bodies are detected by synthetic antibody in ciliated bronchial epithelium during acute Kawasaki disease. *Journal of Infectious Diseases* **2005**;192:1757-66.
20. Rodó X, Ballester J, Cayán D, et al. Association of Kawasaki disease with tropospheric wind patterns. *Scientific reports* **2011**;1:152.
21. Rodó X, Curcoll R, Robinson M, et al. Tropospheric winds from northeastern China carry the etiologic agent of Kawasaki disease from its source to Japan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**;111:7952-7.



22. Manlhiot C, Mueller B, O'Shea S, et al. Environmental epidemiology of Kawasaki disease: Linking disease etiology, pathogenesis and global distribution. *PLoS One*. **2018**;13:e0191087.
23. Rypdal M, Rypdal V, Burney JA, et al. Clustering and climate associations of Kawasaki Disease in San Diego County suggest environmental triggers. *Scientific reports* **2018**;8:16140.
24. Corinaldesi E, Pavan V, Andreozzi L, et al. Environmental factors and Kawasaki disease onset in Emilia-Romagna, Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**;17:1529.
25. Barron KS. Kawasaki disease: etiology, pathogenesis, and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* **2002**;69:69-78.
26. Burns JC, Glodé MP. Kawasaki syndrome. *The Lancet* **2004**;364:533-44.
27. Hara T, Yamamura K, Sakai Y. The up-to-date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clinical & Translational Immunology* **2021**;10:e1284.
28. Dimitriadis VR, Brown AG, Gedalia A. Kawasaki disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Current Rheumatology Reports* **2014**;16:1-7.
29. Lindquist ME, Hicar MD. B cells and antibodies in Kawasaki disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**;20:1834.
30. Noval Rivas M, Arditi M. Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology* **2020**;16:391-405.
31. Orenstein JM, Shulman ST, Fox LM, et al. Three Linked Vasculopathic Processes Characterize Kawasaki Disease: A Light and Transmission Electron Microscopic Study. *PLoS ONE* **2012**;7:e38998.
32. Fritter BS, Lucky AW. The perineal eruption of Kawasaki syndrome. *Archives of dermatology* **1988**;124:1805-10.
33. Fabi M, Corinaldesi E, Pierantoni L, et al. Gastrointestinal presentation of Kawasaki disease: a red flag for severe disease?. *PloS One* **2018**;13:e0202658.
34. Zulian F, Falcini F, Zancan L, et al. Acute surgical abdomen as presenting manifestation of Kawasaki disease. *The Journal of Pediatrics* **2003**;142:731-5.
35. Sun Q, Zhang J, Yang Y. Gallbladder hydrops associated with Kawasaki disease: a case report and literature review. *Clinical Pediatrics* **2018**;57:341-3.
36. Minich LL, Sleeper LA, Atz AM, et al. Delayed diagnosis of Kawasaki disease: what are the risk factors? *Pediatrics* **2007**;120:e1434-40.
37. Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation* **2004**;110:2747-71.
38. Heuclin T, Dubos F, Hue V, et al. Increased detection rate of Kawasaki disease using new diagnostic algorithm, including early use of echocardiography. *The Journal of Pediatrics* **2009**;155:695-9.
39. Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, et al. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *Journal of virology* **2009**;83:2417-28.
40. Jaggi P, Kajon AE, Mejias A, et al. Human adenovirus infection in Kawasaki disease: a confounding bystander? *Clinical infectious diseases* **2013**;56:58-64.
41. Fabi M, Dondi A, Andreozzi L, et al. Kawasaki disease, multisystem inflammatory syndrome in children, and adenoviral infection: a scoring system to guide differential diagnosis. *European Journal of Pediatrics* **2023**. Online ahead of print.
42. Tremoulet AH, Jain S, Chandrasekar D, et al. Evolution of Laboratory Values in Patients With Kawasaki Disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2011**;30:1022-6.
43. Chiang AN, Hwang B, Shaw GC, et al. Changes in plasma levels of lipids and lipoprotein composition in patients with Kawasaki disease. *Clinica chimica acta* **1997**;260:15-26.

44. JCS Joint Working Group. JCS Joint Working Group. Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008)—Digest Version—. *Circulation Journal* **2010**;74:1989-2020.
45. de Zorzi A, Colan SD, Gauvreau K, et al. Coronary artery dimensions may be misclassified as normal in Kawasaki disease. *Journal of Pediatrics* **1998**;133:254-8.
46. Printz BF, Sleeper LA, Newburger JW, et al. Noncoronary cardiac abnormalities are associated with coronary artery dilation and with laboratory inflammatory markers in acute Kawasaki disease. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**;57:86-92.
47. Harada M, Yokouchi Y, Oharaseki T, et al. Histopathological characteristics of myocarditis in acute-phase Kawasaki disease. *Histopathology* **2012**;61:1156-67.
48. Furusho K, Nakano H, Shinomiya K, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for Kawasaki disease. *The Lancet* **1984**;324:1055-8.
49. Schror K. Aspirin and Reye Syndrome. *Pediatr Drugs* **2007**;9:195-204.
50. Yang TJ, Lin MT, Lu CY, et al. The prevention of coronary arterial abnormalities in Kawasaki disease: A meta-analysis of the corticosteroid effectiveness. *Journal of microbiology, immunology and infection* **2018**;51:321-31.
51. Rigante D, Andreozzi L, Fastiggi M, et al. Critical overview of the risk scoring systems to predict non-responsiveness to intravenous immunoglobulin in Kawasaki syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**;17:278.
52. Fabi M, Andreozzi L, Corinaldesi E, et al. Inability of Asian risk scoring systems to predict intravenous immunoglobulin resistance and coronary lesions in Kawasaki disease in an Italian cohort. *European Journal of Pediatrics* **2019**;178:315-22.
53. Hirono K, Kemmotsu Y, Wittkowski H, et al. Infliximab reduces the cytokine-mediated inflammation but does not suppress cellular infiltration of the vessel wall in refractory Kawasaki disease. *Pediatric Research* **2009**;65:696-701.
54. Portman MA, Dahdah NS, Slee A, et al. Etanercept with IVIg for acute Kawasaki disease: a randomized controlled trial. *Pediatrics* **2019**;143:e20183675.
55. Guijarro C, Egido J. Transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and renal disease. *Kidney international* **2001**;59:415-24.
56. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology* **2002**;39:257-65.
57. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *American Heart Journal* **2003**;146:168-74.
58. Yu X, Wu D, Song G. Assessment of Endothelial Dysfunction in Patients with Kawasaki Disease: A Meta-Analysis. *Reviews in Cardiovascular Medicine* **2022**;23:260.
59. Dietz SM, Tacke CE, Hutten BA, et al. Peripheral endothelial (dys) function, arterial stiffness and carotid intima-media thickness in patients after Kawasaki disease: a systematic review and meta-analyses. *PloS One* **2015**;10:e0130913.
60. Ikemoto Y, Ogino H, Teraguchi M, et al. Evaluation of preclinical atherosclerosis by flow-mediated dilatation of the brachial artery and carotid artery analysis in patients with a history of Kawasaki disease. *Pediatric Cardiology* **2005**;26:782-6.
61. Lo MH, Lin YJ, Kuo HC, et al. Assessment of vascular and endothelial function in Kawasaki disease. *Biomedical Journal* **2023**;46:100525.
62. Routhu SK, Singhal M, Jindal AK, et al. Assessment of endothelial dysfunction in acute and convalescent phases of Kawasaki disease using automated edge detection software: a preliminary study from North India. *Journal of Clinical Rheumatology* **2021**;27:143-9.
63. Tan Z, Yuan Y, Chen S, et al. Plasma endothelial microparticles, TNF- $\alpha$  and IL-6 in Kawasaki disease. *Indian pediatrics* **2013**;50:501-3.

64. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, et al. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. *Clinical & Experimental Immunology* **2003**;131:536-40.
65. Mostafavi N, Haghjooy-Javanmard S, Presidend N, et al. Persistence of endothelial cell damage late after Kawasaki disease in patients without coronary artery complications. *Advanced Biomedical Research*. **2015**;4:25.
66. Istituto Superiore di Sanità. Epidemia COVID-19 Aggiornamento nazionale 09 marzo 2020. Available online: [https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19\\_09-marzo-2020.pdf](https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19_09-marzo-2020.pdf) (accessed October 19, 2023).
67. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A, et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *The Lancet* **2020**;395:1771-8.
68. Riphagen S, Gomez X, Gonzalez-Martinez C, et al. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *The Lancet* **2020**;395:1607-8.
69. Royal College of Paediatrics and Child Health, Healteh C. Guidance - Paediatric Multisystem Inflammatory syndrome Temporally Associated with COVID-19. **2020**.
70. WHO. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children and Adolescents with COVID-19. Available online: <https://www.who.int/publications-detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19> (accessed October 19, 2023).
71. CDC. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated with SARS-CoV-2 Infection, 2023 Case Definition. Available online: <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-mis-c/> (accessed October 19, 2023).
72. Ahmed M, Advani S, Moreira A, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children: A systematic review. *EClinicalMedicine* **2020**;26:100527.
73. Shingleton J, Burton L, Williams HE, et al. Risk of paediatric multisystem inflammatory syndrome (PIMS-TS) during the SARS-CoV-2 alpha and delta variant waves: National observational and modelling study, 2020–21, England. *Frontiers in Pediatrics* **2022**;10:1034280.
74. Payne AB, Gilani Z, Godfred-Cato S, et al. Incidence of multisystem inflammatory syndrome in children among US persons infected with SARS-CoV-2. *JAMA network open* **2021**;4:e2116420.
75. CDC. COVID Data Tracker. Available online: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#mis-national-surveillance> (accessed October 19, 2023).
76. Whittaker R, Greve-Isdahl M, Bøås H, et al. COVID-19 hospitalization among children<18 years by variant wave in Norway. *Pediatrics* **2022**;150:e2022057564.
77. Cohen JM, Carter MJ, Cheung CR, et al. Lower risk of multisystem inflammatory syndrome in children with the delta and omicron variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Clinical Infectious Diseases* **2023**;76:e518-21.
78. Lopez L, Burgner D, Glover C, et al. Lower risk of multi-system inflammatory syndrome in children (MIS-C) with the omicron variant. *The Lancet Regional Health–Western Pacific* **2022**;27:100604.
79. Abraham DR, Butters C, Yunis NA, et al. The impact of SARS-Cov-2 variants on the clinical phenotype and severity of multisystem inflammatory syndrome in children in South Africa. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2022**;41:e510.
80. Filippatos F, Tatsi EB, Michos A. Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome after COVID-19 in Children: A Review of the Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**;24:5711.
81. La Torre F, Taddio A, Conti C, et al. Multi-Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) in 2023: Is It Time to Forget about It?. *Children* **2023**;10:980.
82. Yousaf AR, Cortese MM, Taylor AW, et al. Reported cases of multisystem inflammatory syndrome in children aged 12–20 years in the USA who received a COVID-19 vaccine,

- December, 2020, through August, 2021: a surveillance investigation. *The Lancet Child & Adolescent Health* **2022**;6:303-12.
83. Levy M, Recher M, Hubert H, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children by COVID-19 vaccination status of adolescents in France. *JAMA* **2022**;327:281-3.
  84. Ouldali N, Bagheri H, Salvo F, et al. Hyper inflammatory syndrome following COVID-19 mRNA vaccine in children: a national post-authorization pharmacovigilance study. *The Lancet Regional Health–Europe* **2022**;17:100393.
  85. Holm M, Espenhain L, Glenthøj J, et al. Risk and phenotype of multisystem inflammatory syndrome in vaccinated and unvaccinated Danish children before and during the omicron wave. *JAMA Pediatrics* **2022**;176:821-3.
  86. Jiang L, Tang K, Irfan O, et al. Epidemiology, clinical features, and outcomes of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and adolescents - a live systematic review and meta-analysis. *Current pediatrics reports* **2022**;10:19-30.
  87. Fabi M, Filice E, Biagi C, et al. Multisystem inflammatory syndrome following SARS-CoV-2 infection in children: one year after the onset of the pandemic in a high-incidence area. *Viruses* **2021**;13:2022.
  88. Miller AD, Yousaf AR, Bornstein E, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children during severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Delta and Omicron variant circulation - United States, July 2021-January 2022. *Clinical Infectious Diseases* **2022**;75:S303-7.
  89. Belot A, Levy-Bruhl D. Multisystem inflammatory syndrome in children in the United States. *The New England Journal of Medicine* **2020**;383:1793-4.
  90. Nakra NA, Blumberg DA, Herrera-Guerra A, et al. Multi-system inflammatory syndrome in children (MIS-C) following SARS-CoV-2 infection: review of clinical presentation, hypothetical pathogenesis, and proposed management. *Children* **2020**;7:69.
  91. Carter MJ, Fish M, Jennings A, et al. Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *Nature medicine* **2020**;26:1701-7.
  92. Consiglio CR, Cotugno N, Sardh F, et al. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell* **2020**;183:968-81.
  93. Lee PY, Day-Lewis M, Henderson LA, et al. Distinct clinical and immunological features of SARS-CoV-2-induced multisystem inflammatory syndrome in children. *The Journal of Clinical Investigation* **2020**;130:5942-50.
  94. Seery V, Raiden SC, Algieri SC, et al. Blood neutrophils from children with COVID-19 exhibit both inflammatory and anti-inflammatory markers. *EBioMedicine* **2021**;67:103357.
  95. Boribong BP, LaSalle TJ, Bartsch YC, et al. Neutrophil profiles of pediatric COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children. *Cell Reports Medicine* **2022**;3:100848.
  96. de Cevins C, Luka M, Smith N, et al. A monocyte/dendritic cell molecular signature of SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children with severe myocarditis. *Med* **2021**;2:1072-92.
  97. Ramaswamy A, Brodsky NN, Sumida TS, et al. Immune dysregulation and autoreactivity correlate with disease severity in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children. *Immunity* **2021**;54:1083-95.
  98. Diaz F, Bustos B R, Yagnam F, et al. Comparison of interleukin-6 plasma concentration in multisystem inflammatory syndrome in children associated with SARS-CoV-2 and pediatric sepsis. *Frontiers in Pediatrics* **2021**;9:756083..
  99. Esteve-Sole A, Anton J, Pino-Ramirez RM, et al. Similarities and differences between the immunopathogenesis of COVID-19-related pediatric multisystem inflammatory syndrome and Kawasaki disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2021**;131:e144554.

100. Henderson LA, Canna SW, Friedman KG, et al. American College of rheumatology clinical guidance for multisystem inflammatory syndrome in children associated with SARS-CoV-2 and Hyperinflammation in pediatric COVID-19: version 2. *Arthritis & Rheumatology* **2021**;73:e13-29.
101. Perez-Toledo M, Faustini SE, Jossi SE, et al. SARS-CoV-2-specific IgG1/IgG3 but not IgM in children with pediatric inflammatory multi-system syndrome. *Pediatric Allergy and Immunology* **2021**;32:1125-9.
102. Caldarale F, Giacomelli M, Garrafa E, et al. Plasmacytoid dendritic cells depletion and elevation of IFN- $\gamma$  dependent chemokines CXCL9 and CXCL10 in children with multisystem inflammatory syndrome. *Frontiers in Immunology* **2021**;12:654587.
103. Dogan M, Kozhaya L, Placek L, et al. SARS-CoV-2 specific antibody and neutralization assays reveal the wide range of the humoral immune response to virus. *Communications Biology* **2021**;4:129.
104. Gruber CN, Patel RS, Trachtman R, et al. Mapping systemic inflammation and antibody responses in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Cell* **2020**;183:982-95.
105. Weisberg SP, Connors TJ, Zhu Y, et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nature immunology* **2021**;22:25-31.
106. Bartsch YC, Wang C, Zohar T, et al. Humoral signatures of protective and pathological SARS-CoV-2 infection in children. *Nature medicine* **2021**;27:454-62.
107. Porritt RA, Paschold L, Rivas MN, et al. HLA class I-associated expansion of TRBV11-2 T cells in multisystem inflammatory syndrome in children. *The Journal of Clinical Investigation*. **2021**;131:e146614.
108. Vella LA, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of MIS-C demonstrates marked but transient immune activation compared with adult and pediatric COVID-19. *Science Immunology* **2021**;6:eabf7570.
109. Amormino C, Tedeschi V, Paldino G, et al. SARS-CoV-2 spike does not possess intrinsic superantigen-like inflammatory activity. *Cells* **11**,2526:
110. Hsieh LE, Song J, Grifoni A, et al. T Cells in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Have a Predominant CD4<sup>+</sup> T Helper Response to SARS-CoV-2 Peptides and Numerous Virus-Specific CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> Double-Negative T Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**;23:7219.
111. Dolhnikoff M, Ferranti JF, de Almeida Monteiro RA, et al. SARS-CoV-2 in cardiac tissue of a child with COVID-19-related multisystem inflammatory syndrome. *The Lancet Child & Adolescent Health* **2020**;4:790-4.
112. Cirks BT, Rowe SJ, Jiang SY, et al. Sixteen weeks later: expanding the risk period for multisystem inflammatory syndrome in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* **2021**;10:686-90.
113. Radia T, Williams N, Agrawal P, et al. Multi-system inflammatory syndrome in children & adolescents (MIS-C): A systematic review of clinical features and presentation. *Paediatric Respiratory Reviews* **2021**;38:51-7.
114. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, et al. Multisystem inflammatory syndrome in US children and adolescents. *The New England Journal of Medicine* **2020**;383:334-46.
115. Fabi M, Vasuri F, Guida F, et al. Case report: Histological findings of peri-appendicitis in three children with SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome: A mark for systemic inflammation?. *Frontiers in Pediatrics* **2022**;10:975940.
116. Abrams JY, Oster ME, Godfred-Cato SE, et al. Factors linked to severe outcomes in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in the USA: a retrospective surveillance study. *The Lancet Child & Adolescent Health* **2021**;5:323-31.

117. Godfred-Cato S, Bryant B, Leung J, et al. COVID-19–associated multisystem inflammatory syndrome in children—United States, March–July 2020. *Morbidity and mortality weekly report* **2020**;69:1074.
118. Valverde I, Singh Y, Sanchez-de-Toledo J, et al. Acute cardiovascular manifestations in 286 children with multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19 infection in Europe. *Circulation* **2021**;143:21-32.
119. Dionne A, Mah DY, Son MB, et al. Atrioventricular block in children with multisystem inflammatory syndrome. *Pediatrics* **2020**;146:e2020009704.
120. Feldstein LR, Tenforde MW, Friedman KG, et al. Characteristics and outcomes of US children and adolescents with multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) compared with severe acute COVID-19. *JAMA* **2021**;325:1074-87.
121. Matsubara D, Kauffman HL, Wang Y, et al. Echocardiographic findings in pediatric multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19 in the United States. *Journal of the American College of Cardiology* **2020**;76:1947-61.
122. Morparia K, Park MJ, Kalyanaraman M, et al. Abdominal imaging findings in critically ill children with multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2021**;40:e82-3.
123. Melgar M, Seaby EG, McArdle AJ, et al. Treatment of multisystem inflammatory syndrome in children: understanding differences in results of comparative effectiveness studies. *ACR Open Rheumatology* **2022**;4:804-10.
124. Son MBF, Murray N, Friedman K, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children - Initial Therapy and Outcomes. *The New England Journal of Medicine* **2021**;385:23.
125. Ouldali N, Toubiana J, Antona D, et al. Association of Intravenous Immunoglobulins Plus Methylprednisolone vs Immunoglobulins Alone With Course of Fever in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *JAMA* **2021**;325:855.
126. Son MBF, Berbert L, Young C, et al. Postdischarge Glucocorticoid Use and Clinical Outcomes of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *JAMA Network Open* **2022**;5:e2241622.
127. Villacis-Nunez DS, Jones K, Jabbar A, et al. Short-term Outcomes of Corticosteroid Monotherapy in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *JAMA Pediatrics* **2022**;176:576.
128. Whitworth H, Sartain SE, Kumar R, et al. Rate of thrombosis in children and adolescents hospitalized with COVID-19 or MIS-C. *Blood* **2021**;138:190.
129. Goldenberg NA, Sochet A, Albisetti M, et al. Consensus-based clinical recommendations and research priorities for anticoagulant thromboprophylaxis in children hospitalized for COVID-19-related illness. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2020**;18:3099.
130. American Academy of Pediatrics: Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Interim Guidance. Available online: <https://www.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/clinical-guidance/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-mis-c-interim-guidance/> (accessed October 19, 2023).
131. Peart Akindele N, Kouo T, Karaba AH, et al. Distinct cytokine and chemokine dysregulation in hospitalized children with acute coronavirus disease 2019 and multisystem inflammatory syndrome with similar levels of nasopharyngeal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 shedding. *The Journal of infectious diseases* **2021**;224:606-15.
132. Çiftel M, Ateş N, Yılmaz O. Investigation of endothelial dysfunction and arterial stiffness in multisystem inflammatory syndrome in children. *European Journal of Pediatrics* **2022**;181:91-97.

133. Kreslová M, Jehlička P, Sýkorová A, et al. Circulating Serum Cystatin C as an Independent Risk Biomarker for Vascular Endothelial Dysfunction in Patients with COVID-19-Associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C): A Prospective Observational Study. *Biomedicines* **2022**;10:2956..
134. Borgel D, Chocron R, Grimaud M, et al. Endothelial dysfunction as a component of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2–related multisystem inflammatory syndrome in children with shock. *Critical Care Medicine* **2021**;49:e1151.
135. Naqvi AA, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease* **2020**;1866:165878.
136. Zhai P, Ding Y, Wu X, et al. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2020**;55:105955
137. Shen K, Yang Y, Wang T, et al. Diagnosis, treatment, and prevention of 2019 novel coronavirus infection in children: experts' consensus statement. *World Journal of Pediatrics* **2020**;16:223-31.
138. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* **2020**;323:1843-4.
139. Morawska L, Milton DK. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases* **2020**;71:2311-3.
140. Jones DL, Baluja MQ, Graham DW, et al. Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Science of the Total Environment* **2020**;749:141364.
141. Huff HV, Singh A. Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies. *Clinical Infectious Diseases* **2020**;71:2752-6.
142. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. Available online: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. (accessed October 19, 2023).
143. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom – 20 December 2020. ECDC: Stockholm; **2020**.
144. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nature Medicine* **2021**;27:622-5.
145. England, Public Health. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England - Technical briefing 14. Available online: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/991343/Variants\\_of\\_Concern\\_VOC\\_Technical\\_Briefing\\_14.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/991343/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_14.pdf). (accessed October 19, 2023).
146. 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. *The Lancet Infectious Diseases* **2022**;22:35-42.
147. WHO. Enhancing response to Omicron SARS-CoV-2 variant: Technical brief and priority actions for Member States. Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/2022-01-21-global-technical-brief-and-priority-action-on-omicron-sars-cov-2-variant.pdf>. (accessed October 19, 2023).
148. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. *Morbidity and mortality weekly report* **2020**;69:759.

149. Dawood FS, Porucznik CA, Veguilla V, et al. Incidence Rates, Household Infection Risk, and Clinical Characteristics of SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adults in Utah and New York City, New York. *JAMA Pediatrics* **2022**;176:59-67.
150. RCPCH Research & Evidence team. COVID-19 - research evidence summaries. Royal College of Paediatrics and Child Health. 2020 May.
151. Williams PCM, Howard-Jones AR, Hsu P, et al. SARS-CoV-2 in children: spectrum of disease, transmission and immunopathological underpinnings. *Pathology (Phila)* **2020**;52:801-8.
152. 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**;324:782.
153. Pons S, Fodil S, Azoulay E, et al. The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Critical Care* **2020**;24:353.
154. Gu SX, Tyagi T, Jain K, et al. Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nature Reviews Cardiology* **2021**;18:194-209.
155. Guervilly C, Burtey S, Sabatier F, et al. Circulating Endothelial Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID-19. *The Journal of Infectious Diseases* **2020**;222:1789-93.
156. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *The New England Journal of Medicine* **2020**;382:1708-20.
157. Samudrala PK, Kumar P, Choudhary K, et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *European journal of pharmacology* **2020**;883:173375.
158. Kordzadeh-Kermani E, Khalili H, Karimzadeh I. Pathogenesis, clinical manifestations and complications of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Future Microbiology* **2020**;15:1287-305.
159. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. Longo DL, curatore. *The New England Journal of Medicine* **2020**;383:2255-73.
160. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, et al. SARS-COV-2 infection in children and newborns: a systematic review. *European Journal of Pediatrics* **2020**;179:1029-46.
161. Viner RM, Ward JL, Hudson LD, et al. Systematic review of reviews of symptoms and signs of COVID-19 in children and adolescents. *Archives of Disease in Childhood* **2021**;106:802-7.
162. Göttinger F, Santiago-García B, Noguera-Julián A, et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *The Lancet Child & Adolescent Health* **2020**;4:653-61.
163. Forrest CB, Burrows EK, Mejias A, et al. Severity of Acute COVID-19 in Children <18 Years Old March 2020 to December 2021. *Pediatrics* **2022**;149:e2021055765.
164. Greenan-Barrett J, Ciurtin C. COVID-19 in Immunocompromised Children and Adolescents. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2022**;41:e424-7.
165. Tseng FH, Yeh SH, Basiago K, et al. Is Acute Solid Food Aversion a Proxy for COVID-19-Related Olfactory and Gustatory Dysfunction? *Pediatrics* **2022**;149:e2021052534.
166. Zimmermann P, Curtis N. Why Does the Severity of COVID-19 Differ With Age?: Understanding the Mechanisms Underlying the Age Gradient in Outcome Following SARS-CoV-2 Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2022**;41: e36-e45.
167. King JA, Whitten TA, Bakal JA, et al. Symptoms associated with a positive result for a swab for SARS-CoV-2 infection among children in Alberta. *Canadian Medical Association Journal* **2021**;193:E1-E9.
168. Hurst JH, McCumber AW, Aquino JN, et al. Age-related changes in the nasopharyngeal microbiome are associated with SARS-CoV-2 infection and symptoms



- among children, adolescents, and young adults. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2022 Mar 5.
169. Hyde Z. Difference in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Attack Rate Between Children and Adults May Reflect Bias. *Clinical Infectious Diseases* **2022**;74:152-5.
  170. Woodruff RC, Campbell AP, Taylor CA, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatrics* **2021**;149:e2021053418.
  171. Shekerdemian LS, Mahmood NR, Wolfe KK, et al. Characteristics and Outcomes of Children With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection Admitted to US and Canadian Pediatric Intensive Care Units. *JAMA Pediatrics* **2020**;174:868-873.
  172. Bixler D, Miller AD, Mattison CP, et al. SARS-CoV-2-Associated Deaths Among Persons Aged <21 Years - United States, February 12-July 31, 2020. *Morbidity and mortality weekly report* **2020**;69:1324-9.
  173. Garazzino S, Lo Vecchio A, Pierantoni L, et al. Epidemiology, Clinical Features and Prognostic Factors of Pediatric SARS-CoV-2 Infection: Results From an Italian Multicenter Study. *Frontiers in Pediatrics* **2021**;9:649358.
  174. Esposito S, Caramelli F, Principi N. What are the risk factors for admission to the pediatric intensive unit among pediatric patients with COVID-19?. *Italian Journal of Pediatrics* **2021**;47:103.
  175. Siegel DA, Reses HE, Cool AJ, et al. Trends in COVID-19 Cases, Emergency Department Visits, and Hospital Admissions Among Children and Adolescents Aged 0- 17 Years - United States, August 2020-August 2021. *Morbidity and mortality weekly report* **2021**;70:1249-54.
  176. 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. *Morbidity and mortality weekly report* **2022**;71:146-52.
  177. Chiotos K, Hayes M, Kimberlin DW, et al. Multicenter interim guidance on use of antivirals for children with coronavirus disease 2019/severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* **2021**;10:34-48.
  178. ClinicalTrials.gov. Study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of remdesivir (GS-5734) in participants from birth to <18 years with coronavirus disease (2019) (COVID-19) (CARAVAN). Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04431453> (accessed October 19, 2023).
  179. Vaccini anti-Covid. Ministero della Salute. Available online: [https://www.salute.gov.it/portale/p5\\_1\\_2.jsp?lingua=italiano&id=255](https://www.salute.gov.it/portale/p5_1_2.jsp?lingua=italiano&id=255). (accessed October 19, 2023).
  180. Olson SM, Newhams MM, Halasa NB, et al. Effectiveness of Pfizer-BioNTech mRNA Vaccination Against COVID-19 Hospitalization Among Persons Aged 12-18 Years - United States, June-September 2021. *Morbidity and mortality weekly report* **2021**;70:1483-88.
  181. Olson SM, Newhams MM, Halasa NB, et al. Effectiveness of BNT162b2 Vaccine against Critical Covid-19 in Adolescents. *The New England Journal of Medicine* **2022**;386:713-23.
  182. Olivier S. Evidence to Recommendations (EtR) Framework: Pfizer-BioNTech COVID- 19 vaccine in children aged 5–11 years. Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/meetings/downloads/slides-2021-11-2-3/08-COVID-Oliver-508.pdf>. Published November 2021. (accessed October 19, 2023).

183. Anderson EJ, Campbell JD, Creech CB, et al. Warp Speed for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccines: Why Are Children Stuck in Neutral?. *Clinical Infectious Diseases* **2021**;73:336-40.
184. Lanari M, Morgan L, D'Innocenzo S, Gennari M. Consequences of the lockdown from the Covid-19 pandemic in Italy: what are the risks for minors?. *Youth Voice Journal* **2020**.
185. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nature Reviews Nephrology* **2021**;17:46-64.
186. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells* **2020**;9:1652.
187. Yamaoka-Tojo M. Endothelial glycocalyx damage as a systemic inflammatory microvascular endotheliopathy in COVID-19. *Biomedical Journal* **2020**;43:399-413.
188. Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet* **2020**;395:1417-8.
189. Marchetti M. COVID-19-driven endothelial damage: complement, HIF-1, and ABL2 are potential pathways of damage and targets for cure. *Annals of Hematology* **2020**;99:1701-7.
190. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clinica chimica acta* **2006**;373:17-26.
191. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia* **2004**;93:105-13.
192. Dehghani T, Panitch A. Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle. *Open Biology* **2020**;10:200161.
193. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *The Journal of Immunology* **2007**;178:6017-22.
194. Howe KL, Fish JE. Transforming endothelial cells in atherosclerosis. *Nature Metabolism* **2019**;1:856-7.
195. Boos CJ, Lip GYH, Blann AD. Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**;48:1538-47.
196. Schmidt DE, Manca M, Hoefler IE. Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2015**;25:578-87.
197. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *European Journal of Haematology* **2000**;65:215-20.
198. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *Journal of the American Society of Hypertension* **2012**;6:85-99.
199. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. *International Journal of Cardiology* **2006**;111:302-8.
200. Koc M, Richards HB, Bihorac A, et al. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney International* **2005**;67:1078-83.
201. Papa ND, Cortiana M, Vitali C, et al. Simvastatin Reduces Endothelial Activation and Damage But Is Partially Ineffective in Inducing Endothelial Repair in Systemic Sclerosis. *The Journal of Rheumatology* **2008**;35:1323-8.

202. Shantsila E, Blann AD, Lip GYH. Circulating endothelial cells: from bench to clinical practice: Circulating endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2008**;6:865-8.
203. Sabashnikov A, Neef K, Chesnokova V, et al. Enumeration of circulating endothelial cell frequency as a diagnostic marker in aortic valve surgery - a flow cytometric approach. *Journal of Cardiothoracic Surgery* **2017**;12:68.
204. Widemann A, Sabatier F, Arnaud L, et al. CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells: CEC detection using CD146-based immunomagnetic separation and flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2008**;6:869-76.
205. Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Current Opinion in Hematology* **2014**;21:224.
206. Popa ER, Kas-Deelen AM, Hepkema BG, et al. Donor-derived circulating endothelial cells after kidney transplantation. *Transplantation* **2002**;74:1320-7.
207. Yu X, Hirono KI, Ichida F, et al. Enhanced iNOS expression in leukocytes and circulating endothelial cells is associated with the progression of coronary artery lesions in acute Kawasaki disease. *Pediatric Research* **2004**;55:688-94.
208. Fu S, Gong F, Xie C, et al. S100A12 on circulating endothelial cells surface in children with Kawasaki disease. *Pediatric Research* **2010**;68:165-8.
209. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, et al. Differential gene expression of S100 protein family in leukocytes from patients with Kawasaki disease. *European Journal of Pediatrics* **2005**;164:427-31.
210. Foell D, Ichida F, Vogl T, et al. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *The Lancet* **2003**;361:1270-2.
211. Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, et al. An immunoglobulin agent (IVIg) inhibits NF- $\kappa$ B activation in cultured endothelial cells of coronary arteries in vitro. *Inflammation Research* **2004**;53:253-6.
212. Gong F, Zhang Y, Xie C, et al. Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on the surface of circulating endothelial cells is upregulated in Kawasaki disease. *Pediatr Research* **2012**;71:720-4.
213. Shah V, Christov G, Mukasa T, et al. Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK. *Heart* **2015**;101:1646-55.
214. Nizzoli ME, Merati G, Tenore A, et al. Circulating endothelial cells in COVID-19. *American Journal of Hematology* **2020**;95:E187.
215. Mancuso P, Gidaro A, Gregato G, et al. Circulating endothelial progenitors are increased in COVID-19 patients and correlate with SARS-CoV-2 RNA in severe cases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2020**;18:2744-50.
216. Kleinman ME, Chameides L, Schexnayder SM, et al. Pediatric advanced life support: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Pediatrics* **2010**;126:e1361-99.
217. Rowand JL, Martin G, Doyle GV, et al. Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2007**;71:105-13.
218. Almici C, Neva A, Skert C, et al. Counting circulating endothelial cells in allo-HSCT: an ad hoc designed polychromatic flowcytometry-based panel versus the CellSearch System. *Scientific Reports* **2019**;9:87.
219. Almici C, Skert C, Bruno B, et al. Circulating endothelial cell count: a reliable marker of endothelial damage in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **2017**;52:1637-42.

220. Almici C, Skert C, Verardi R, et al. Changes in circulating endothelial cells count could become a valuable tool in the diagnostic definition of acute graft-versus-host disease. *Transplantation* **2014**;98:706-12.
221. Suzuki A, Yamagishi M, Kimura K, et al. Functional behavior and morphology of the coronary artery wall in patients with Kawasaki disease assessed by intravascular ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology* **1996**;27:291-6.
222. Noto N, Karasawa K, Kanamaru H, et al. Non-invasive measurement of coronary flow reserve in children with Kawasaki disease. *Heart* **2002**;87:559-65.
223. Duarte-Neto AN, Caldini EG, Gomes-Gouvêa MS, et al. An autopsy study of the spectrum of severe COVID-19 in children: From SARS to different phenotypes of MIS-C. *EClinicalMedicine* **2021**;35: 100850.
224. Vella LA, Rowley AH. Current insights into the pathophysiology of multisystem inflammatory syndrome in children. *Current Pediatrics Reports* **2021**;9: 83-92.
225. Muniz JC, Dummer K, Gauvreau K, et al. Coronary artery dimensions in febrile children without Kawasaki disease. *Circulation: Cardiovascular Imaging* **2013**;6:239-44.
226. Binstadt BA, Levine JC, Nigrovic PA, et al. Coronary artery dilation among patients presenting with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Pediatrics* **2005**;116:e89-93.
227. Shabo I, Svanvik J, Lindström A, et al. Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis. *World Journal of Clinical Oncology* **2020**;11:121.