

Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19)

Benedetto Morelli¹, Barbara Montaruli², Mario Bazzan³, Paola Calzoni⁴, Paolo Fassina⁵, Paola Pradella⁶, per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi¹

¹Synlab Castenedolo, Castenedolo (BS)

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

³CMID, Centro Malattie Rare, San Giovanni Bosco, Torino

⁴Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, ULSS7 Pedemontana, Santorso, Vicenza

⁶Servizio di Medicina Trasmfusionale, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste

ABSTRACT

Alterations of hemostasis during SARS-CoV-2 infection (COVID-19).

The corona virus infection (named COVID-19), first identified in December 2019 in Wuhan, China, has contributed to significant mortality in several countries with the number of infected cases increasing exponentially worldwide, in particular in Italy and in the USA. The majority of the most severely ill patients initially presents with single organ failure (i.e. severe respiratory syndrome), but some of them progress to more systemic disease and multiple organ failure (MOF). One of the most significant poor prognostic features in these patients is the development of coagulopathy, similarly to patients who develop sepsis from various infectious agents. Coagulopathy in patients with COVID-19 may be asymptomatic but, in some cases, the septic state may evolve into Sepsis-Induced Coagulopathy (SIC) and overt Disseminated Intravascular Coagulopathy (DIC). In patients with severe clinical manifestations, a cytokine storm occurs that contributes to triggering a greater imbalance of the hemostatic mechanisms by promoting the development of microthrombosis at the level of the pulmonary endothelium. The effectiveness of anticoagulant therapies, performed primarily with low-molecular weight heparin, is greater the earlier the diagnosis is made. This is possible through the adoption of diagnostic protocols that include laboratory tests and clinical scores. The laboratory tests suggested for this purpose by the available Guidelines are prothrombin time, platelet count, D-dimer and fibrinogen. D-dimer appears to be the parameter with the greatest prognostic significance since it also allows a stratification of the thrombotic risk.

INTRODUZIONE

Dai primi mesi del 2020 il Servizio Sanitario Nazionale italiano è stato messo a dura prova dall'arrivo di COVID-19, una malattia infettiva virale proveniente dalla Cina che sta mietendo numerose vittime a causa della sua elevata contagiosità e mortalità [10 volte più letale della influenza, secondo i dati recenti comunicati dalla organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)]. La malattia si è diffusa con grande velocità anche negli altri paesi europei e nel resto del mondo (negli Stati Uniti in particolare), ed ha costretto l'OMS a dichiarare lo stato di

pandemia l'11 marzo 2020. Dal sito dell'OMS risultano al 13 maggio 2020 oltre 4 milioni di persone contagiate ed oltre 280 000 decessi (1). La malattia prende il nome di COVID-19 dall'acronimo inglese COronaVirus Disease 19 ed è anche definita malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). L'intero spettro della malattia comprende quattro fasi a seconda della gravità clinica: lieve, moderata, grave e critica. Il più grande studio epidemiologico condotto in Cina ha mostrato che tra 44 672 casi confermati, l'80,9% presentava polmonite lieve o moderata, il 13,8% grave, il 4,7% critica. Il tasso

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Synlab Castenedolo, via Beato L. Pavoni 18 – 25014 – Castenedolo (BS) Tel 3407912302, E-mail benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 16.04.2020

Revisionato: 17.04.2020

Accettato: 15.05.2020

Pubblicato on-line: 01.06.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.056

di letalità per i pazienti critici è stato del 49%, con pazienti con comorbidità (malattie cardiovascolari, diabete, malattie respiratorie croniche, ipertensione, neoplasie) con tassi più elevati (10,5%, 7,3%, 6,5%, 6,0%, 5,6% rispettivamente) rispetto a quelli senza comorbidità (0,9%) (2). Il tempo mediano dal primo sintomo alla dispnea è stato di 5,0 giorni, al ricovero in ospedale di 7,0 giorni e all' Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) di 8,0 giorni: questo significa che purtroppo la malattia può progredire rapidamente da moderata a grave o critica e quindi devono essere rapidamente prescritti gli esami diagnostici e le terapie conseguenti.

Il COVID-19, analogamente ad altri agenti infettivi, è in grado di indurre nell'organismo contagiato uno stato di sepsi che determina l'insorgenza della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS) come risposta all'invasione di tessuti, fluidi o cavità corporee normalmente sterili. Le complesse interazioni tra il microrganismo infettante, il sistema immunitario dell'ospite, le risposte infiammatorie e la coagulazione influenzano l'esito nella sepsi (3). La sepsi, malgrado sia meno nota, ha un tasso di mortalità cinque volte superiore all'ictus e dieci volte superiore all'infarto (4). La diagnosi tempestiva è fondamentale per la gestione della sepsi, come l'inizio di una corretta terapia precoce è fondamentale per ridurre la mortalità da sepsi grave (5).

Molti organi vengono interessati dalle complicanze della malattia, in particolare i pazienti con COVID-19 grave e critica possono presentare grave compromissione polmonare con ARDS, (67%), insufficienza renale acuta (29%), insufficienza cardiaca (23%) e disfunzione epatica (29%) (6). Non esiste a tutt'oggi un unico protocollo terapeutico per i pazienti affetti da COVID-19, ma si fa sempre più spesso ricorso alla combinazione di diverse terapie indirizzate al contenimento dell'infezione e dei suoi effetti. In particolare, nei pazienti con COVID-19 vengono utilizzati farmaci antivirali come lopinavir e ritonavir (già in uso contro l'HIV), darunavir e remdesivir (già in uso per altri coronavirus) (7), farmaci antimalarici come cloroquina e idrossicloroquina (8), antibiotici (azitromicina) (9), anticorpi monoclonali anti-IL-6 come tolicilizumab, sarilumab e siltixumab (10), anticorpi monoclonali anti-C5-convertasi (eculizumab) (11), anticoagulanti come l'eparina a basso molecolare o l'eparina standard (12). È inoltre da poco stata sperimentata con successo la terapia che utilizza il plasma iperimmune di soggetti guariti dal COVID-19 che hanno sviluppato anticorpi contro il SARS-CoV-2 (13).

Dalla compromissione degli organi coinvolti derivano alterazioni di grado diverso di molti esami di laboratorio (14). In una recente metanalisi Lippi et al. (15) hanno analizzato i dati di 8 studi cinesi riscontrando che i parametri maggiormente alterati nei pazienti con prognosi sfavorevole sono: il conteggio dei leucociti, dei granulociti neutrofili e dei linfociti, l'albumina sierica, la lattato deidrogenasi, le transaminasi (sia alanina che

aspartato amino transferasi), la bilirubina, la creatinina, la troponina cardiaca, il D-dimero, il tempo di protrombina (PT), la procalcitonina (PCT) e la proteina C reattiva (PCR). Ancora più recentemente Favaloro et al. (16) raccomandano dei profili minimi di esami di tipo ematologico e biochimico da eseguire nei pazienti con COVID-19 per il monitoraggio prognostico della malattia.

ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI IN CORSO DI COVID-19

Molti pazienti affetti da COVID-19, soprattutto quelli con manifestazioni più gravi, presentano alterazioni a carico di tutte le componenti del sistema emostatico (endotelio, piastrine, coagulazione plasmatica e fibrinolisi); ne deriva una coagulopatia che, come in altri stati settici, può progredire da semplice alterazione asintomatica dei parametri della coagulazione ad uno stato di Sepsis Induced Coagulopathy (SIC) (17) sino ad arrivare alla coagulazione intravascolare disseminata (DIC) con un significativo aumento della mortalità (Figura 1).

Endotelio

L'endotelio, insieme alle componenti corpuscolate del sangue (leucociti, eritrociti e piastrine), svolge un ruolo fondamentale nella formazione di trombi in combinazione con l'attivazione del sistema della coagulazione e una delle caratteristiche tipiche della DIC associata alla sepsi è la lesione endoteliale (18); il danno endoteliale causato dal virus provoca un rilascio transitorio dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), seguito da una sovraregolazione immediata della produzione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), che contribuisce alla massiccia deposizione di fibrina nel microcircolo (19,20). Oltre ai cambiamenti nella funzione fibrinolitica, si verificano effetti protrombotici dovuti a disfunzione endoteliale causata dalla riduzione del rilascio di ossido nitrico e prostaciclina, e incrementata espressione del fattore tissutale (TF) e del fattore di von Willebrand (VWF) e perdita del glicocalice (19). Il glicocalice è lo strato sottile gelatinoso che copre l'endotelio vascolare ed è un importante bersaglio di infezione e infiammazione (21). Il glicocalice è composto da proteoglicani, glicosaminoglicani e proteine plasmatiche come albumina e antitrombina. L'attività antitrombotica dell'antitrombina è significativamente aumentata per effetto del legame alle catene laterali di eparansolfato del glicocalice e la stabilità del glicocalice è aumentata dal legame dell'antitrombina per mantenere l'omeostasi vascolare (22,23). Durante la sepsi, i componenti del glicocalice vengono eliminati nel sangue e rappresentano biomarcatori clinicamente rilevanti: si ritiene quindi che la perdita del glicocalice contribuisca alla disfunzione del microcircolo (24).

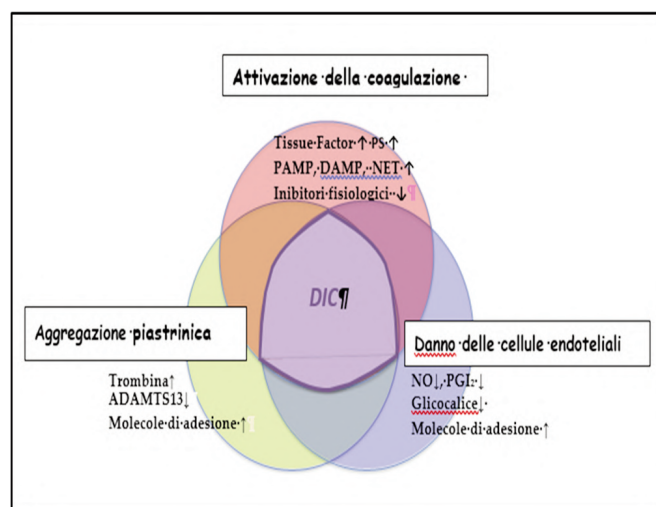


Figura 1

Meccanismi patogenetici della Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC)

ADAMTS-13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns; NET, Neutrophil Extracellular Traps; NO, Ossido Nitrico; PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns; PGI2, Prostaglandina I2; PS, Fosfatidilserina.

Modificato da Iba T et al. *Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation* J Clin Med 2019; 8: 728.

Piastrine

Anche il conteggio delle piastrine rappresenta un parametro fondamentale nello studio della evoluzione della coagulopatia nel paziente con COVID-19; la trombocitopenia è uno dei parametri di laboratorio più importanti nella diagnostica delle complicanze emostatiche perché la diminuzione delle piastrine si verifica virtualmente in tutti i pazienti con DIC. Il numero delle piastrine nella sepsi è influenzata da molteplici fattori. Nonostante l'aumento dei livelli di trombopoietina, la produzione di piastrine nel midollo osseo è spesso soppressa a causa degli effetti delle tossine patogene e dei mediatori infiammatori. Nella sepsi si verifica l'attivazione piastrinica che contribuisce alla diminuzione del loro numero, alla generazione di trombina, all'infiammazione e alla secrezione del fattore di von Willebrandt (VWF) (25). Le piastrine sono anche attivate da trombina e da mediatori dell'infiammazione incluso il complemento e partecipano attivamente alla patogenesi della DIC associata alla sepsi. La trombina induce attivazione piastrinica mediante scissione dei Protease-Activated Receptors (PAR) espressi sulle piastrine rilasciando il contenuto dei granuli piastrinici (in particolare ADP e serotonina) (26). L'attivazione piastrinica attraverso l'attivazione del recettore PAR è anche associata alla generazione di trombina A2 e al rilascio di una vasta gamma di citochine proinfiammatorie. Le piastrine rilasciano anche High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), uno dei principali Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP) della sepsi, il quale nella forma attivata svolge un ruolo critico nella trombosi, nel reclutamento dei monociti e nella produzione di Neutrophil Extracellular Traps (NET) (27).

Coagulazione plasmatica

Numerosi fattori sono in grado di attivare la coagulazione durante la sepsi; i Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) attivano le risposte infiammatorie attivando molteplici vie e i recettori che includono i Pattern-Recognizing Receptors (PRR), i DAMP, l'HMGB1, il DNA e gli istoni (28). Quando questi mediatori vengono rilasciati dai tessuti e dalle cellule danneggiate, possono iniziare l'infiammazione e la coagulopatia. Ulteriori mediatori umorali responsabili della coagulopatia includono citochine proinfiammatorie come interleuchina (IL) -1, IL-6, il Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), l'elastasi, la catepsina G e le proteine del sistema del complemento, come risposta sistemica nella sepsi (29). Inoltre anche i NET, costituiti da DNA, istoni e proteine granulari rilasciate da neutrofili attivati e da altri granulociti, sono implicati nella formazione di trombi (30,31). Ricerche recenti hanno anche dimostrato interazioni tra NET e vescicole extracellulari e vescicole extracellulari recanti NET che aumentano la generazione di trombina (32). Il fattore tissutale, l'iniziatore della via estrinseca della coagulazione, è espresso su macrofagi, monociti e cellule endoteliali e svolge un ruolo centrale nello sviluppo della coagulopatia e della DIC nella sepsi (33). A seguito di una lesione cellulare, il fattore tissutale espresso sulle vescicole extracellulari promuove ulteriormente le risposte procoagulanti (34). In sintesi, tutti questi mediatori infiammatori attivano la trombina come parte delle risposte di difesa dell'ospite che conduce alla Multi-Organ Failure (MOF) associata alla sepsi.

Anche gli inibitori fisiologici sono coinvolti nello sbilanciamento del sistema emostatico in senso

protrombotico. Tutti gli inibitori della coagulazione plasmatica (antitrombina, proteina C e proteina S) risultano ridotti in corso di coagulopatia correlata a Sepsis Induced Coagulopathy (SIC) o a DIC.

La trombina è un mediatore chiave della patogenesi della DIC associata alla sepsi e l'antitrombina è il più importante inibitore fisiologico della trombina (35,36). Si stima che l'antitrombina fornisca l'80% dell'attività inibitoria contro la trombina e altri fattori di coagulazione. L'antitrombina inibisce molteplici fattori della coagulazione, inclusi i fattori X, IX, VII, XI e XII (37). Tuttavia, i livelli di antitrombina sono noti per essere ridotti nella sepsi a causa del consumo, della sintesi alterata (specialmente nel sottogruppo di pazienti con epatite acuta ischemica associata a shock settico), stravasamento e degradazione da parte di elastasi rilasciata da neutrofili attivati. L'antitrombina esercita effetti antinfiammatori locali sulla superficie delle cellule endoteliali legandosi ai glicosaminoglicani. Come detto, l'endotelio vascolare sano è ricoperto da un glicocalice; se questo viene alterato a causa dei meccanismi instaurati dalla sepsi aumenta la trombogenicità dell'endotelio, aumenta la permeabilità capillare e l'adesione cellulare all'endotelio danneggiato (38).

L'antitrombina è parte integrante del glicocalice dove si lega ai glicosaminoglicani costituendo insieme ad essi una barriera fisiologica a difesa dell'endotelio stesso durante la sepsi (39); pertanto, il ruolo dell'antitrombina non è solo quello di inattivare la trombina, ma anche quello di mantenere una normale funzione endoteliale mediante il legame col glicocalice.

Un altro importante sistema anticoagulante è il sistema trombomodulina/proteina C/proteina S. In situazioni fisiologiche la proteina C viene attivata dalla trombomodulina sulla superficie endoteliale e la proteina C attivata esercita molteplici attività biologiche, tra cui effetti antitrombotici, citoprotettivi e antinfiammatori, per mantenere l'integrità vascolare (40). La proteina C attivata esercita attività antitrombotica attraverso l'inattivazione proteolitica dei fattori Va e VIIIa, e attività citoprotettiva sulle cellule endoteliali mediata da recettori come il recettore della proteina C endoteliale (EPCR) e il PAR-1. Queste molteplici attività si traducono in attività anti-apoptotica e anti-infiammatoria, regolazione dell'espressione genica e stabilizzazione della barriera endoteliale (41). La alterazione del sistema trombomodulina/proteina C nella sepsi è ben nota e il ridotto livello di proteina C è riconosciuto come un utile biomarcatore della sepsi grave. Analogamente all'antitrombina, i livelli di proteina C sono particolarmente bassi nei pazienti con epatite ischemica acuta (42) e i livelli di entrambe le proteine anticoagulanti sono stati segnalati come predittori significativi di mortalità (43). La trombomodulina è degradata proteoliticamente, viene staccata dalla superficie cellulare e circola in forma solubile. Livelli plasmatici aumentati di trombomodulina solubile sono stati riportati in pazienti con sepsi e disfunzione d'organo. Alcuni

autori ipotizzano che la trombomodulina circolante inibisca l'adesione dei leucociti all'endotelio perché il dominio della trombomodulina ricco di serina / treonina espresso sulle cellule endoteliali vascolari lega le integrine $\beta 2$ leucocitarie (LFA-1 e Mac-1) (44). Sebbene la trombomodulina solubile sia eliminata attraverso meccanismi renali, i livelli sono correlati alla gravità della disfunzione d'organo o del danno endoteliale e sono stati misurati per valutare la lesione endoteliale nella sepsi (45).

Fibrinolisi

La fibrinolisi è il componente finale del sistema emostatico ed ha il compito fondamentale di rimuovere la fibrina che si è generata attraverso l'azione combinata dell'emostasi primaria e della coagulazione plasmatica. Esistono profonde differenze nei meccanismi fibrinolitici che caratterizzano i vari tipi di DIC; oggi la classificazione della DIC anziché in compensata, scompensata o acuta viene meglio definita con una nuova terminologia in base alla minore o maggiore attivazione della fibrinolisi.

In base alla classificazione proposta da Asakura et al. (46) le DIC possono essere distinte in tre tipi:

- DIC con fibrinolisi ridotta
- DIC con fibrinolisi aumentata
- DIC con fibrinolisi bilanciata

Al primo tipo appartiene la DIC presente nel paziente con sepsi; la DIC con fibrinolisi aumentata si riscontra ad esempio nei pazienti con leucemia promielocitica acuta, nell'aneurisma dell'aorta, nel cancro della prostata; mentre la fibrinolisi bilanciata è presente nei pazienti con tumori solidi. Per comprendere i meccanismi che portano alla soppressione della fibrinolisi nella sepsi è opportuno ricordare il comportamento della fibrinolisi nel soggetto sano. L'enzima chiave della fibrinolisi è la plasmina la cui attività è regolata principalmente dall'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e dal suo inibitore, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1). Gli attivatori del plasminogeno convertono il plasminogeno in plasmina. Le cellule endoteliali vascolari partecipano alla modulazione della fibrinolisi discernendo sia il t-PA che il PAI-1. La disfunzione delle cellule endoteliali è una caratteristica essenziale nella patogenesi della DIC associata alla sepsi (47). Il marcato aumento del livello di PAI-1 porta al blocco della fibrinolisi e questo evento chiave rappresenta la caratteristica tipica della DIC di tipo trombotico che si presenta nel paziente con sepsi. Oltre alla massiccia formazione di coaguli, la fibrinolisi compromessa impedisce la rimozione della fibrina e porta a trombosi microvascolare sistemica (48). Ciò si verifica con l'arresto fibrinolitico indotto principalmente dalla sovrapproduzione di PAI-1. I livelli plasmatici di PAI-1 sono stati segnalati come predittivi della elevata gravità e della mortalità nei pazienti settici (49).

Un ulteriore importante meccanismo che determina un blocco della fibrinolisi nella DIC associata a sepsi è

rappresentato dalla diminuzione dell'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAFI). Il TAFI riduce la generazione di plasmina e la degradazione della fibrina rimuovendo il sito di legame al plasminogeno della fibrina degradata dopo l'attivazione da parte di trombina o plasmina. Contrariamente al PAI-1, i livelli di TAFI diminuiscono a causa dell'attivazione e del consumo estesi nella sepsi e, pertanto, possono avere un impatto minore rispetto al PAI-1 nella soppressione della fibrinolisi (50). Infine anche la riduzione dei livelli di plasminogeno può contribuire alla riduzione dell'attività fibrinolitica (51).

Evoluzione da coagulopatia a DIC

Tutti i meccanismi sopra descritti a carico delle componenti del sistema emostatico possono condurre il paziente con COVID-19 ad un netto peggioramento della prognosi; in questo caso gli interventi terapeutici mirati alla correzione della coagulopatia non sono nella maggior parte dei casi efficaci, sottolineando la necessità di intervenire in fasi precoci della DIC. A questo scopo il sottocomitato della International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) per la DIC ha proposto una nuova categoria di DIC definita SIC (17,52) con lo scopo di facilitare la diagnosi precoce di DIC e interventi potenzialmente più rapidi in questi pazienti critici.

Lo score ISTH per la DIC acuta prevede unicamente l'utilizzo di parametri di laboratorio facilmente disponibili (il conteggio piastrinico, PT, fibrinogeno, marcatori

specifici della degradazione plasminica della fibrina come FDP o D-dimero); ad ognuno di questi 4 parametri viene attribuito un punteggio, se la somma di questi punteggi è ≥ 5 il paziente ha una DIC acuta e questi stessi parametri dovranno poi essere ripetuti nel tempo per seguire il decorso della malattia e l'efficacia delle terapie instaurate (Tabella 1) (53-59).

Lo score SIC comprende solo 3 parametri di laboratorio (viene escluso il fibrinogeno) ma include il Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (60) che è un punteggio per la valutazione della disfunzione d'organo nei pazienti affetti da sepsi, e considera parametri inerenti i seguenti apparati/sistemi: respiratorio, emostasi, epatico, cardiovascolare, sistema nervoso centrale (SNC), renale (Tabella 1).

Per ogni parametro viene assegnato un punteggio variabile tra 0 e 4, la cui somma costituisce il SOFA score; questo valore è strettamente correlato alla mortalità:

- Per il sistema respiratorio il parametro considerato è il rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (dove PaO_2 è la tensione arteriosa dell'ossigeno misurata in mmHg e FiO_2 è la frazione di ossigeno nell'aria inspirata): questo rapporto si riduce quando il parenchima polmonare è danneggiato.
- Per l'emostasi si utilizza il conteggio delle piastrine con diversi punteggi, da 0 a 4 (la scala va da <20 a $\geq 150 \times 10^9/\text{L}$)
- Per il fegato si utilizza la bilirubina con diversi punteggi, da 0 a 4 a seconda del valore (la scala va da

Tabella 1

Criteri di punteggio per la diagnosi di Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC) e la Coagulopatia indotta dalla Seps (SIC)

Parametro	Punteggio	DIC acuta (criteri ISTH)	SIC
		Valore	Valore
Piastrine ($10^9/\text{L}$)	2	<50	<100
	1	≥ 50 ; <100	≥ 100 ; <150
D-dimero (FDP)	3	Forte incremento	-
	2	Moderato incremento	-
Tempo di protrombina (ratio)	2	$>1,4$	$>1,4$
	1	$>1,2$; $\leq 1,4$	$>1,2$; $\leq 1,4$
Fibrinogeno (g/L)	1,00	<100	-
SOFA score	2	-	≥ 2
	1	-	1
Score totale per DIC o SIC		≥ 5	≥ 4

Legenda: SOFA = Sequential Organ Failure Assessment

Modificata da "Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation", Iba T, et al. J Clin Med, 2019 (rif 17).

- <1,2 a >12,0 mg/dL)
- Per il sistema cardiovascolare si utilizza la pressione media arteriosa o la necessità di somministrare vasopressori.
 - Per il SNC viene utilizzato il "Glasgow Coma Scale" (61) che è una scala di valutazione neurologica utilizzata per seguire l'evoluzione clinica dello stato del paziente in coma; essa si basa su tre tipi di risposta agli stimoli (oculare, verbale e motoria) e si esprime sinteticamente con un numero che è la somma delle valutazioni delle tre funzioni.
 - Per la funzionalità renale si utilizza la creatinina con diversi punteggi, da 0 a 4 (la scala va da <1,2 a ≥5,0 mg/dL)

Nel SOFA score utilizzato per la SIC vengono utilizzati solo 4 sistemi: respiratorio, cardiovascolare, epatico e renale (risultano quindi esclusi il SOFA per l'SNC e per l'emostasi) (vedi Tabella 1).

Particolare attenzione deve essere rivolta al conteggio delle piastrine in quanto, oltre che nella SIC e nella DIC, una piastrinopenia può essere riscontrata in pazienti critici con microangiopatie trombotiche (MAT) e con Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT) di tipo 2, malattie gravi caratterizzate da manifestazioni trombotiche importanti.

RUOLO DEL LABORATORIO DI COAGULAZIONE NELLA GESTIONE DELLA COVID-19

Il decorso clinico della COVID-19 comprende 3 distinte fasi cliniche della malattia (62) (Figura 2).

Una fase iniziale durante la quale il virus si replica all'interno delle cellule dell'ospite (Infezione allo stadio iniziale - Stadio I).

La malattia può poi evolvere verso una seconda fase caratterizzata da alterazioni morfo-funzionali a livello polmonare causate sia dagli effetti diretti del virus sia dalla risposta immunitaria dell'ospite (Fase Polmonare - Stadio II). Questa fase è caratterizzata da un quadro di polmonite interstiziale molto spesso bilaterale associata ad una sintomatologia respiratoria che nella fase precoce è stabile e senza ipossiemia (IIA) ma può successivamente sfociare verso una progressiva instabilità clinica (IIB). I pazienti in questa fase hanno ipomobilità per l'allettamento e in questa fase l'eparina a basso peso molecolare (EBPM) dovrà essere utilizzata a dose profilattica allo scopo di prevenire il tromboembolismo venoso.

- La terza fase (Fase Iperinfiammatoria - Stadio III), fortunatamente limitata ad un numero molto più esiguo di pazienti, è caratterizzata da una tempesta citochinica e dal conseguente stato iperinfiammatorio che determina conseguenze locali e sistemiche e rappresenta un fattore prognostico negativo producendo, a livello polmonare, quadri di vasculopatia arteriosa e venosa con trombizzazione dei piccoli vasi ed evoluzione verso lesioni polmonari gravi. Le fasi finali di questo gravissimo quadro clinico portano ad una ARDS grave e in alcuni casi alla DIC. In tale fase si è osservata un'alterazione progressiva di alcuni parametri infiammatori quali PCR, ferritina, e citochine pro-infiammatorie (IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, TNF α ed altre) (63,64) e coagulativi, quali aumentati livelli dei frammenti di degradazione della fibrina come il D-dimero, consumo di fattori della coagulazione, trombocitopenia, allungamento del PT (65-68).

Mentre le scelte terapeutiche della prima fase e della seconda fase iniziale (IIA) devono mirare al contenimento della crescita virale, nella seconda fase

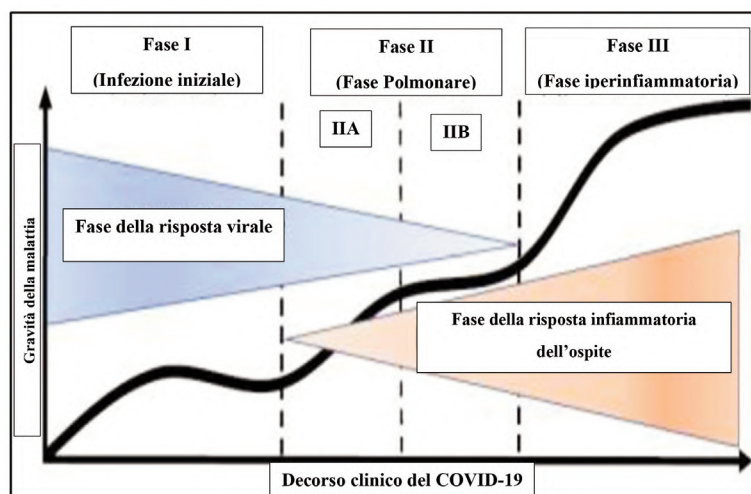


Figura 2

Decorso clinico del COVID-19

Modificato da Hasan K et Al. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant* 2020 (rif 62).

avanzata (IIB) e nella terza fase della malattia l'obiettivo è il contenimento dell'iperinfiammazione e delle sue conseguenze utilizzando farmaci che bloccano la cascata citochimica e la attivazione della coagulazione ricorrendo alle EBPM o all'eparina non frazionata a dosi terapeutiche, come da raccomandazioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) dell'11 aprile 2020 (69), della Federazione dei Centri per la diagnosi della trombosi e la Sorveglianza delle Terapie Antitrombotiche (FCSA) (70) e della Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi (SISSET) (71).

Le EBPM hanno dimostrato di possedere anche proprietà antinfiammatorie: infatti la frazione non anticoagulante della enoxaparina ha mostrato soppressione in vitro del rilascio di IL-6 e IL-8 da parte di cellule epiteliali polmonari umane (72). L'eparina possiede infatti, oltre all'azione anticoagulante, numerose funzioni immunomodulanti: inibizione dell'infiammazione, inibizione del reclutamento dei granulociti neutrofili, inibizione dei mediatori infiammatori indotti dai lipopolisaccaridi (LPS), inibizione della migrazione dei granulociti eosinofili. Inoltre, studi sperimentali in vitro ed in vivo hanno dimostrato che i coronavirus umani utilizzano proteoglicani con eparansolfato per legarsi alle cellule bersaglio (73). In effetti, è stata recentemente dimostrata l'interazione tra il dominio di legame del recettore della proteina Spike S1 SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 S1 RBD) e l'eparina suggerendo un ruolo per l'eparina nell'armamentario terapeutico contro il COVID-19 (74).

Va qui ricordato che particolare attenzione va posta nei confronti dei pazienti con COVID-19 che al momento dell'infezione erano già in terapia anticoagulante per varie indicazioni con anti-Vitamina K (AVK), coumadin e sintrom o con i Direct Oral AntiCoagulant (DOAC). In tali casi l'uso di terapie con antibiotici o con antivirali, interferisce con l'azione anticoagulante di questi farmaci ed è stato suggerito di sospendere DOAC e AVK e di

adottare una terapia con eparina (69).

Parametri dell'emostasi ed evoluzione della coagulopatia e mortalità

Tra i parametri di laboratorio più rilevanti per seguire l'evoluzione della coagulopatia presente nei pazienti affetti da COVID-19 risultano particolarmente utili:

- il conteggio piastrinico
- il PT
- il D-dimero

Come riportato in diversi studi, il D-dimero è il parametro che correla meglio con l'evoluzione clinica del paziente. In uno studio di Tang et al. (75) sono stati indagati 449 pazienti, di cui 99 (22,0%) avevano ricevuto un trattamento con eparina per almeno 7 giorni, 94 con EBPM (40-60 mg di enoxaparina/giorno) e 5 con eparina non frazionata (ENF) (10 000-140 000 U/ giorno). Fra questi pazienti, 97 (21,6%) soddisfano i criteri di SIC (punteggio totale ≥ 4) e sono stati classificati come casi gravi. Alla fine dello studio [a 28 giorni di monitoraggio, 315 pazienti (70,2%) erano sopravvissuti e 134 (29,8%) pazienti erano deceduti]. Nessuna differenza sulla mortalità a 28 giorni è stata riscontrata tra utilizzatori di eparina e non utilizzatori (30,3% versus 29,7%, $p=0,910$). Sono stati confrontati i risultati degli esami dell'emostasi tra sopravvissuti e non sopravvissuti, applicando un modello di regressione logistica multivariata per identificare un fattore di correlazione indipendente della mortalità a 28 giorni della COVID-19; è stata riscontrata significatività statistica ($p<0,001$) solo per il D-dimero, il PT e la conta piastrinica. È stata valutata l'associazione tra trattamento con eparina ed esiti in pazienti stratificati in base al punteggio SIC o al risultato del D-dimero (Figura 3). Il trattamento con eparina è stato associato a una mortalità inferiore nei pazienti con punteggio SIC ≥ 4 (40,0% versus 64,2%, $p=0,029$), rispetto a quelli con punteggio SIC <4 (29,0% versus 22,6%, $p=0,419$). Poiché i pazienti sono stati stratificati in base al risultato del D-dimero, la mortalità

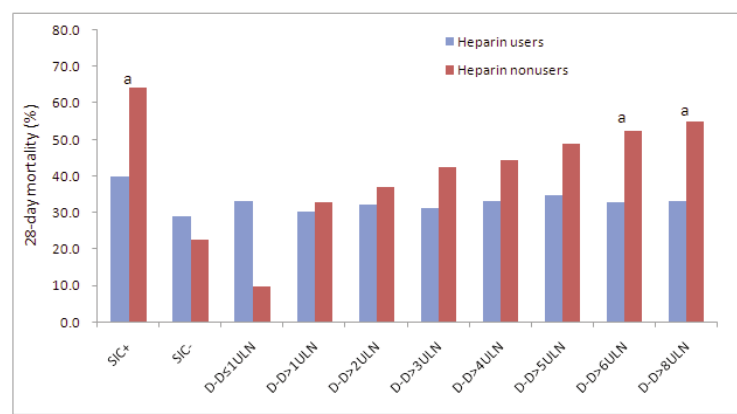


Figura 3

Relazione tra mortalità a 28 giorni, positività o negatività allo score SIC ($\geq 0 \leq 4$), e valori del D-dimero

Legenda: SIC = Sepsis-Induced Coagulopathy, ULN = Upper Limit of Normal ($<0,5$ mg/L)

Modificato da "Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy". Tang N, et al. J Thromb Haemost 2020 (rif 75).

nei pazienti in trattamento con eparina si è sostanzialmente mantenuta allo stesso livello, mentre nei non trattati con eparina, la mortalità è aumentata con l'aumento del D-dimero. Quando il D-dimero era superiore a 3,0 mg/L (6 volte il limite superiore del normale, 6 ULN - Upper Limit of Normal), è stata rilevata una riduzione approssimativa di circa il 20% della mortalità nei pazienti che ricevevano eparina (32,8% *versus* 52,4%, $p = 0,017$).

In uno studio di Huang et al. sono stati arruolati 41 pazienti con COVID-19, 13 ricoverati in terapia intensiva, 28 al di fuori della terapia intensiva: i livelli del D-dimero sono risultati più elevati nei pazienti in terapia intensiva con una mediana di 2,4 mg/L (intervallo 0,6-14,4) rispetto a 0,5 mg/L (intervallo 0,3-0,8, $p = 0,0042$) dei pazienti non in terapia intensiva (14).

In un altro studio di Wang et al. sono stati valutati 138 pazienti, 36 ricoverati in terapia intensiva e 102 no; i livelli del D-dimero al momento del ricovero erano più alti nei pazienti in terapia intensiva con una mediana di 0,41 mg/L (intervallo 0,19-1,32) rispetto a 0,17 mg/L (intervallo 0,10-0,28), $p < 0,001$ dei pazienti non in terapia intensiva (76). Il profilo dinamico dei risultati di laboratorio è stato monitorato in 33 pazienti (5 non sopravvissuti e 28 sopravvissuti), con un aumento delle concentrazioni del D-dimero più elevato nei non sopravvissuti rispetto ai sopravvissuti (76).

Ancora più numerosi sono stati i pazienti reclutati nello studio di Guan et al. che ha incluso 1099 pazienti; in questi pazienti è stata operata una distinzione in base al valore soglia del D-dimero ($\geq 0,5$ mg/L). Nei pazienti classificati come gravi, il D-dimero era elevato nel 59,6% dei casi (65 su 109) rispetto al 43,2% nei casi non gravi (195 su 451) (69). Nei pazienti che sono stati ricoverati nelle Unità di Terapia Intensiva per la necessità di ventilazione meccanica o che sono deceduti, i valori del D-dimero sono risultati elevati nel 69,4% dei casi (34 su 49) rispetto al 44,2% (226 su 511) degli altri pazienti (77).

Nello studio retrospettivo e multicentrico di Zhou et al. sono stati inclusi 191 pazienti: di questi, 137 sono stati dimessi e 54 sono morti in ospedale (78). I valori del D-dimero sono risultati più alti nei non sopravvissuti con una mediana di 5,2 mg/L (intervallo 1,5-21,1) rispetto a 0,6 mg/L (intervallo 0,3-1,0), $p < 0,0001$ dei sopravvissuti (70). Inoltre, lo studio ha esaminato la percentuale di pazienti con tre diversi intervalli di concentrazioni di D-dimero ($\leq 0,5$; da $>0,5$ a ≤ 1 ; e >1 mg/L). L'81% dei non sopravvissuti (44 su 54) aveva valori di D-dimero >1 mg/L rispetto al solo 24% dei sopravvissuti (28 su 118) (78).

Le modifiche temporali sono state monitorate per i marcatori di laboratorio dall'insorgenza della malattia e i valori mediani del D-dimero erano statisticamente diversi tra i sopravvissuti e i non sopravvissuti per ogni misurazione dopo il 4° giorno di malattia (giorni 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22) (70). L'evoluzione dei valori mediani del D-dimero nei sopravvissuti è rimasta relativamente stabile a partire da 0,3 mg/L al giorno 4 rispetto a 0,5 mg/L al giorno 22. Ciò è sorprendentemente diverso dai valori di D-dimero nei non sopravvissuti che si è evoluto

da 1,5 mg/L al giorno 4 rispetto a 42,2 mg/L al giorno 22 (78).

Inoltre, gli autori hanno voluto esplorare i fattori di rischio associati alla morte intra-ospedaliera, quindi hanno eseguito un modello di regressione logistica univariata e multivariata. Sono state scelte 5 variabili per l'analisi multivariata sulla base dei risultati di studi clinici precedenti. L'analisi multivariata ha confermato che le probabilità crescenti [OR = 20,04 (6,52-61,56) $p < 0,0001$] di morte in ospedale erano associate a livelli di D-dimero superiori a 1,0 mg/L al momento del ricovero. Nell'analisi multivariata, lo studio ha trovato probabilità crescenti [OR = 18,42 (2,64-128,55) $p = 0,0033$] di morte in ospedale associate a livelli di D-Dimero superiori a 1,0 mg/L al momento del ricovero (78).

Infine Thachil et al. coll. nella Linea Guida "ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19" (65) sottolineano l'utilità di impiegare 4 parametri dell'emostasi facilmente disponibili in tutti i laboratori, per il riconoscimento della coagulopatia: D-Dimero, PT, conteggio delle piastrine e fibrinogeno, elencati per ordine di importanza. Per il D-dimero viene altresì suggerito che un aumento di 3-4 volte al limite superiore di normalità può essere classificato come aumento marcato. In base a questo valore viene proposto un algoritmo suddividendo i pazienti in tre gruppi:

- Pazienti ad alto rischio che si presentano al momento del ricovero con D-dimero marcatamente aumentato, PT prolungato, piastrine $<100 \times 10^9/L$ e/o fibrinogeno $<2,0$ g/L. Questi pazienti devono essere monitorati con lo stesso pannello di esami quotidianamente o anche due volte al giorno.
- Pazienti ricoverati con D-dimero non marcatamente aumentato, PT normale, conteggio piastrinico normale e fibrinogeno elevato a causa di altre patologie devono essere monitorati quotidianamente con lo stesso pannello di esami.
- Pazienti non ricoverati con D-dimero non marcatamente elevato, PT normale, conteggio piastrinico normale e fibrinogeno elevato: questi dati potranno essere utilizzati in seguito se i pazienti presenteranno dei sintomi.

CONCLUSIONE

Alla luce degli studi sopra condotti è importante eseguire sui pazienti con COVID-19 in fase critica una serie di esami di coagulazione semplici e alla portata di tutti i laboratori per mettere in luce in maniera precoce alterazioni importanti a carico del sistema emostatico. Questi esami sono il PT, il conteggio delle piastrine, la determinazione del fibrinogeno e del D-dimero. E' importante porre particolare attenzione alla determinazione del D-dimero che deve essere ripetuto con cadenza diversa a seconda della gravità del quadro clinico del paziente (65). E' anche opportuno ricordare che un ulteriore contributo può essere richiesto al laboratorio di coagulazione nel caso in cui il paziente sia sottoposto a trattamento anticoagulante con EBPM; in

questo caso, oltre alla determinazione della creatinina, è necessario eseguire la misura con metodo cromogenico dell'attività anti-Xa (l'intervallo deve essere compreso tra 0,2-0,5 U anti-Xa/mL) in quanto una funzionalità renale alterata può portare ad accumulo del farmaco e quindi esporre il paziente ad un rischio emorragico importante. In alternativa si può utilizzare eparina non frazionata mantenendo un livello del tempo di tromboplastina parziale attivato ratio intorno a 1,5 (cercando di mantenere i livelli al limite superiore dell'intervallo raccomandato) (70).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano sentitamente la dott.ssa Nicoletta Erba, componente del Direttivo di FCSA, per il contributo fattivo alla stesura del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

- WHO Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (ultimo accesso: maggio 2020).
- Wang Y, Wang Y, Chen Y, et al. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol* doi: 10.1002/jmv.25748.
- Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:345-52.
- Busani S, Serafini G, Mantovani E, et al. Mortality in patients with septic shock by multidrug resistant bacteria: risk factors and impact of sepsis treatments. *J Intensive Care Med* 2019;34:48-54.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41:580-637.
- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumoniae in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395:507-13.
- Youseffard M, Zali A, Mohamed Ali K, et al. Antiviral therapy in management of COVID-19: a systematic review on current evidence. *Arch Acad Emerg Med* 2020;8:e45. eCollection2020.
- Ferner RE, Aronson JK. Chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19. *BMJ*. 2020;369:m1432.
- Seftel MD. Additional safety consideration for azithromycin in the management of SARS-CoV-2 infection. *CMAJ* 2020;192:E483.
- Zhao M. Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Apr 16:105982.
- Diurno F, Numis FG, Porta G, et al. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24:4040-7.
- Thachil J. The versatile heparin in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1020-1022.
- Chen L, Xiong J, Bao L, et al. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020;20:398-400.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506.
- Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Chim Chem Lab Med* 2020 pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0198/cclm-2020-0198.xml.
- Favaloro EJ, Lippi G. Recommendations for Minimal Laboratory Testing Panel in Patients with COVID-19: Potential for Prognostic Monitoring. *Semin Thromb Hemost* 2020 doi: 10.1055/s-0040-1709498.
- Iba T, Nisio MD, Levy JH, et al. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of a nationwide survey. *BMJ Open* 2017; 7(9):e017046. doi: 10.1136/bmjopen-2017-017046.
- Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: Roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost* 2018;16:231-241.
- López-Aguirre Y, Páramo JA. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb Res* 1999;94,95-101.
- Muth H, Maus U, Wygrecka M, et al. Pro- and antifibrinolytic properties of human pulmonary microvascular versus artery endothelial cells: Impact of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* 2004;32:217-226.
- Iba T, Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *J Thromb Haemost* 2019;17:283-294.
- Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF-α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2008;104,78-89.
- Bermejo-Martin JF, Martín-Fernández M, López-Mestanza C, et al. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J Clin Med* 2018;7(11) pii: E400. doi: 10.3390/jcm7110400.
- Nelson A, Berkestadt I, Schmidtchen A, et al. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: Relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 2008;30,623-627.
- Kitchens CS. Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC). *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 2009:240-6. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.240.
- Lopez E, Bermejo N, Berna-Erro A, et al. Relationship between calcium mobilization and platelet α- and δ-granule secretion. A role for TRPC6 in thrombin-evoked δ-granule exocytosis. *Arch Biochem Biophys* 2015;585,75-81.
- Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004;103,2096-2104.
- Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care* 2014;2(1), 67.
- Lupu F, Keshari RS, Lambris JD, et al. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res* 2014;133,S28-S31.
- Iba T, Miki T, Hashiguchi N, et al. Is the neutrophil a 'prima donna' in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care* 2014;18:230.

31. Liaw PC, Ito T, Iba T, et al. The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev* 2016;30,257–261.
32. Wang Y, Luo L, Braun OÖ, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci Rep* 2018;8,4020.
33. Østerud B, Bjørklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001;27,605–617.
34. Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care* 2018;6:68.
35. Iba T, Gando S, Thachil J. Anticoagulant therapy for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: The view from Japan. *J Thromb Haemost* 2014;12,1010–1019.
36. Levy JH, Sniecinski RM, Welsby IJ, et al. Antithrombin: Anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb Haemost* 2016;115,712–728.
37. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, et al. Antithrombin: A new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13,657–670.
38. Mehta D, Ravindran K, Kuebler WM. Novel regulators of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;307,L924–L935.
39. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009;83,388–396.
40. Griffin J.H, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: Biased for translation. *Blood* 2015;125,2898–2907.
41. Choi Q, Hong KH, Kim JE, et al. Changes in plasma levels of natural anticoagulants in disseminated intravascular coagulation: High prognostic value of antithrombin and protein C in patients with underlying sepsis or severe infection. *Ann Lab Med* 2014;34,85–91.
42. Warkentin TE. Microvascular thrombosis and ischaemic limb losses in critically ill patients. *Hamostaseologie* 2019;39,6–19.
43. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 2012;95,333–345.
44. Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, et al. Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;511,312–317.
45. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, et al. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002;30,S302–S312.
46. Asakura H, Takahashi H, Uchiyama T, et al for DIC subcommittee of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis. Proposal for new diagnostic criteria for DIC from the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis. *Thromb J* 2016;14:42.
47. Madoiwa S. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: Endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *J Intensive Care* 2015;3,8.
48. Semeraro N, Ammolio CT, Semeraro F, et al. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Re.* 2012;129,290–295.
49. Lorente L, Martín MM, Borreguero-León JM, et al. Sustained high plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Thromb Re.* 2014;134,182–186.
50. Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, et al. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res* 2006;118,205–212.
51. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Economou M, et al. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: Comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27,1853–1859.
52. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1989-94.
53. Wada H, Thachil J, Di Nisio M, et al. Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2013 Feb 4. doi: 10.1111/jth.12155.
54. Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327–30.
55. Levi M, Toh CH, Thachil J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2009; 145:24–33.
56. Di Nisio M, Baudo F, Cosmi B, et al, on behalf of the Italian Society for Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation: Guidelines of the Italian Society for Haemostasis and Thrombosis (SISST). *Thromb Res* 2012; 129: e177–84.
57. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016 Feb 23;315:775-87.
58. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al for Scientific and Standardization Committee on DIC, and the Scientific and Standardization Committee on Perioperative and Critical Care of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019 ;17:1989-1994.
59. Iba T, Di Nisio M, Levy JH, et al. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of a nationwide survey. *BMJ Open* 2017;7(9):e017046.
60. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine". *Intensive Care Med* 1996; 22:707–10.
61. Teasdale G, Jennett B (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale". *The Lancet* 1974;2(7872):81-4.
62. Hasan K et al. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant.* 2020 doi:10.1016/j.healun.2020.03.012.
63. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, et al. Interleukin-6 use in COVID-19 pneumonia related macrophage activation syndrome. *Autoimmunity Reviews.* In Press, Journal Pre-proof <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>.
64. Shimabukuro-Vornhagen A, Godel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 2018;15:6:56.
65. Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 doi:10.1111/JTH.14810.
66. Lippi G, Plebani M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections:

- A meta-analysis. Clin Chim Acta 2020 pii:S0009-8981(20)30124-8.
67. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumoniae. J Thromb Haemost 2020 doi: 10.1111/jth.14832.
 68. Lillicrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. J Thromb Haemost 2020;18:786-787.
 69. Dal Sito AIFA: Eparine a basso peso molecolare nei pazienti adulti con COVID-19. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19_sperimentazioni_in_corso_27.03.2020.pdf/b2391bac-7920-0945-51a1-66db453053cf.
 70. Dal Sito FCSA PROFILASSI DEL TROMBOEMBOLISMO VENOSO nei pazienti con infezione COVID-19 <http://www.fcsa.it/assets/files/FCSA%20COVID19%203.pdf>.
 71. Dal Sito Siset: De Candia E. COVID-19 ed Emostasi. http://www.siset.org/images/sisetonline/Siset_online_03-2020.pdf
 72. Shastri MD, Stewart N, Horne J, et al. In-vitro suppression of IL-6 and IL-8 release from human pulmonary epithelial cells by non-anticoagulant fraction of enoxaparin. PLoS One 2015;11;10(5): e01267638).
 73. Milewska A, Zarebski M, Nowak P, et al. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. J Virol 2014;88:13221-30.
 74. Mycroft-West C, Su D, Elli S, et al. The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971093>.
 75. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. J Thromb Haemost 2020;27. doi: 10.1111/jth.14817.
 76. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. JAMA;2020;323:1061-1069.
 77. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med 2020;1-13. doi:10.1056/nejmoa2002032
 78. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet. 2020;6736(20):1-9.