

Covid-19 e risposta immune

Tra debolezze in difesa ed errori in attacco

STEFANO VOLPI^{1,2}, SAMUELE NAVIGLIO³, ALBERTO TOMMASINI^{3,4}

¹IRCCS "G. Gaslini", Genova; ²Università di Genova; ³IRCCS Materno-Infantile "Burlo Garofolo", Trieste; ⁴Università di Trieste

Conoscere la fisiopatologia del Covid-19 per pensare a un migliore approccio terapeutico, focalizzato alle diverse fasi dell'infezione con particolare attenzione alle fasi precoci.

In questi giorni ci stiamo forse finalmente avvicinando al picco di contagiati relativamente all'epidemia da virus SARS-CoV-2, di cui si è parlato anche su *Medico e Bambino*^{1,3}. In questo periodo si sono accumulate grandi quantità di informazioni, talora raccolte in modo un po' frettoloso e di difficile interpretazione. Abbiamo per questo voluto fare il punto su quanto è noto a oggi sui rapporti tra virus e sistema immune e su come queste conoscenze possano aiutare a comprendere differenze di gravità dell'infezione, come ad esempio quelle correlate all'età, e come possano guidarci in un uso razionale delle terapie.

UN PO' PIÙ GRAVE DELL'INFLUENZA?

La letalità stimata in base a diverse osservazioni e modelli che non stiamo qui a riassumere oscilla dallo 0,5 al 3% circa, con valori in Italia che saranno più probabilmente tra l'1 e il 2%, *versus* quella intorno allo 0,1% dell'influenza. La variabilità dei dati diffusi dalla stampa in diversi Paesi è influenzata da una molteplicità di fattori: la percentuale di casi asintomatici e paucisintomatici, il numero di tamponi eseguiti, la modalità di attribuzione dei decessi all'infezione, la fase dell'epidemia e la densità di soggetti conta-

COVID-19 AND IMMUNE RESPONSE: WEAK DEFENCES AND SELF-HARMS

(*Medico e Bambino* 2020;39:Articolo in anteprima)

Key words

Covid-19, SARS-CoV-2, Immune repertoire, Haemophagocytic lymphohistiocytosis, Cytokine storm, Pneumonia

Summary

Covid-19 outbreak is about to reach the peak of infected people in Italy. Huge amount of data is being published on this epidemic in all medical journals, with especial concern on severe cases. Unfortunately, most reports are just descriptive and only a few controlled clinical trials are available to unravel the disease pathology and the best therapeutic option. For this reason, the aim of the present paper is to give an update on what is currently known about the immune response to the SARS-CoV-2 virus, focusing on the possible weakness of adaptive immunity and excesses of inflammation.

gianti, la distribuzione per età della popolazione esposta e la struttura sociale del Paese che determina quali età verranno esposte maggiormente (almeno all'inizio).

Guardando solo i contesti in cui la popolazione sia stata estesamente valutata nel suo complesso (navi da crociera, piccoli paesi come Vo' Euganeo e Nembro, o comunità come in Corea del Sud), si può stimare la letalità dell'infezione in Italia su valori dell'1-2% dei contagiati. Partendo da questo dato possiamo stimare indirettamente quanti soggetti siano stati finora colpiti dall'epidemia. Infatti, se consideriamo in base a un'ipotesi conservativa una letalità reale dell'1%, potremmo

stimare che ai circa 8mila decessi al 26 marzo corrisponderà una popolazione di circa 800mila soggetti contagiati. A questo punto avremo già pareggiato la mortalità dell'influenza (NB: la mortalità, diversamente dalla letalità, non è riferita ai soli contagiati, ma all'intera popolazione del Paese), e certamente la sopravviveremo nelle settimane successive, ma con circa un decimo di soggetti ammalati rispetto ai circa 8 milioni che si ammalano ogni anno di influenza. Un confronto tra i diversi virus, infine, non può non tenere in considerazione l'esistenza dell'immunità crociata tra i diversi virus influenzali degli anni precedenti, che non ci lascia quasi mai scoperti, e

soprattutto il ruolo che ha la vaccinazione nel proteggere le popolazioni a rischio. Inoltre, come vedremo più avanti, il fatto che l'infezione si associ tipicamente a polmonite richiede in genere un rilevante impegno di cure sanitarie, che come stiamo vedendo non è facile da garantire. Quindi, di fatto, il Covid-19, nella nostra popolazione, appare almeno in un ordine 10 più pericoloso dell'influenza e, se non bastasse, sembra anche essere un po' più contagioso (Figura 1)⁴. Ai casi letali dobbiamo aggiungere l'elevata percentuale di pazienti che richiedono cure intensive, nonché l'impatto indiretto su chi in questo periodo ne avrebbe necessità per altri motivi medici e se ne trova escluso. Quindi cercate di stare a casa.

COVID-19 E IMMUNOLOGIA

Fatte queste premesse, ci sono alcune domande che potrebbero beneficiarsi di una prospettiva di lettura immunologica:

1. Perché questa infezione è più grave dell'influenza?
2. Perché colpisce di più proporzionalmente all'età (dimentichiamoci la differenza tra bambini e adulti: il gradiente di letalità attraversa l'intero arco della vita)?
3. Come fa il pipistrello, che sembra costituire il serbatoio del virus, a non ammalarsi?
4. Perché nei casi più gravi vengono proposti farmaci reumatologici?
5. Ma è vero che ci si può riammalare?

Domanda #4. Perché nei casi più gravi vengono proposti farmaci reumatologici?

Cominciamo a tentare di rispondere partendo dalla quarta domanda con una considerazione storica: l'idea che le manifestazioni (febbre, rash ecc.) di alcune infezioni dipendano più dalla risposta immunitaria che dall'effetto citopatico del virus nasce poco più di un secolo fa, quando Von Pirquet, partendo dall'analogia clinica tra forme virali e la malattia da siero, introduce il concetto che a "*pathogenic agent causes signs of illness in the organism*

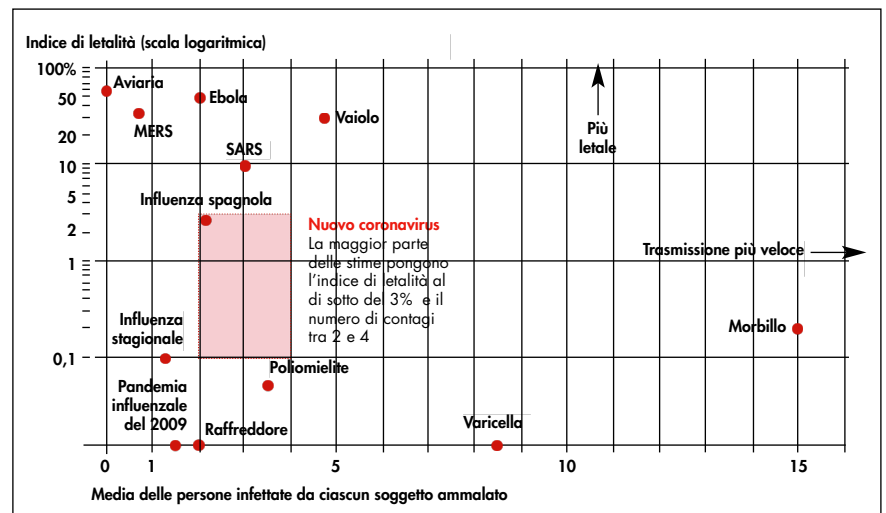


Figura 1. Rappresentazione grafica dell'impatto di diverse infezioni sulla base dell'indice di letalità (fatality rate, sulle ordinate) e dell'indice di contagiosità (numero medio di persone contagiate da ciascun soggetto affetto). Le stime correnti per Covid-19 pongono la letalità tra 0,7 e 3% e l'indice di contagiosità intorno a 2,5 (da voce bibliografica 4, modificata).

only when modified by the presence of antibodies; the incubation time is thus the time which elapses before the formation of antibody", e definisce come allergia una qualsiasi manifestazione patologica generata dal sistema immunitario nell'intento di rispondere a uno stimolo. Oggi, quando ci riferiamo a queste reazioni, parliamo più in generale di immunopatologia piuttosto che di allergia (che ha assunto un senso più limitativo). Inoltre, sappiamo che non sono solo gli anticorpi, ma anche le reazioni cellulari e la produzione di citochine a svolgere un ruolo nella genesi dei sintomi che accompagnano la risposta immune, talora con la produzione di significativi danni d'organo. In alcuni casi, infatti, la risposta è eccessiva, apparentemente iperimmune, tanto da condizionare il decorso della malattia ancor più dello stimolo originario.

C'è un altro punto storico che è opportuno ricordare, prima di procedere con l'analisi dell'immunità al SARS-CoV-2: negli ultimi 30 anni, attraverso lo studio di alcune immunodeficienze mendeliane, ci siamo resi conto, sempre meglio, che una iper-risposta del sistema immunitario, responsabile di autoimmunità o infiammazione, può essere in realtà la conseguenza di un difetto relativo di alcune componenti

o funzioni del sistema immune⁵. L'esempio più chiaro è quello dei difetti della funzione citotossica dei linfociti e delle cellule *natural killer*: in questi casi, il sistema immunitario tende a rispondere a infezioni virali con una iperattivazione vicaria di altri strumenti, tra cui citochine infiammatorie come gli interferoni, e varie citochine infiammatorie. La reazione che si produce prende il nome di linfocitosi emofagocitica (HLH)^{6,7}. Forse stiamo andando un po' fuori tema, ma quello che dobbiamo sapere è che in corso di una HLH può essere più importante (o almeno altrettanto importante) curare l'infiammazione rispetto all'infezione. Lo stesso vale per altri tipi di reazioni iperimmuni che possono accompagnare, e aggravare, infezioni di vario genere, che rientrano nell'ambito delle cosiddette sindromi infiammatorie iperferritinemiche (di cui l'HLH, ma anche la sepsi grave fanno parte)^{8,9}. Nel caso del Covid-19, tuttavia, si aggiunge a questo quadro sistemico il dato specifico dell'infiammazione polmonare potenzialmente severa di per sé, con tutto quello che ne consegue. La sfida che il medico ha davanti è quella di limitare i danni immunitari senza ostacolare la clearance del virus o meglio ancora facilitandola con farmaci antivirali.

La descrizione della reazione infiammatoria che accompagna l'aggravamento dell'infezione da Covid-19 richiama per molti aspetti le sindromi infiammatorie iperferritinemiche e per questo non ci deve stupire la proposta, nei casi gravi, di utilizzare farmaci reumatologici^{10,11}. Tuttavia, seppur si dimostrassero efficaci, resta da considerare che il numero dei pazienti gravi è talmente elevato da richiedere disponibilità di farmaci biologici in quantità difficilmente raggiungibili anche per un Paese quale l'Italia. Una risorsa terapeutica potenziale e diffusamente disponibile per trattare l'infiammazione è rappresentata dallo steroide, farmaco cardine per il trattamento delle sindromi iperferritinemiche e già utilizzato per le precedenti epidemie da SARS-CoV e MERS (*Middle-East Respiratory Syndrome*) con risultati clinici in alcuni casi incoraggianti ma con evidenza di aumento della carica virale^{12,13}. L'utilizzo è indicato nelle linee guida cinesi per questa epidemia da SARS-CoV-2. Tuttavia, la mancanza di *trial* clinici randomizzati nelle infezioni da coronavirus, il potenziale effetto sulla carica virale e la mancanza di chiare indicazioni sulla tempistica (il più presto possibile una volta instaurata la fase infiammatoria come nelle sindromi iperferritinemiche, piuttosto che tardivamente nella fase di tempesta citochinica una volta che il paziente è intubato?) e sul dosaggio (1-2 mg/kg? boli?) spiegano la reticenza al suo utilizzo, anche se i risultati di uno studio che descriveva una ampia casistica di SARS a Hong Kong suggerivano una buona risposta ai boli di cortisone, più evidente nei pazienti che avevano elevati valori di PCR¹⁴.

Reazioni di questo tipo sono state chiamate in causa anche per spiegare l'elevata mortalità di altre infezioni virali, come quelle sostenute dalle pandemie influenzali, dal Dengue virus e da Ebola^{15,18}. Fattori intrinseci all'agente infettivo (virulenza, elevata carica, diversità rispetto ad altri patogeni verso i quali potrebbe esserci memoria immunitaria) possono interagire con fattori propri dell'ospite (maturazione immune, assetto immunitario, varianti genetiche¹⁷, patologie concomitanti,

farmaci) favorendo solo in alcuni individui una reazione iper-infiammatoria, che altro non rappresenterebbe che la conseguenza di una relativa incapacità del sistema immunitario di dominare l'infezione sul nascere.

Fatte queste considerazioni, torniamo alle prime due domande, per capire come siamo arrivati a questo punto.

Domanda #1. Perché questa infezione è più grave di un'influenza?

L'elevata letalità del SARS-CoV-2 potrebbe essere spiegata in parte dall'assenza di una risposta protettiva crociata verso virus simili endemici (diversamente dall'influenza stagionale) e, ovviamente, dalla mancata disponibilità di un vaccino per proteggere i soggetti più vulnerabili. In effetti, un aumento di letalità è stato rilevato anche nelle pandemie influenzali che si sono succedute nel corso della Storia. Da notare che, in alcune di queste, l'età esposta al maggiore aumento di mortalità è stata quella dei giovani

adulti, di solito immune alle epidemie stagionali¹⁹ (*Tabella I*).

Sia per la spagnola (1918) sia per la "suina" (2009) la spiegazione è stata che i bambini hanno un sistema immunitario fatto per fronteggiare la novità più che sfruttare la memoria, mentre in entrambi i casi gli anziani avrebbero avuto una lontana memoria crociata verso virus simili che i giovani non avevano mai incontrato. Oltre a queste considerazioni, ci sono elementi che suggeriscono che questo virus possa essere anche intrinsecamente più insidioso di quelli delle pandemie influenzali, sia per il tropismo particolare che presenta verso le cellule alveolari, sia per la possibilità che abbia una diretta azione a discapito dei linfociti. Il *Box 1* riporta in dettaglio alcuni di questi aspetti²⁰⁻²⁷.

Domanda #2. Perché colpisce di più proporzionalmente all'età?

È bene sottolineare che la suscettibilità all'infezione mostra un gradien-

DECESSI DA PANDEMIA A(pH1N1) DEL 2009 IN USA SU 100.000 ABITANTI

Età (anni)	Decessi	
	Mediana (range) pH1N1	Media (range) dal 1990 al 1999
0-17	1,7 (1,2-2,5)	0,2 (0,03-0,4)
18-64	5,0 (3,6-7,3)	0,4 (0,07-1,0)
65+	4,2 (3,0-6,1)	22,1 (3,8-54,1)
Tutti	4,1 (2,9-6,0)	3,1 (0,5-7,6)

Tabella I. Dati paragonati con la media delle influenze stagionali degli anni precedenti. Da voce bibliografica 19, modificata.

Box 1 - FISIOPATOLOGIA DELL'INFEZIONE POLMONARE DA PARTE DEL SARS-CoV-2

La principale modalità di infezione cellulare da parte del SARS-CoV-2 è costituita dal legame ai recettori ACE2, abbondanti nelle cellule alveolari del polmone^{20,22}. Per questo motivo, l'infezione da SARS-CoV-2 è primariamente una polmonite, mentre i virus influenzali hanno un tropismo più diffuso con principale coinvolgimento delle vie aeree superiori. Inoltre, almeno per il precedente SARS-CoV è stata dimostrata la capacità di infettare monociti - macrofagi e cellule dendritiche, causandone l'attivazione con conseguente secrezione di citochine infiammatorie^{23,24}.

L'aggravamento clinico dell'infezione da Covid-19 è associato a riduzione della conta linfocitaria^{25,26}. È possibile che questo sia un effetto indiretto legato alla produzione di citochine antivirali, come accade in molti altri tipi di virus. Tuttavia, per il SARS-CoV-1, che ha un'elevata omologia con il SARS-CoV-2, è stato dimostrato la possibilità di un'infezione diretta dei linfociti²⁶. In questo senso, si è detto che il SARS-CoV-1 potrebbe situarsi a metà strada tra un comune virus respiratorio e un virus linfotropo come l'HIV.

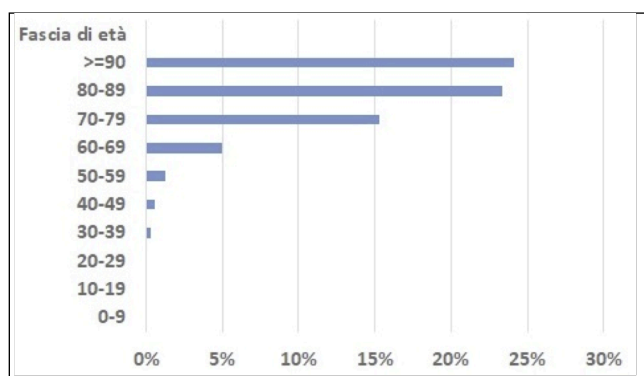


Figura 2. Letalità da Covid-19 in diverse fasce di età. Dati del 22 marzo 2020, fonte ISS Epicentro.

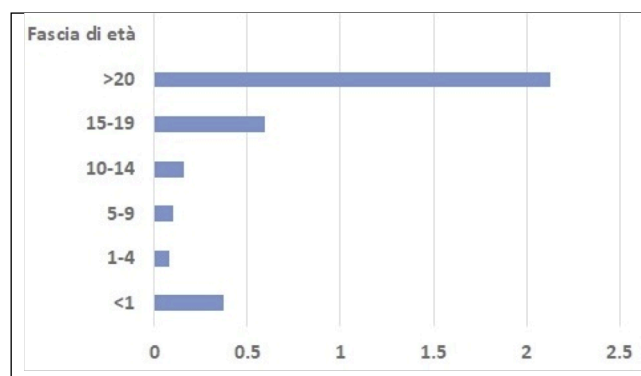


Figura 3. Letalità della varicella suddivisa per età in era pre-vaccinale (1990-1994). Da voce bibliografica 28, modificata.

te di letalità continuo in tutte le età (Figura 2). Non si tratta quindi di una diversità tra bambini e adulti, ma di un gradiente continuo in tutte le età dai primi anni alla quarta età.

In realtà, non è l'unico virus a mostrare questo comportamento. Anche la varicella, ad esempio, tolto il primo anno di vita, appare tanto più grave quanto più la si contrae in età adulta (anche se l'evento è reso relativamente raro grazie alla tendenza a sviluppare la malattia in giovane età e al ricorso sempre più diffuso alla vaccinazione) (Figura 3)²⁸. E lo stesso vale, come si è visto prima, per le pandemie con virus troppo nuovi per avere un'immunità crociata protettiva negli adulti¹⁹.

Per il Covid-19, sono state formulate diverse ipotesi per spiegare la minore suscettibilità dei bambini e l'andamento più benigno dell'infezione fino alla sua risoluzione:

- *I bambini hanno meno comorbidità e non fumano.* È certamente un motivo, ma sicuramente non l'unico e probabilmente non il principale. Si ritiene che il fumo incida sulla severità dell'infezione sia per il danneggiamento della funzione polmonare sia per l'effetto di induzione di una maggiore espressione del recettore ACE2, con la conseguenza dell'aumento della carica infettante le cellule alveolari²⁹.
- *I bambini potrebbero avere una minore densità dei recettori ACE2 nel polmone,* ma non sembra un'ipotesi confermata da evidenze.
- *Gli anziani presentano una risposta immunologica difettiva*³⁰ e una con-

dizione di infiammazione cronica sottostante che potrebbe spiegare la maggior suscettibilità all'infezione e la risposta infiammatoria non controllata³¹.

- *I bambini hanno un sistema immunitario innato* (neutrofili, linfociti NK, cellule plasmacitoidi dendritiche) che presenta una ridotta attivazione o funzionalità, probabilmente ciò è dovuto alla pressione selettiva che ha spinto verso un equilibrio tra ospite e parassita: nelle prime settimane e nei primi mesi di vita avviene la colonizzazione da parte dei miliardi di organismi simbiotici che contribuiscono a formare il microbiota, verso cui non dev'essere generata una risposta immune³². Tuttavia, questa condizione vale, come detto, per i primi mesi di vita quando i linfociti appaiono più polarizzati verso il sottotipo Th2, e non si prolunga per anni nell'età adulta.
- *I bambini rispetto agli adulti presentano percentuali maggiori di linfociti T e B regolatori*^{33,34} coinvolti nella tolleranza immunologica o in risposte immunitarie meno infiammatorie, ma di nuovo queste differenze valgono solo per le prime fasi della vita e non giustificerebbero il progressivo aumento del rischio presente anche nell'età adulta.

Queste ipotesi hanno tutte qualche base scientifica e qualche debolezza, anche perché forse rispondono al quesito sbagliato o a un quesito parziale: cosa condiziona che un sog-

getto abbia una fase di aggravamento con tempesta citochinica e un altro non la abbia, concentrandosi sulla reazione infiammatoria, ma perdendo di vista la cinetica del virus nelle sue prime fasi. Infatti, non bisogna dimenticare che, come dicevamo all'inizio per la domanda #4, la tempesta citochinica può essere la conseguenza di un precedente fallimento del sistema immunitario nel bloccare per tempo l'infezione. Dovremo quindi concentrarci sulla cinetica precoce dell'infezione, che purtroppo conosciamo molto poco nell'uomo, peggio rispetto alle fasi tardive complicate, che sono state studiate molto più assiduamente. Questo aspetto è stato recentemente analizzato in una *review* collaborativa italo-cinese³⁵.

Nella cinetica precoce, come in ogni infezione, ci sono tre fattori determinanti: la carica virale, l'immunità naturale e l'immunità adattativa, ovvero il numero di potenziali linfociti in grado di riconoscere il virus e bloccare l'infezione.

1. Carica virale. L'importanza della carica virale è suggerita dall'evidenza che i giovani deceduti appartenevano spesso a categorie esposte a un maggior carico infettivo (personale sanitario, impiegati di uffici in relazione con il pubblico ecc.). Qualcosa di simile accade anche per altre infezioni come ad esempio la tubercolosi³⁶. Come detto sopra, l'aumento di carica virale può essere favorito anche da una

maggior densità di recettore ACE2, riscontrata nel sesso maschile e nei fumatori²⁹. Perché sia importante la carica virale ha probabilmente a che fare con l'equilibrio nella risposta immunitaria adattativa che viene a crearsi da parte dell'organismo (vedi prossimo punto).

2. Attivazione dell'immunità naturale.

Per le infezioni virali, questa attivazione dipende principalmente dal riconoscimento degli acidi nucleici virali negli endosomi o nel citoplasma della cellula da particolari sensori, per lo più appartenenti alla famiglia dei *toll-like receptor*. Questa attivazione porta alla produzione di interferoni in tutte le cellule infettate e alla produzione di altre citochine infiammatorie nelle cellule del sistema immunitario. È stato dimostrato come uno dei meccanismi centrali della patogenesi delle forme gravi di SARS sia dipendente dall'intensità e dalla tempistica della risposta interferonica³⁷. Il virus produce diverse proteine che bloccano la risposta interferonica favorendo la propria sopravvivenza nell'organismo. Se la risposta immunitaria è efficiente e il virus viene comunque controllato nelle prime fasi, la risposta interferonica iniziale non raggiunge livelli dannosi. Se invece il virus non viene contenuto si determina un danno cellulare a carico degli pneumociti con conseguente massiccio rilascio di chemochine che prelude a un importante afflusso di cellule infiammatorie (neutrofili e soprattutto macrofagi) e a una risposta interferonica tardiva molto intensa che si accompagna alla forma grave di SARS. Tuttavia, è già stato sottolineato come almeno nei primi mesi di vita la funzionalità del sistema immunitario innato sia difettiva. Nonostante ciò non sono segnalati decorsi severi o fatali nei neonati infetti o nei lattanti, suggerendo che siano sufficienti bassi livelli di attivazione di questa linea di risposta immunitaria per promuovere l'organizzazione della successiva immunità adattativa.

3. Numero di potenziali linfociti anti-virali. La possibilità di rispondere ai più disparati antigeni mai incontrati in precedenza dipende dalla capacità da parte del sistema immunitario di generare una enorme varietà di recettori (recettori dei linfociti T e anticorpi), di espandere le cellule con i recettori più utili in seguito all'incontro dell'antigene e di conservarne memoria. Questo è un processo fortemente correlato con l'età. Più piccoli sono i bambini, più ampio è il loro repertorio di diversità dei recettori, maggiore la possibilità di trovare cloni utili a riconoscere antigeni mai visti (perché non c'è stato ancora il tempo di vederli). In un bambino piccolo, cambia poco che si tratti dell'influenza stagionale, della "suina" o del coronavirus. Dopo ciascuna di queste infezioni, il bambino aggiungerà un po' di cloni al suo repertorio di memoria pronti per un successivo incontro con l'antigene. Più va avanti l'età e più la risposta immunitaria si gioverà di questa memoria, perché in fondo i patogeni che girano nell'ambiente

si assomigliano tutti un po'. Il declino del repertorio non è ineluttabile, ma è l'altra faccia della medaglia della stimolazione da successive infezioni durante la vita ed è in qualche modo in equilibrio con queste³⁸. Tuttavia, il repertorio di recettori sufficiente per aggredire un patogeno nuovo per il sistema immunitario con rapidità (cioè prima che questo si sia riprodotto diffusamente) si riduce progressivamente. L'analisi dell'età media dei linfociti periferici nell'adulto mostra un progressivo invecchiamento di questi, descritto anche come immunosenescenza³⁹. Questo è probabilmente uno dei motivi per cui l'adulto è più suscettibile a sviluppare in modo grave la varicella, ove non l'abbia contratta in precedenza, e così altre infezioni a rapida evoluzione per cui non disponga di memoria. In effetti, la linfopenia CD4 (idiopatica, iatrogena o in HIV) è una nota condizione di suscettibilità a infezione grave da vari virus come la varicella e il *West Nile Disease virus*⁴⁰⁻⁴². Nel *Box 2* si riportano alcuni dei meccanismi presunti che stanno alla base

Box 2 - LINFOCITI A RECENTE DERIVAZIONE TIMICA COME INDICATORI DEL REPERTORIO LINFOCITARIO NELLE DIVERSE ETÀ IMPLICAZIONI PER LA RISPOSTA AL SARS-CoV-2

È possibile che similmente la maggior gravità nell'adulto di alcune pandemie influenzali (come la spagnola o la "suina") sia legata al fatto che virus con antigeni nuovi non danno modo al sistema immunitario di sfruttare il proprio repertorio di memoria, ma chiamano in causa la rapidità di selezionare e amplificare cellule vergini, o come si dice *naïve*. I correlati dell'ampio repertorio linfocitario *naïve* dei bambini sono costituiti dalle dimensioni timiche, che si riducono progressivamente nelle decadi successive o, a livello di cellule del sangue, dalla quota di linfociti con marcatori di recente differenziamento timico (RTE, identificabili attraverso metodiche di immunocitometria o di biologia molecolare)⁴³⁻⁴⁵. Moltiplicando la conta linfocitaria per la quota di linfociti RTE è possibile stimare, per quanto grossolanamente, che un bambino di 5 anni ha un repertorio 5-10 volte più ampio rispetto a un cinquantenne e più di 20 volte maggiore rispetto a un ottantenne: nella cinetica di un'infezione, avere un repertorio più ampio cui attingere significa arrivare, per espansione cellulare, ad avere una numerosità di cellule protettive con giorni di anticipo rispetto ai soggetti più anziani. Vuol dire, teoricamente, poter bloccare il virus prima che l'infezione sia diffusa. Anche il cinquantenne potrebbe essere ancora in grado di avere un rapporto vantaggioso, ma potremmo ipotizzare che questo non sia sufficiente nel caso che la carica virale sia stata particolarmente elevata (come sembrerebbe avvenire nelle categorie a rischio), perché la cinetica linfociti/virus sarebbe un fatto reciproco. Chi arriva prima vince. Tanto più che, direttamente o indirettamente, il virus si rende poi responsabile di una linfopenia in un circolo vizioso che vede la produzione vicariante di citochine infiammatorie. È interessante notare che nei casi a evoluzione grave è stata riscontrata un'aumentata percentuale dei linfociti T *naïve* verosimilmente sostenuta da un'aumentata produzione di IL-7, il che potrebbe sembrare in contrasto con quanto appena detto^{10,46}. Tuttavia, è possibile che l'effetto soppressivo del virus si sviluppi maggiormente sulle cellule memoria, conducendo a un tentativo di compenso immunitario con la produzione omeostatica di nuove cellule *naïve*.

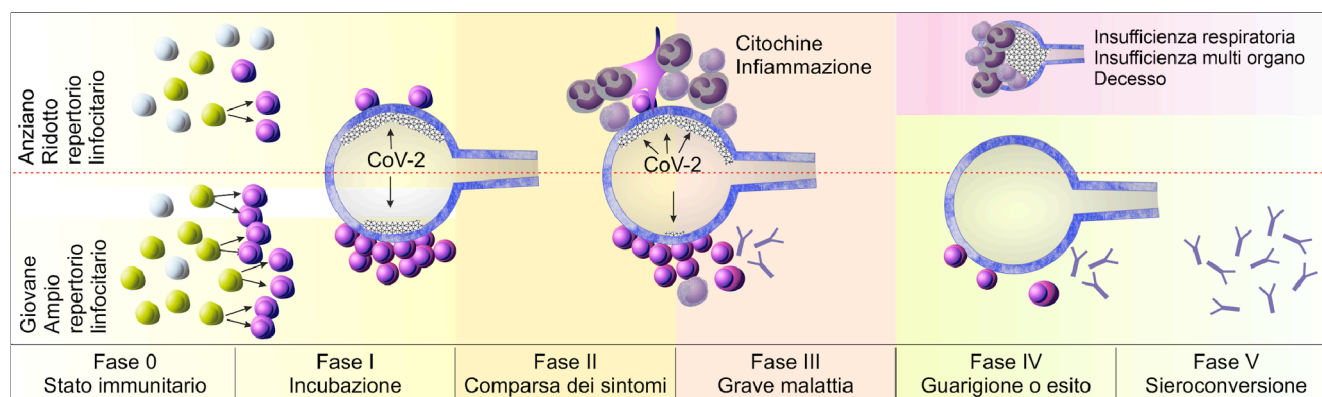


Figura 4. Modello di cinetica dell'infezione virale con diverso outcome in base al repertorio immunitario di partenza. Fase III: questa fase si manifesta con elementi di gravità solo in una minoranza di soggetti contagiati.

del presunto meccanismo virale che attiva l'ampio repertorio linfocitario *naïve* dei bambini⁴³⁻⁴⁶.

Il bilancio tra effetti antivirali della risposta immune e danno infiammatorio può diventare letale. Per questo vengono proposte terapie antinfiammatorie e, laddove il sistema immune può fare ormai poco, farmaci con possibile azione antivirale. La *Figura 4* schematizza un possibile modello della cinetica dell'infezione virale nel giovane e nell'anziano.

Questo modello, per quanto plausibile sulla base di dati scientifici diretti e analogie, non ha ancora una chiara conferma nella pratica, anche perché non esistono studi che abbiano valutato lo stato immune dei pazienti prima di ammalarsi.

In possibile parziale contrasto con questa ipotesi sembrano i dati preliminari secondo cui alcuni soggetti sottoposti a immunosoppressione in seguito a trapianto hanno contratto l'infezione con un decorso clinico banale⁴⁶. Si tratta tuttavia di soli 3 bambini di cui non sono specificate le caratteristiche in termini di età, farmaci assunti e stato immunitario. È possibile che i farmaci immunosoppressivi assunti non fossero sufficienti a contrastare gli effetti "protettivi" della giovane età. Esiste però anche la possibilità opposta: che questi pazienti siano stati avvantaggiati nella seconda fase dell'infezione, riducendo l'intensità della tempesta citochinica associata ad ARDS (*Acute Respiratory Distress Syn-*

drome), proprio grazie ai farmaci immunosoppressori (alcuni dei quali, come la ciclosporina, fanno parte del trattamento standard delle HLH).

A ogni modo, questa pandemia ci ha ricordato quanto il sistema immunitario si sia selezionato sotto spinte evolutive di milioni di anni per far sopravvivere il giovane fino circa all'età fertile, mentre l'invecchiamento, secondo la definizione di Hayflick⁴⁷, risulta essere ancora un "artefatto del progresso".

Domanda #3. Come fa il pipistrello, che sembra costituire il serbatoio del virus, a non ammalarsi?

Questa domanda non ha utilità solo naturalistica. Capire come il pipistrello affronta l'infezione senza soccombervi può essere utile a identificare strategie utili per trattare le forme più gravi nell'uomo.

Una peculiarità infatti dei pipistrelli è la capacità di fare da *reservoir* per diversi virus filogeneticamente molto simili a virus poi diventati endemici o pandemici nell'uomo. Tra questi vi sono il virus dell'influenza A⁴⁸, il virus Ebola⁴⁹ e i coronavirus SARS-CoV⁵⁰ e MERS⁵¹. Dati preliminari lasciano supporre che anche questo SARS-CoV2 sia derivato da un virus che infetta il pipistrello⁵². Ma cosa rende il pipistrello un ospite ideale per queste infezioni virali? E perché l'animale non ha la peggio? Sostanzialmente per la coesistenza di due condizioni. La prima è rappresentata dalla presenza di una risposta di tipo immunità innata, trami-

te la produzione di diversi interferoni, sebbene in misura minore rispetto all'uomo⁵³. Questa risposta innata "ridotta" è comunque sufficiente a mettere in moto l'immunità adattativa senza provocare tuttavia un eccesso di infiammazione. In tal modo l'infezione, pur durando più a lungo, può essere controllata senza un eccessivo danno infiammatorio. La seconda è rappresentata dalla minor infiammazione che accompagna queste infezioni virali. I meccanismi di questa mancata attivazione della cascata infiammatoria sono riportati nel *Box 3*⁵⁴⁻⁵⁷.

Domanda #5. Ma è vero che ci si può riammalare?

Questo aspetto appare al momento molto controverso. Da una parte ci sono alcune segnalazioni, per lo più dalla stampa, di pazienti risultati positivi a distanza di diversi giorni rispetto alla guarigione, definita come presenza di 2 tamponi negativi consecutivi. Tuttavia, è stato anche detto che questo potrebbe rappresentare un falso negativo dei tamponi precedenti (i tamponi infatti non sembrano possedere una sensibilità assoluta, anzi), oppure essere dovuti al fatto che i guariti clinicamente continuano a eliminare un po' di virus comunque dalle vie respiratorie per diverso tempo pur essendo di fatto guariti (segnalato anche un mese). I casi segnalati quindi non sarebbero delle vere reinfezioni. È vero anche, tuttavia, che i coronavirus in generale, ad esempio quelli associati al comune raffreddore, non sembrano

Box 3 - FATTORI IMMUNOLOGICI ASSOCIATI ALLA RIDOTTA VIRULENZA DEI VIRUS NEI PIPISTRELLI, PROBABILE SERBATOIO DEL SARS-CoV-2

È dovuta sostanzialmente alla ridotta attivazione delle vie di segnale a valle dei recettori per i nucleotidi virali, tra cui una ridotta attivazione della via dell'interferone di tipo I (interferone alfa e beta) dovuta a una mutazione della proteina STING⁵⁴, e a una ridotta attivazione dell'inflammasoma NLRP3 responsabile della secrezione di IL-1 β , una delle principali citochine infiammatorie⁵⁵. Infine, vi è una ridotta espressione della citochina TNF α a causa di una variante della regione del promotore del gene e una aumentata espressione sulle cellule NK di molecole inibitorie⁵⁶. Tutte queste caratteristiche fanno supporre che per diversi tipi di virus, tra cui i coronavirus, ciò che permette al pipistrello di sopravvivere un tempo sufficientemente lungo per controllare l'infezione sia di fatto una ridotta risposta infiammatoria del sistema immunitario, coerente con l'ipotesi che alcuni componenti chiave del sistema immunitario nei pipistrelli si siano coevoluiti con i virus verso uno stato di rispettiva tolleranza e avirulenza. Infine, ciò che potrebbe essere estremamente importante per la pandemia in corso, è la caratteristica dei SARS-CoV di attivare tramite una proteina virale direttamente NLRP3 e quindi la secrezione di IL-1 β , citochina chiave nello sviluppo di sindromi infiammatorie quali la sindrome da attivazione macrofagica⁵⁷.

dare un'immunità persistente, ma in questo caso il sistema immunitario potrebbe essere stimolato solo marginalmente data la superficialità dell'infezione. Di fatto, studi nei pazienti guariti dalla SARS hanno mostrato che l'infezione era associata alla comparsa di anticorpi contro la proteina spike necessaria per l'adesione del virus alle cellule, e che questi anticorpi erano protettivi. Purtroppo, questa risposta tendeva a ridursi dopo un anno. Viceversa la presenza di cellule T di memoria contro il virus è stata dimostrata fino a 6 anni dopo, e possono avere un ruolo protettivo importante, specialmente se residua una popolazione T mucosale specifica⁵⁸. Non è però possibile dire se questo sarà veramente protettivo nel tempo, non abbiamo dati. Di fatto potrà servire a pensare alle strategie per eventuali vaccini.

QUALI SONO LE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE?

I cardini della terapia sono certamente il supporto respiratorio e il controllo dei parametri vitali. È buona pratica, nei casi più gravi, aggiungere un trattamento antibiotico empirico per proteggere da sovrainfezioni batteriche.

Antivirali

Hanno lo scopo di bloccare la rapida e ovviamente deleteria replicazione virale. Possono essere analoghi di nucleotidi o inibitori delle proteasi. Alcuni

nomi che sono stati usati includono la ribavirina (non sembra avere una particolare efficacia, di fatto è stata usata poco), la combinazione lopinavir/ritonavir (parziale efficacia *in vitro* e un recente *trial* cinese mostra un scarso effetto clinico complessivo nei pazienti trattati)⁵⁹, remdesivir (ottima efficacia *in vitro*, in attesa di risultati dei *trial* clinici in corso)⁶⁰; favipiravir (farmaco giapponese per il quale sarebbero emersi dati, ancora poco controllati, di un'efficacia clinica). È in corso una sperimentazione clinica in Italia.

Pro: sono la più ovvia terapia causale, ma potrebbero avere un'efficacia limitata alle prime fasi della malattia, quando prevale il danno virale diretto.

Contro: potrebbero non agire sui meccanismi centrali della fase grave della malattia, che abbiamo visto essere in buona parte infiammatori.

Interferoni

Un difficile equilibrio. Sono molecole centrali della risposta immunitaria antivirale e come abbiamo visto potrebbero avere un effetto diverso a seconda della fase dell'infezione in cui vengono dati, da utile a peggiorativo³⁷. Di fatto, il loro utilizzo non pare aver dato grossi risultati visto che sembra fossero molto usati nell'epidemia cinese, specie per via inalatoria, ma non sembrerebbero essere stati riproposti.

Clorochina e idrossiclorochina

Farmaci antimalarici e immunomodulanti, potrebbero svolgere un'azione a diversi livelli. Modificano il pH

dei lisosomi cellulari e inibiscono la diffusione del virus, con un effetto antivirale diretto dimostrato *in vitro*, con maggior potenza soprattutto per l'idrossiclorochina⁶⁰. Inoltre, inibiscono l'azione degli interferoni e questo potrebbe aiutare la modulazione dell'eccesso di risposta che abbiamo visto essere implicato nella patogenesi delle forme gravi.

Pro: sono farmaci usati da lungo tempo, maneggevoli e con pochi e noti effetti collaterali. Finora abbiamo i solamente i risultati di due piccoli studi clinici, uno francese e uno cinese: il primo troverebbe un'efficacia del farmaco da solo o in associazione all'azitromicina (antibiotico dotato anche di un effetto antinfiammatorio polmonare - attenzione che entrambi allungano il QT) nel favorire la *clearance* del virus, mentre il secondo non mostrerebbe benefici dalla terapia.

Contro: non è chiaro se stiano veramente portando alla svolta terapeutica che è stata propagandata da alcuni. L'efficacia potrebbe essere maggiore nelle fasi iniziali ma non si può dire. Anche in altre infezioni virali era stato rilevato un effetto *in vitro* che non era seguito poi però da beneficio nel modello animale. È necessario valutarne l'effetto in *trial* controllati.

Giudizio: sospeso. Ma di fatto sono entrati nei protocolli di trattamento empirico di molti ospedali, da soli o in associazione ad azitromicina, per cui appare difficile non considerarli in un eventuale paziente reale. Senza robusti dati clinici tuttavia non si può dire niente.

Farmaci ad azione antinfiammatoria

Come abbiamo visto, una parte fondamentale della patogenesi della forma grave di Covid-19 è sostenuta da una iperattivazione dell'infiammazione in cui il virus svolge un ruolo che potrebbe essere non più centrale o addirittura in calo. I corticosteroidi possono essere di qualche efficacia in questi casi, ma non ci sono studi conclusivi in riguardo e c'è qualche preoccupazione riguardo al rischio che prolunghi il tempo di *clearance* virale, come avveniva anche se solo

MESSAGGI CHIAVE

- ❑ L'assenza di immunità crociata di memoria e il tropismo polmonare rendono il Covid-19 molto più grave di un'influenza stagionale.
- ❑ La fisiologica riduzione del repertorio immunitario con l'età è tra le cause associate a un peggior decorso nell'anziano.
- ❑ La valutazione della cinetica dell'infezione ci impone una maggiore attenzione alle fasi iniziali, quando potrebbero avere maggior efficacia l'avvio di un trattamento antivirale e forse anche antinfiammatorio (antimalarici, cortisone).
- ❑ Diversi farmaci, dal cortisone a farmaci biologici, possono avere un ruolo per bloccare la tempesta citochinica che accompagna l'aggravamento dell'infezione in alcuni soggetti.
- ❑ Sono tuttavia necessarie conferme sul versante terapeutico dalle diverse sperimentazioni cliniche in corso.

marginalmente nella SARS⁵⁰. Sempre nella SARS, l'esperienza di Hong Kong su un'ampia casistica mostra una migliore evoluzione per i soggetti trattati con boli di cortisone rispetto a quelli che ricevevano dosi standard¹⁴. Più recentemente, nei casi più gravi di Covid-19, la presenza di una tempesta citochinica ha portato all'utilizzo, e poi alla sperimentazione clinica, del tocilizumab, anticorpo monoclonale anti-IL-6 che è già stato utilizzato nelle *cytokine release syndrome* osservate, ad esempio nelle terapie cellulari con CAR-T per la leucemia. I risultati, stando almeno alle notizie della stampa, sarebbero favorevoli, tuttavia la sperimentazione è in corso (è stato anticipato un *report* con dati apparentemente molto buoni su un primo gruppo di 21 pazienti⁶¹). Di fatto vengono utilizzati nei pazienti tendenzialmente più gravi, anche se potrebbe essere invece più utile usarli in una fase un po' più precoce, quando il danno polmonare non è ancora troppo severo. Non è tuttavia l'unica via percorribile. È stato dimostrato per esempio che i topi *knockout* per il

recettore del TNF sono protetti dalla forma grave della malattia, e che la neutralizzazione del TNF *in vivo* risulta anche protettiva⁶². Questo potrebbe far pensare all'utilizzo di farmaci biologici come etanercept o infliximab. Similmente abbiamo visto che è stata descritta nei coronavirus un'attivazione dell'inflammosoma con rilascio di IL-1 β per cui anche l'utilizzo di farmaci anti-IL-1 come anakinra appare potenzialmente di interesse.

Un discorso a parte potrebbe meritare infine una modulazione multi-citochinica che includa anche la risposta interferonica. Gli inibitori Janus kinasi (JAK inibitori), usati anch'essi nelle patologie reumatologiche, potrebbero avere il vantaggio di bloccare contemporaneamente diverse citochine tra cui IL-6 e gli interferoni, anche se l'effetto di un'inibizione così ampia potrebbe essere di non facile previsione, forse non necessariamente favorevole⁶³.

CONCLUSIONI

Dobbiamo riconoscere che ci mancano ancora molti tasselli per comprendere approfonditamente la patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2. Futuri studi dovranno valutare l'intera cinetica dell'infezione per identificare i fattori associati alla progressione dell'infezione, all'effetto citopatico diretto del virus e al danno causato dall'intensa infiammazione polmonare. Comprendere questi fattori potrà aiutare a limitare i danni infiammatori, permettendo un'assistenza respiratoria adeguata finché la reazione immune e/o i farmaci antivirali non abbiano condotto alla *clearance* del virus. Nel corso del prossimo anno, si riuscirà forse a identificare qualche antivirale più efficace, anche sulla base della chimica computazionale, grazie alla recente descrizione della struttura molecolare di proteasi virali, e a sviluppare vaccini protettivi. Fino a quel momento, dobbiamo impegnarci a limitare quanto più possibile la diffusione del contagio e curare al meglio i malati.

Indirizzo per corrispondenza:

Alberto Tommasini

e-mail: alberto.tommasini@burlo.trieste.it

Bibliografia

1. Giacomet V, Stracuzzi M, Rubinacci V, Zuccotti GV. SARS-CoV-2: quali implicazioni nella popolazione pediatrica. *Medico e Bambino* 2020;39(2):93-7.
2. Marchetti F. La lezione del coronavirus. *Medico e Bambino* 2020;39(2):75-7.
3. Guiducci C, Marchetti F. Covid-19 e bambini: il punto dalla letteratura al 18 marzo. *Medico e Bambino* 2020;39(3):151-3.
4. Sheikh K, Watkins D, Wu J, Gröndahl M. How bad will the coronavirus outbreak get? Here are 6 key factors. *New York Times*, updated Feb. 28, 2020.
5. Notarangelo LD, Tommasini A. Defective and excessive immunities in pediatric diseases. *Curr Pharm Des* 2012;18(35):5729-34.
6. Sieni E, Cetica V, Aricò M. Linfocitopenia emofagocitica: una sfida diagnostica per il pediatra. *Medico e Bambino* 2012;31(1):21-9.
7. Zunica F, Settini F, Biondi A, Badolati R. Manifestazioni dell'infezione da virus di Epstein-Barr nel paziente con immunodeficit. *Medico e Bambino* 2019;38(3):163-9.
8. Schulert GS, Canna SW. Convergent pathways of the hyperferritinemic syndromes. *Int Immunol* 2018;30(5):195-203.
9. Lachmann G, Knaak K, Vorderwulbecke G, et al. Hyperferritinemia in critically ill patients. *Crit Care Med* Dec 24 [Epub ahead of print].
10. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020 Mar 12 [Epub ahead of print].
11. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020 Mar 16 [Epub ahead of print].
12. So LK, Lau AC, Yam LY, et al. Development of a standard treatment protocol for severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361(9369):1615-7.
13. Ho JC, Ooi GC, Mok TY, et al. High-dose pulse versus nonpulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(12):1449-56.
14. Sung JJ, Wu A, Joynt GM, et al. Severe acute respiratory syndrome: report of treatment and outcome after a major outbreak. *Thorax* 2004;59(5):414-20.
15. Kan FK, Tan CC, von Bahr Greenwood T, et al. Dengue infection complicated by hemophagocytic lymphohistiocytosis: Experiences from 180 severe dengue patients. *Clin Infect Dis* 2019;25(2):290-8.
16. McElroy AK, Shrivastava-Ranjan P,

- Harmon JR, et al. Macrophage activation marker soluble CD163 associated with fatal and severe Ebola virus disease in humans. *Emerg Infect Dis* 2019;25(2):290-8.
17. Schuler G, Zhang M, Fall N, et al. Whole-exome sequencing reveals mutations in genes linked to hemophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome in fatal cases of H1N1 influenza. *J Infect Dis* 2016;213(7):1180-8.
18. Lalueza A, Trujillo H, Laureiro J, et al. Impact of severe hematological abnormalities in the outcome of hospitalized patients with influenza virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36(10):1827-37.
19. Shrestha SS, Swardlow DL, Borse RH, et al. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009 - April 2010). *Clin Infect Dis* 2011; 52(Suppl 1):S75-82.
20. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426(6965):450-4.
21. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol* 2020;94(7).
22. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020 Mar 4 [Epub ahead of print].
23. Cheung CY, Poon LL, Ng IH, et al. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J Virol* 2005;79(12):7819-26.
24. Law HK, Cheung CY, Ng HY, et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 2005;106(7):2366-74.
25. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 2020 Feb 24 [Epub ahead of print].
26. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020 Mar 3 [Epub ahead of print].
27. Gu J, Gong E, Zhang B, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med* 2005;202(3):415-24.
28. Meyer PA, Seward JF, Jumaan AO, Wharton M. Varicella mortality: trends before vaccine licensure in the United States, 1970-1994. *J Infect Dis* 2000;182(2): 383-90.
29. Cai H. Sex difference and smoking predisposition in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med* 2020 Mar 11 [Epub ahead of print].
30. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009;22(11):1041-50.
31. Chung HY, Cesari M, Anton S, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8(1):18-30.
32. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* 2015;282(1821):20143085.
33. Mold JE, McCune JM. Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. *Adv Immunol* 2012;115:73-111.
34. Thome JJ, Bickham KL, Ohmura Y, et al. Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues. *Nat Med* 2016;22(1):72-7.
35. Shi Y, Wang Y, Shao C, et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ* 2020 Mar 23 [Epub ahead of print].
36. Cadena AM, Flynn JL, Fortune SM. The importance of first impressions: early events in Mycobacterium tuberculosis infection influence outcome. *mBio* 2016;7(2):e00342-16.
37. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, et al. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe* 2016;19(2):181-93.
38. Johnson PL, Goronzy JJ, Antia R. A population biological approach to understanding the maintenance and loss of the T-cell repertoire during aging. *Immunology* 2014;142(2): 167-75.
39. Mold JE, Reu P, Olin A, et al. Cell generation dynamics underlying naive T-cell homeostasis in adult humans. *PLoS Biol* 2019;17(10):e3000383.
40. Gupta M, Jardeleza MS, Kim I, Durand ML, Kim L, Lobo AM. Varicella zoster virus necrotizing retinitis in two patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Ocul Immunol Inflamm* 2016;24(5):544-8.
41. Hochauf K, Bandt D, Pohlmann C, Moncke S, Toma M, Trautmann S. Fatal varicella zoster virus infection as first manifestation of idiopathic CD4+ T-cell lymphocytopenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24 (10):706-8.
42. McBath A, Stafford R, Antony SJ. Idiopathic CD4 lymphopenia associated with neuroinvasive West Nile disease: case report and review of the literature. *J Infect Public Health* 2014;7(2):170-3.
43. Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J Immunol* 2002;168(10):4968-79.
44. Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol* 2007;37(11):3270-80.
45. Pinti M, Nasi M, Lugli E, et al. T cell homeostasis in centenarians: from the thymus to the periphery. *Curr Pharm Des* 2010;16 (6):597-603.
46. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395 (10223):497-506.
47. Hayflick L. The future of ageing. *Nature* 2000;408(6809):267-9.
48. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003657.
49. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005;438(7068):575-6.
50. Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005;310(5748):676-9.
51. Mohd HA, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virol J* 2016;13:87.
52. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RC. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 2020 Mar 17 [Epub ahead of print].
53. Pavlovich SS, Lovett SP, Koroleva G, et al. The Egyptian roussette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. *Cell* 2018;173(5):1098-110 e18.
54. Xie J, Li Y, Shen X, et al. Dampened STING-dependent interferon activation in bats. *Cell Host Microbe* 2018;23(3):297-301 e4.
55. Ahn M, Anderson DE, Zhang Q, et al. Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat Microbiol* 2019;4(5): 789-99.
56. Banerjee A, Rapin N, Bollinger T, Mirza V. Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor. *Sci Rep* 2017;7(1):2232.
57. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front Microbiol* 2019;10:50.
58. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res* 2014;59(1-3):118-28.
59. Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020 Mar 18 [Epub ahead of print].
60. Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* 2020;30(3):269-71.
61. Xu X, Han M, Li T, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *ChinaXiv* 5 marzo 2020. <http://www.chinaxiv.org/abs/202003.00026>.
62. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017;39(5):529-39.
63. Ritchie AJ, Singanayagam A. Immunosuppression for hyperinflammation in COVID-19: a double-edged sword? *Lancet* 2020; 1.