

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E
CHIRURGIA

Anno accademico 2019/2020

**Valutazione quantitativa degli esiti
cognitivi e comportamentali dopo
infezione da SARS-CoV-2**

**A quantitative study of long-term
cognitive and behavioral deficits in
patients with SARS-CoV-2**

Candidato: Pierumberto Mortola

Relatore: Prof. Matteo Pardini

Indice

- 1. Introduzione
- 2. NeuroCOVID: manifestazioni neurologiche dell'infezione da SARS-CoV-2
- 3. Possibili vie di invasione del sistema nervoso centrale da parte di SARS-CoV-2 e patogenesi delle manifestazioni neurologiche
- 4. Long-COVID: manifestazioni a lungo termine del COVID-19
- 5. Metodi
- 6. Risultati
- 7. Conclusioni
- Ringraziamenti
- Bibliografia

1. Introduzione

Nel dicembre 2019, è emersa a Wuhan, in Cina, una nuova infezione da coronavirus umano⁽¹⁾. A differenza dei precedenti coronavirus SARS-CoV-1 e MERS-CoV, che avevano avuto una diffusione ridotta, il nuovo SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-coronavirus type 2), agente eziologico del COVID-19 (coronavirus disease-2019), si è rapidamente diffuso in tutto il mondo fino a generare una vera e propria pandemia (dichiarata tale dall'OMS l'11 marzo 2020⁽²⁾).

L'epidemia, tuttora in corso, ha finora interessato più di 170.000.000 di persone, causando oltre 3.500.000 morti nel mondo⁽³⁾, principalmente per insufficienza respiratoria, con un tasso di letalità del 2% per quanto riguarda i casi ufficialmente noti e stimato attorno allo 0,68% se si considera la totalità dei soggetti infettati⁽⁴⁾.

Sembra che l'infezione da SARS-CoV-2 sia asintomatica o molto lieve in circa l'80% dei casi (soprattutto in bambini e giovani adulti), mentre nel 20% dei casi si presenti in maniera evidente e con diversi gradi di gravità⁽⁶⁾.

I coronavirus, che sono dotati di pericapside e sono piuttosto grandi (hanno un diametro approssimativo di 100 nm), devono il loro nome alla forma che presentano al microscopio elettronico, che ricorda una corona. Essi infettano varie specie animali e fanno parte della famiglia dei *Coronaviridae*, che contiene 4 distinti generi: Alfa-, Beta-, Gamma- e Delta-coronavirus.

Sono virus a RNA a singolo filamento positivo (Positive-strand RNA viruses)(+ssRNA) e hanno il più grande genoma di tutti i virus a RNA, circa 30 kilobasi. L'intera sequenza di SARS-CoV-2 è stata pubblicata il 7 gennaio 2020, rivelandolo essere un β -coronavirus, così come SARS-CoV-1, MERS-CoV e i coronavirus umani che causano circa il 15% delle naso-faringiti virali acute (il comunemente noto "raffreddore")^(5,6).

I coronavirus hanno già causato in passato delle epidemie. La prima, causata da SARS-CoV-1, scoppiò in Cina nel 2003 e colpì circa 8000 persone, con una mortalità del 10%. La seconda iniziò nel 2012 in Arabia Saudita, causata da MERS-CoV, che infettò 2500 persone con una mortalità del 35%⁽⁵⁾.

L'RNA di SARS-CoV-2 ha un'analogia dell'80% con SARS-CoV-1, ma del 96% con un coronavirus dei pipistrelli e del 92% con un coronavirus del pangolino, suggerendo la sua origine animale⁽⁵⁾.

SARS-CoV-2 entra nelle cellule ospiti grazie al legame della sua proteina spike col recettore cellulare ACE2 (angiotensin converting enzyme 2)(stesso recettore a cui si lega SARS-CoV-1) ed al successivo clivaggio proteolitico della stessa da parte della proteasi transmembrana TMPRSS2⁽⁵⁾.

ACE2 è abbondantemente espresso nelle cellule alveolari polmonari (tipo I e tipo II), ma anche in cellule presenti in altri tessuti tra cui il tratto digestivo (enterociti del piccolo intestino e cellule muscolari lisce di tutto il tratto), l'endotelio (arterioso e venoso), la corteccia cerebrale, il rene, le vie biliari, il testicolo e le ghiandole surrenali^(6,7).

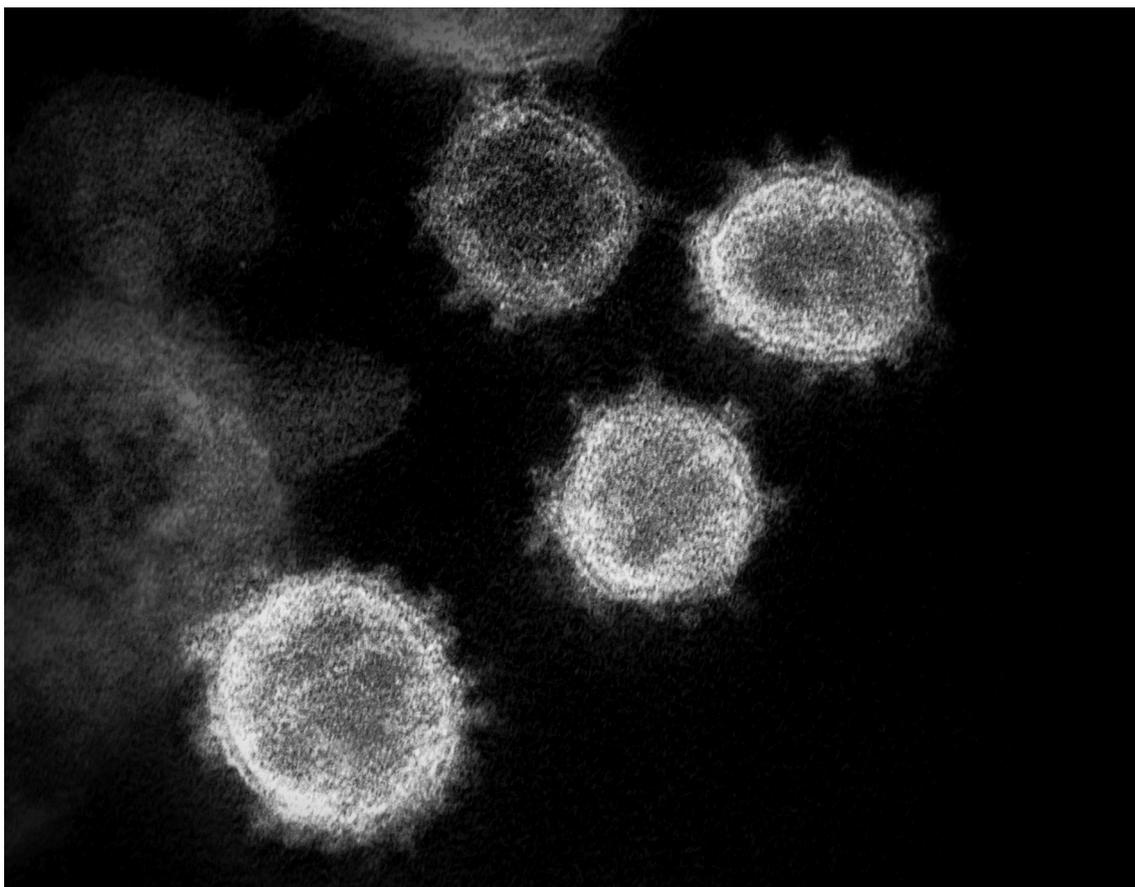


Fig. 1^(da75) *SARS-CoV-2 visto al microscopio elettronico.*

In questo scritto illustreremo le manifestazioni neurologiche dell'infezione da SARS-CoV-2, sia acute che a lungo termine, finora descritte in letteratura, concentrandoci anche sulla loro possibile patogenesi.

Mostreremo poi i risultati del nostro studio, volto a comprendere l'incidenza e la gravità percepita di astenia, depressione e deficit mnesici nei pazienti guariti dal COVID-19.

Nel nostro studio sono state analizzate due popolazioni: una composta da pazienti visitati in follow-up presso la pneumologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova e che non presentavano alterazioni neurologiche; l'altra formata da soggetti visitati anch'essi

presso la pneumologia e da qui inviati all'ambulatorio neurologico post-COVID-19 presso la clinica neurologica dello stesso ospedale, in quanto affetti da manifestazioni di interesse neurologico.

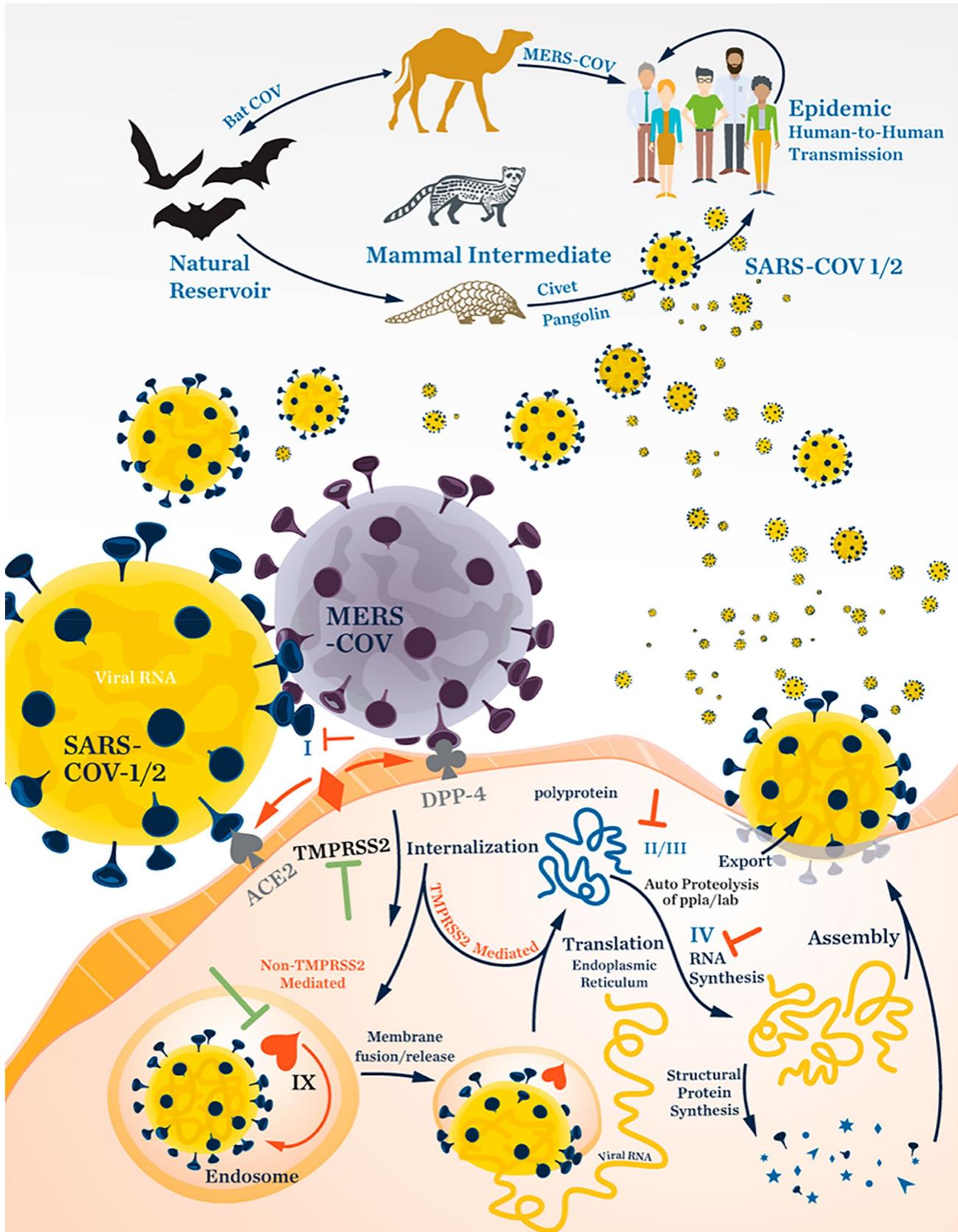


Fig.2^(da74) *Ciclo vitale dei coronavirus.*

2. NeuroCOVID: manifestazioni neurologiche dell'infezione da SARS-CoV-2^(6,8,9)

2.1. Evidenze da altri virus respiratori

Sia nella SARS che nella MERS sono state riportate manifestazioni neurologiche, anche se piuttosto rare: 1:1000 casi nella prima e 1:200 casi nella seconda.

Va detto però che il numero totale di pazienti colpiti da queste due malattie è stato fortunatamente molto basso (10.500 casi in totale) rispetto a COVID-19. Quindi, anche qualora tali manifestazioni dovessero essere percentualmente rare anche in quest'ultima, la scala dell'attuale pandemia ci fa pensare che possano riguardare un grande numero di persone.

L'esperienza, seppur limitata, con le manifestazioni neurologiche nei pazienti colpiti da questi coronavirus ci può fornire una cornice in cui inquadrare le manifestazioni neurologiche da SARS-CoV-2.

Nella SARS e nella MERS le manifestazioni neurologiche si possono dividere in tre categorie: (1) conseguenze neurologiche dell'associata malattia polmonare e sistemica, tra cui encefalopatia e ictus, (2) invasione diretta del sistema nervoso centrale (SNC) da parte del virus, tra cui l'encefalite, e (3) complicazioni post-infettive e potenzialmente immuno-mediate, tra cui la sindrome di Guillain-Barrè e sue varianti e la encefalomielite acuta disseminata (ADEM)⁽⁶⁾. Questi meccanismi sono stati proposti anche per SARS-CoV-2.

Anche il coronavirus umano OC43 (HCoV-OC43), un virus stagionale principalmente causa di infezioni delle vie aeree, è stato associato - seppur raramente - a manifestazioni neurologiche: due encefaliti in infanti immunodepressi (entrambe mortali)^(10,11) e un'ADEM in un ragazzo di 15 anni immunocompetente⁽¹²⁾.

Complicanze neurologiche sono state descritte anche per altri virus respiratori, in particolare quelli influenzali. Queste includono encefalopatia acuta necrotizzante, encefalopatia acuta infantile e leucoencefalopatia acuta emorragica⁽⁸⁾.

L'incidenza stimata di complicanze neurologiche durante la pandemia di influenza A H1N1 del 2009 è stata di 1-2 per 100.000, coi bambini più colpiti rispetto agli adulti⁽⁸⁾.

La pandemia influenzale del 1918 (la cosiddetta "spagnola") è stata associata (direttamente o indirettamente, per esempio come fattore favorente l'infezione da parte di un secondo virus sconosciuto) con l'encefalite letargica di Von Economo, anche se la correlazione causale non è mai stata dimostrata⁽¹³⁾.

2.2. Presentazioni cliniche

Nella review pubblicata a luglio 2020 sul Journal of Neurology⁽⁹⁾, Chen e colleghi hanno analizzato 92 studi riportanti casistiche di manifestazioni neurologiche del COVID-19.

Un'altra review riguardante le manifestazioni neurologiche del COVID-19 è stata prodotta da Ellul et al. e pubblicata sempre a luglio 2020 su Lancet Neurology⁽⁸⁾.

2.2.1 Manifestazioni neurologiche frequenti nel COVID-19

Cefalea e vertigini

Nella review di Chen et al. la cefalea è stata valutata in 51 studi, comprendenti 16.446 pazienti, ed è stata riportata nel 20,1% della popolazione studiata (oscillando dal 2 al 66,1%).

Le vertigini sono state valutate in 13 studi, comprendenti 2236 pazienti. Ne hanno sofferto il 7% dei pazienti (da 2,5 a 21,4%).

Alterazioni di olfatto e gusto

Alterazioni di olfatto e gusto sono state riportate in 6 studi tra quelli valutati nella review di Chen et al., comprendenti 906 e 846 pazienti rispettivamente.

La prima è stata riscontrata nel 59,2% dei casi, la seconda nel 50,8%.

Nel più grande di questi studi (Lechien et al; 417 pazienti), si sono riscontrate alterazioni dell'olfatto nell'85,6% dei pazienti e alterazioni del gusto nell'88,8%; nella maggior parte dei casi le alterazioni si sono manifestate dopo (65,4%) o in contemporanea (22,8%) ai sintomi riguardanti lo stato generale, l'orecchio, il naso o la gola.

Nonostante questi sintomi possano comparire in tutte le infezioni respiratorie, a causa di rinite e congestione nasale, il fatto che si presentino anche isolati suggerisce un coinvolgimento del nervo olfattorio.

Compromissione della coscienza

In tutto 9 studi con 2890 pazienti hanno valutato questa alterazione, che è stata osservata nel 5,1% dei casi valutati nella review di Chen et al.

Come ci si aspetterebbe, la compromissione della coscienza è stata più frequente nei pazienti gravi (11,9%) rispetto a quelli lievi-moderati (3,2%), così come nei deceduti (21,2%) rispetto ai guariti (1,1%).

Danno muscolare

Il danno muscolare (inteso come mialgie e aumento dei valori di creatin kinasi (CK) sopra le 200 U/L) è stato riportato in vari studi: un lavoro cinese⁽¹⁴⁾ svolto a Wuhan lo riporta in 23 pazienti su 214 (10,7%), con una prevalenza nei casi gravi rispetto ai non gravi (17 [19.3%] vs 6 [4.8%]; $P < 0,001$); un altro studio⁽¹⁵⁾, sempre cinese, mostra mialgie o artralgie in 164 pazienti su 1099 (14,9%) e un aumento della creatin kinasi in 90 su 657 (13,7%), entrambe più comuni nei casi gravi.

Uno studio austriaco⁽¹⁶⁾ riporta un aumento della CK nel 24% dei casi (84 pazienti su 351) notando valori maggiori nei casi gravi ed una correlazione positiva coi valori dei markers infiammatori. Alti valori di CK vengono riportati con frequenza simile anche in pazienti con influenza (notando però come in quest'ultima nei casi gravi i valori erano mediamente più alti rispetto al COVID-19).

Non è tuttora chiaro se l'aumento dei valori di CK sia causato da una risposta infiammatoria scatenata dal virus oppure da tossicità muscolare diretta.

Inoltre sono stati riportati rari casi (3 in tutto) di rhabdomiolisi: due con CK >10.000 U/l e uno con CK >8.000 U/l⁽¹⁶⁾.

2.2.2 Manifestazioni neurologiche rare del COVID-19

Complicazioni cerebrovascolari acute

La review di Chen et al. riporta due studi: eventi cerebrovascolari acuti sono stati riscontrati nel 2,8% dei casi (6 su 214 pazienti ospedalizzati) nello studio di Mao e colleghi; mentre nello studio di Li et al. sono stati individuati, tra 221 pazienti, 11 ictus ischemici, una trombosi dei seni cerebrali ed una emorragia cerebrale.

I pazienti che hanno sviluppato eventi cerebrovascolari acuti, rispetto agli altri, erano significativamente più anziani (71,6 vs. 52,1 anni), presentavano più spesso forme gravi di COVID-19 (84,6% vs 39,9%), fattori di rischio cardiovascolare come ipertensione (69,2% vs. 22,1%) e diabete (46,2% vs 12,0%), e precedenti episodi di patologie cerebrovascolari (23,1% vs 6,7%).

Ellul et al. riportano uno studio svolto a Milano (Lodigiani et al.) in cui nove pazienti su 388 (2,3%) hanno avuto un ictus ed uno studio olandese (Klok et al.) in cui tre pazienti su 184 ricoverati in terapia intensiva (2%) hanno avuto un ictus ischemico.

Questi pazienti erano in maggioranza sopra i 60 anni e con fattori di rischio cardiovascolare come diabete, ipertensione, iperlipidemia e precedenti patologie vascolari. Ciononostante sono stati descritti anche casi di eventi cerebrovascolari in pazienti più giovani: in un ospedale di New York sono stati ricoverati in due settimane 5 pazienti con meno di 50 anni (33, 37, 39, 44, 49 anni; una femmina e quattro maschi) con ictus ischemico e positivi a SARS-CoV-2, quando la media dei ricoveri per ictus di pazienti giovani nell'anno precedente era stata di 0,73/due settimane. Di questi, due non avevano altre manifestazioni di COVID-19; tre avevano anamnesi positiva per fattori di rischio cardiovascolare (diabete, ipertensione, iperlipidemia), di cui uno aveva già avuto un ictus (non specificato se ischemico o emorragico)⁽¹⁷⁾.

In tutti e cinque i casi sono stati coinvolti grossi vasi (carotide interna, arteria cerebrale media e arteria cerebrale posteriore).

Uno studio svolto in UK⁽¹⁸⁾ confrontando ictus in pazienti con (86) e senza (1384) COVID-19 riporta che nei primi gli ictus ischemici (decisamente più frequenti rispetto a quelli emorragici) erano più spesso a carico di grandi vasi (17,9% vs 8,1%, $p < 0,03$), più gravi (media NIHSS 8 vs 5, $p < 0,002$), nonché associati a livelli più alti di D-dimero ($p < 0,01$), a più grave disabilità alla dimissione (media mRS 4 vs 3, $p < 0,0001$) ed a maggiore mortalità

(19,8% vs 9,6%, $p < 0,0001$).

Convulsioni

Sembrano essere estremamente rare, con un solo caso con liquor positivo per SARS-CoV-2 riportato nella review di Chen et al.

Ellul et al. riportano nella loro review 7 casi di convulsioni in bambini: due senza sintomi respiratori, ma tampone nasofaringeo positivo per SARS-CoV-2; cinque facenti parte di una popolazione di 168 bambini ospedalizzati con COVID-19. Di questi ultimi, tre avevano una storia di epilessia preesistente e uno aveva precedentemente avuto convulsioni febbrili.

Meningite/encefalite

Sono stati descritti 8 casi nella review di Ellul et al.: uno con liquor positivo per SARS-CoV-2 (in Giappone⁽¹⁹⁾), tre con liquor negativo e quattro con ricerca del virus nel liquor non eseguita. Le manifestazioni neurologiche di questi pazienti erano tipiche dell'encefalite: irritabilità, confusione, riduzione della coscienza, talvolta associati a convulsioni. Tre pazienti presentavano anche rigidità nucale e uno aveva sintomi psicotici.

È particolarmente interessante il caso con liquor positivo, descritto in Giappone: un uomo di 24 anni che ha avuto per 9 giorni astenia, febbre e faringodinia seguiti da convulsioni generalizzate, alterazioni della coscienza e segni di coinvolgimento meningeo.

Sierologia negativa per anticorpi anti-HSV-1 e -VZV. Nel sangue: leucocitosi con predominio dei neutrofili e relativa linfopenia; aumento della PCR. Presenti alla TAC opacità a vetro smerigliato nel lobo superiore destro ed alle basi bilateralmente.

Alla RM cerebrale iperintensità della parete del ventricolo laterale destro (immagini pesate in diffusione) e segnale iperintenso al lobo temporale mediale destro e all'ippocampo (T2).

Liquor trasparente e con pleiocitosi prevalentemente linfocitica.

Encefalomielite acuta disseminata (ADEM)

Nella review di Ellul et al. sono riportati due casi di ADEM, entrambe donne di mezz'età. La prima aveva sviluppato disfagia, disartria ed encefalopatia nove giorni dopo la comparsa di cefalea e mialgia.

La seconda si era presentata con convulsioni e riduzione della coscienza dopo vari giorni di anosmia ed ageusia e aveva necessitato di intubazione orotracheale per insufficienza respiratoria.

Entrambe avevano liquor normale ed ampie aree di sostanza bianca cerebrale con segnale iperintenso alla RM. Sono entrambe migliorate dopo la terapia, una con immunoglobuline endovena (IVIG) e l'altra con steroidi.

Sindrome di Guillan-Barrè, sindrome di Miller Fisher e polineurite craniale.

Nella review di Chang et al. sono segnalati un caso di sindrome di Guillan-Barrè che ha sviluppato i sintomi del COVID-19 durante un'ospedalizzazione (ciò suggerisce un'associazione incidentale); un caso di sindrome di Miller Fisher ed un caso di polineurite craniale, entrambi con liquor negativo per SARS-CoV-2.

Nella review di Ellul et al. sono riportati 19 casi di sindrome di Guillan-Barrè o sue varianti, in pazienti con un età media di 63 anni (da 23 a 77). Di questi, due avevano la variante di Miller Fisher.

Il liquor è stato esaminato in 13 di questi pazienti e in nessuno di questi è risultato positivo per SARS-CoV-2.

15 pazienti sono stati trattati con IVIG, 8 (tutti con Guillain-Barrè classica) sono stati trasferiti in terapia intensiva per avere supporto ventilatorio e, di questi, due sono deceduti.

Paralisi del nervo oculomotore

È stato riportato un caso di paralisi del terzo nervo cranico nella review di Chen et al., ma la risonanza magnetica non è stata conclusiva e SARS-CoV-2 non è stato ritrovato nel liquor del paziente.

3. Possibili vie di invasione del sistema nervoso centrale da parte di SARS-CoV-2 e patogenesi delle manifestazioni neurologiche⁽²⁰⁾

Viste le numerose manifestazioni neurologiche del COVID-19, la comunità scientifica ha presto iniziato ad indagare la patogenesi degli effetti che SARS-CoV-2 ha sul sistema nervoso, così come le possibili vie di invasione di quest'ultimo da parte del virus.

Per chiarire del tutto questi dubbi sono sicuramente necessari ulteriori studi, ma si può già iniziare a valutare in che maniera l'infezione da SARS-CoV-2 colpisca il sistema nervoso basandosi sulle evidenze raccolte finora e sugli studi effettuati sugli altri coronavirus.

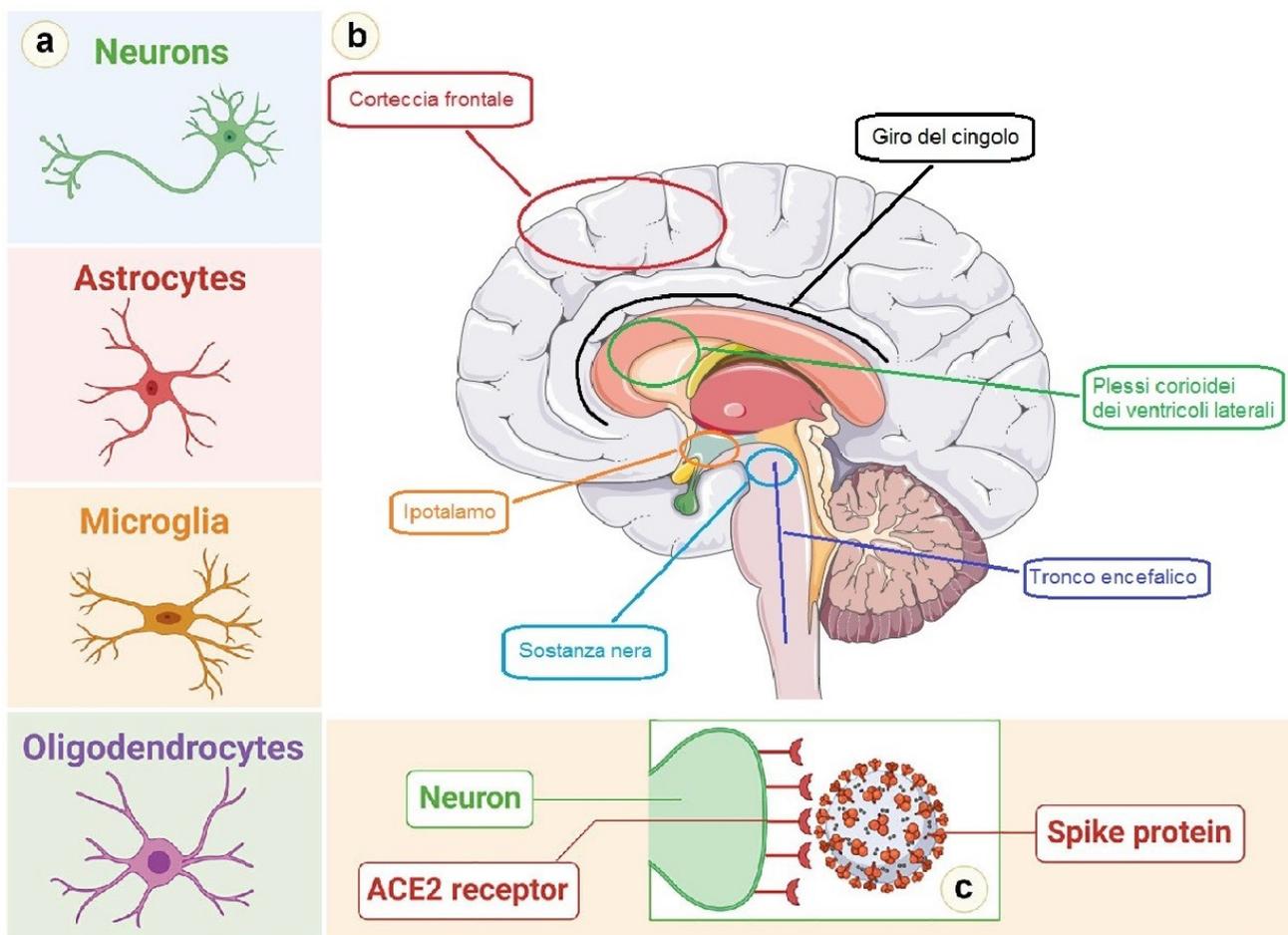


Fig.3^(adattato da 20) **a)** Le cellule del sistema nervoso centrale umano che possono esprimere ACE-2. **b)** Principali aree del sistema nervoso centrale in cui è espresso ACE-2. **c)** SARS-CoV-2 si lega al recettore ACE-2 presente sulla superficie di un neurone.

3.1. Possibili vie di neuroinvasione di SARS-CoV-2 ed altri coronavirus

Una delle questioni più importanti riguarda il capire se SARS-CoV-2 abbia o meno capacità di neuroinvasione e, se sì, come questa avvenga.

SARS-CoV-2, similmente a SARS-CoV-1, invade le cellule bersaglio legandosi al recettore cellulare ACE-2 grazie alla sua proteina spike. Il sistema nervoso centrale è quindi un possibile bersaglio di questo virus, essendo ACE-2 espresso dai neuroni e dalle cellule gliali (astrociti, microglia ed oligodendrociti)⁽²¹⁾(fig.3a).

Sembra che ACE-2 sia espresso in numerose regioni del sistema nervoso centrale (anche se in misura piuttosto ridotta rispetto ai tessuti in cui è maggiormente rappresentato, cioè polmone, tratto digerente ed endotelio), tra cui vari aree della corteccia (frontale (BA9), giro del cingolo, giro temporale medio), plessi corioidei dei ventricoli laterali, talamo, ipotalamo, nucleo caudato, ippocampo, vari nuclei del tronco encefalico (nuclei vestibolari, oculomotori, dell'ipoglosso, locus coeruleus, sostanza nera) e midollo spinale⁽²¹⁾(fig.3b).

Inoltre più studi autoptici^(22,23,24) hanno descritto la presenza di SARS-CoV-2 nel sistema nervoso centrale e nei nervi cranici di pazienti deceduti a seguito dell'infezione, quindi la possibilità da parte del virus di raggiungere il sistema nervoso centrale sembra essere accertata. Rimane da chiarire attraverso quali vie questo avvenga.

Finora sono state ipotizzate due principali vie di neuroinvasione: la via transcribale, per trasporto assonale retrogrado attraverso le fibre del nervo olfattivo, e la via ematogena, attraversando la barriera ematoencefalica.

Via transcribale

Questa via prevede la diffusione del virus a partire dall'epitelio olfattivo presente nelle cavità nasali, dove SARS-CoV-2 entrerebbe a contatto con le fibre del nervo olfattivo. Qui, risalirebbe le fibre per trasporto assonale retrogrado lungo i microtubuli, attraversando la lamina cribriiforme dell'etmoide e raggiungendo il bulbo olfattorio, da dove poi si diffonderebbe al resto del sistema nervoso centrale attraverso una trasmissione transsinaptica (fig.4a-b).

Le evidenze a supporto dell'esistenza di questa via sono numerose.

È stata osservata morte neuronale in topi transgenici per ACE-2 umano esposti a SARS-CoV-1 per via intranasale (per mimare l'infezione umana causata da esposizione a droplets in aerosol), suggerendo una modalità di infezione attraverso il nervo olfattorio⁽²⁵⁾.

La diffusione transsinaptica è stata descritta in altri coronavirus: uno studio canadese evidenzia la neuroinvasione attraverso il nervo olfattivo e la diffusione transsinaptica attraverso trasporto assonale mediato dai microtubuli da parte di HCoV-OC43 nei topi⁽²⁶⁾.

L'invasione del sistema nervoso centrale attraverso nervi periferici è tipica del virus porcino dell'encefalomielite emoagglutinante (PHEV), un β -coronavirus esclusivamente suino che, dopo una prima replicazione nel sistema respiratorio, invade vari nuclei del tronco encefalico risalendo in senso retrogrado i nervi cranici e da lì eventualmente invade encefalo e midollo spinale⁽²⁷⁾.

Anche il fatto che SARS-CoV-2 causi frequentemente anosmia è un'ulteriore elemento a favore di questa tesi: ACE-2 e TMPRSS2 sono espressi dalla cellule di sostegno dell'epitelio olfattivo (anche se in misura minore rispetto alle cellule dell'epitelio respiratorio) e la loro infezione potrebbe spiegare l'anosmia e rappresentare la porta di ingresso nel sistema nervoso centrale per il virus^(28,29).

Via ematogena

Sono stati proposti due diversi meccanismi per mezzo dei quali SARS-CoV-2 invaderebbe il sistema nervoso centrale attraverso la via ematogena.

Infezione endoteliale: il virus presente nel sangue può legarsi alla proteina ACE-2 presente sulla superficie delle cellule endoteliali⁽⁷⁾ e le cellule endoteliali infette possono trasmettere il virus agli astrociti (che sappiamo capaci di esprimere ACE-2⁽²¹⁾) con cui prendono contatto e da qui al resto del SNC (fig.4d).

A dimostrazione della capacità di SARS-CoV-2 di infettare le cellule endoteliali è stata riportata la presenza del virus (attraverso microscopia elettronica a trasmissione) in cellule endoteliali dei capillari cerebrali in un paziente deceduto a seguito dell'infezione (il virus è stato ritrovato anche nel tessuto cerebrale dello stesso paziente, a livello del lobo frontale, sia mediante microscopia elettronica a trasmissione che con PCR)⁽²²⁾.

Infezione leucocitaria: leucociti infetti possono attraversare la barriera ematoencefalica (BEE)(grazie anche all'aumento della permeabilità capillare causato dall'infezione sistemica da parte di SARS-CoV-2) e portare il virus nel SNC con un meccanismo "a cavallo di Troia" (fig.4c).

Questo meccanismo di neuroinvasione sembra avere un ruolo importante nell'infezione da HIV⁽³⁰⁾ e sappiamo che altri coronavirus (HCoV-229E, HCoV-OC43 e SARS-CoV-1)

possono infettare i monociti/macrofagi⁽³¹⁾.

Sono comunque necessari ulteriori studi per accertare l'utilizzo di queste vie di neuroinvasione da parte di SARS-CoV-2 (che potrebbe anche sfruttarne più di una) e capire quale sia quella predominante.

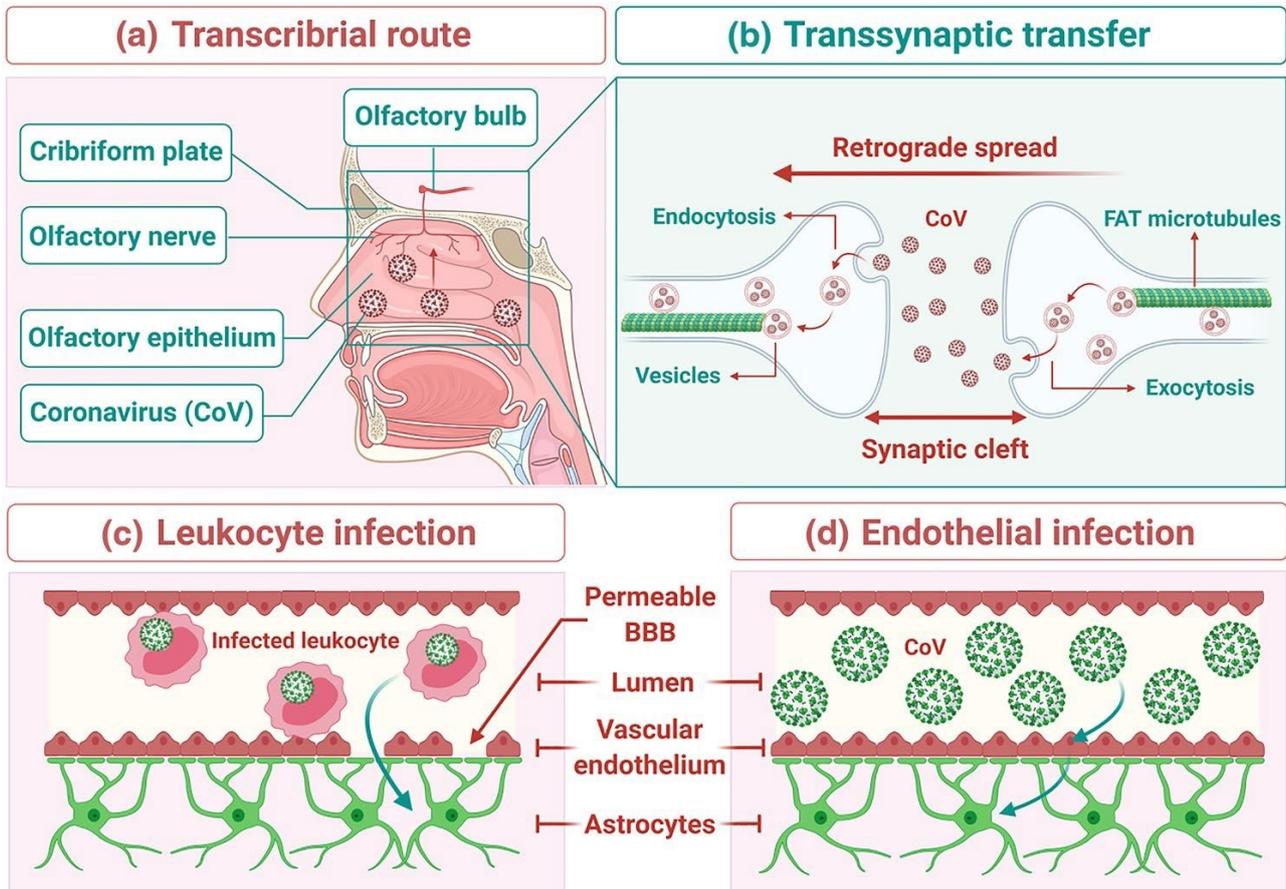


Fig.4^(da 20) Possibili vie di neuroinvasione di SARS-CoV-2. **a)** Diffusione attraverso la via transcribriale: dall'epitelio olfattivo lungo il nervo olfattivo fino al bulbo olfattivo e da qui al resto del SNC. **b)** Diffusione transsinaptica: il virus si muove lungo gli assoni sfruttando il trasporto assonale retrogrado mediato dai microtubuli e passa da una cellula all'altra con un meccanismo di esocitosi/endocitosi a livello sinaptico. Diffusione ematogena attraverso la barriera ematoencefalica (BEE): **c)** infezione leucocitaria: leucociti infetti possono attraversare la BEE e portare il virus nel SNC con un meccanismo "a cavallo di Troia". **d)** Infezione endoteliale: le cellule endoteliali infette possono trasmettere il virus agli astrociti con cui prendono contatto e da qui al resto del SNC.

3.2. Patogenesi delle manifestazioni neurologiche di SARS-CoV-2

Danno legato all'associata malattia polmonare e sistemica

Le più comuni manifestazioni del COVID-19 sono a livello del sistema respiratorio, con tosse, dispnea, ipossiemia ed anomalie radiologiche⁽¹⁵⁾. Piuttosto frequente (soprattutto nei pazienti ospedalizzati) è la polmonite interstiziale⁽¹⁵⁾, che può degradare - soprattutto se si manifesta in maniera grave e bilaterale - la funzionalità respiratoria a tal punto da causare un danno ipossico al SNC (che sappiamo essere particolarmente sensibile alla carenza di ossigeno⁽³²⁾) e ad altri tessuti.

Inoltre, l'infezione da SARS-CoV-2 sembra aumentare il rischio di trombosi e quindi di ictus ischemici⁽¹⁸⁾. Questo sembra da attribuire allo stato di infiammazione sistemica causato dall'infezione (soprattutto nei pazienti più anziani e con malattia più grave) e ad uno stato di ipercoagulabilità la cui origine non è stata ancora chiarita del tutto, ma si ipotizza causato da una disfunzione dell'endotelio legata al capacità del virus di infettare le cellule endoteliali.

Supporta questa ipotesi il fatto che in pazienti affetti da COVID-19 sia stata individuata in diversi organi (polmone, cuore, rene, fegato, intestino) la presenza del virus all'interno di cellule endoteliali associata ad infiammazione endoteliale (endotelite: accumulo di cellule infiammatorie con evidenza di morte endoteliale e delle cellule infiammatorie)⁽³³⁾.

Questo suggerisce che l'infezione da SARS-CoV-2 possa indurre endotelite in vari organi in maniera diretta (come dimostra la presenza di virus all'interno degli endotelociti) e indiretta (attirando cellule infiammatorie).

L'endotelite associata a COVID-19 e la conseguente disfunzione endoteliale possono danneggiare il microcircolo e causare una alterazione dell'equilibrio vascolare in senso procoagulante, spiegando almeno in parte sia il danno ipossico ai tessuti che l'aumento del rischio trombotico (soprattutto in soggetti con pre-esistente disfunzione endoteliale, che è associata a condizioni come sesso maschile, fumo, ipertensione, diabete e obesità)⁽³³⁾.

Inoltre in un gran numero di pazienti ospedalizzati per COVID-19 sono stati riscontrati aumento del D-dimero e trombocitopenia, a testimoniare l'alterazione della funzione coagulativa⁽¹⁵⁾.

Danno da infezione diretta

Come descritto precedentemente, SARS-CoV-2 è in grado di raggiungere il SNC (per via nervosa e/o ematogena) e infettare le cellule ivi presenti.

Inoltre è stata osservata morte neuronale in topi transgenici per ACE-2 umano esposti a SARS-CoV-1⁽²⁵⁾, così come sono stati descritti casi di encefalite in pazienti affetti da COVID-19, di cui uno con liquor positivo per SARS-CoV-2⁽⁸⁾.

Queste evidenze supportano un danno diretto alle cellule del sistema nervoso attraverso la loro infezione da parte del virus.

Danno immuno-mediato

Il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nella risposta all'infezione da SARS-CoV-2, garantendo la guarigione alla maggior parte dei pazienti che vengono a contatto col virus.

Al contrario però, una esagerata e disregolata risposta immunitaria può essere deleteria per l'organismo ed avere un ruolo nella patogenesi delle manifestazioni cliniche.

La funzionalità della risposta immunitaria potrebbe essere alla base di una delle caratteristiche più enigmatiche dell'infezione SARS-CoV-2, cioè l'essere asintomatica o molto lieve in circa l'80% dei casi (soprattutto bambini e giovani adulti) e presentarsi in maniera evidente e con diversi gradi di gravità nel restante 20%⁽⁶⁾.

Molto importante per il contenimento delle infezioni virali è la produzione di interferone (IFN) da parte delle cellule del sistema immunitario, agendo da prima linea di difesa contro la replicazione virale. SARS-CoV-1 e MERS-CoV codificano per numerose proteine che antagonizzano la risposta antivirale, anche inibendo e ritardando la produzione di IFN.

Questo ritardo permette una rapida ed abbondante replicazione virale (che a sua volta aumenta la risposta infiammatoria) e promuove l'accumulo intratissutale (specialmente nel polmone) di macrofagi attivati che sono causa di aumento del danno tissutale, di aumentati livelli di citochine proinfiammatorie e di riduzione della risposta T-cellulare virus-specifica⁽³⁴⁾.

Questo, insieme ad altri meccanismi, contribuisce allo sviluppo di una risposta immunitaria eccessiva e disregolata che viene chiamata "tempesta citochinica" (cytokine storm) ed è associata ad una malattia grave⁽³⁴⁾.

Visto che SARS-CoV-2 condivide l'80% del genoma con SARS-CoV-1 ed entra nelle cellule utilizzando lo stesso meccanismo, è ragionevole aspettarsi che i meccanismi

dell'immunità innata coinvolti nella patogenesi di queste manifestazioni siano simili tra i due virus⁽⁵⁾.

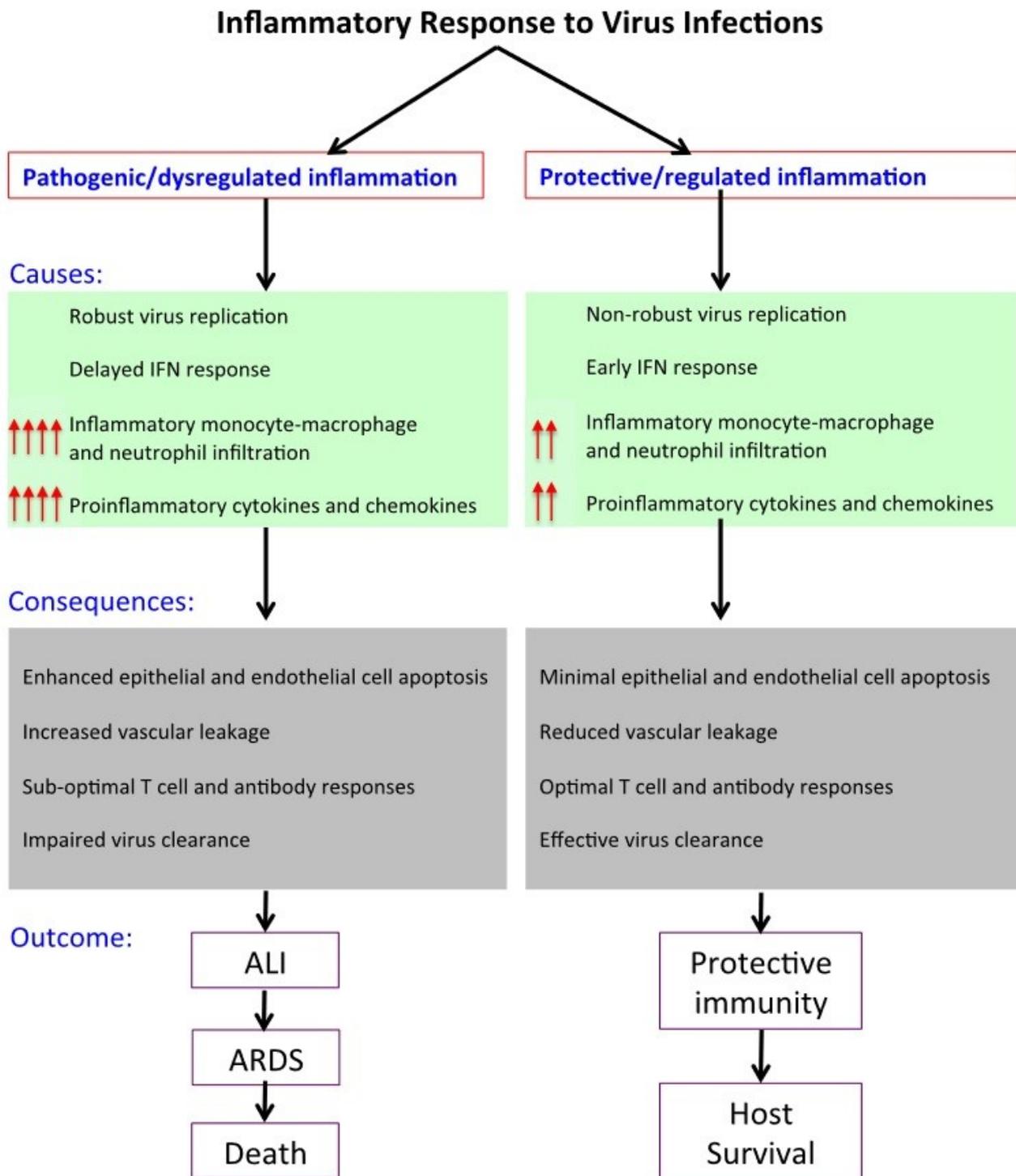


Fig.5^(da 34) Rappresentazione schematica delle possibili risposte infiammatorie all'infezione da coronavirus. ALI = acute lung injury (danno polmonare acuto); ARDS = acute respiratory distress syndrome (sindrome da distress respiratorio acuto).

In un modello animale di infezione da SARS-CoV-1, la tempesta citochinica osservata nei topi (e correlata a polmonite letale) era associata ad un aumento dell'apoptosi dei linfociti

T (sia CD4+ che CD8+) e ad una subottimale risposta T-cellulare virus-specifica⁽³⁵⁾.

Lo stesso pattern è stato riscontrato in uno studio cinese⁽³⁶⁾ svolto su 522 pazienti con COVID-19, che ha riscontrato molto frequentemente linfocitopenia (sia CD4+ che CD8+), specialmente nei casi più gravi. Gli autori hanno notato come alla maggior gravità della malattia fosse correlata una diminuzione dei livelli nel sangue di linfociti T (sia CD4+ che CD8+), un aumento della concentrazione sierica di IL-6, IL-10 e TNF- α , ed un'aumento dei linfociti T esauriti (exhausted, cioè che non esplicano più efficacemente le loro funzioni) come dimostrato dall'aumento dei marker PD-1 e TIM-3.

Inoltre è stato notato che nei pazienti in via di guarigione il valore dei linfociti T tornava a salire, così come scendevano i valori di IL-6, IL-10 e TNF- α .

Queste evidenze supportano il fatto che la tempesta citochinica si possa presentare nei pazienti con COVID-19 e che sia alla base della patogenesi delle sue manifestazioni più gravi.

Seguendo questa strada sono iniziate sperimentazioni sull'uso di farmaci che abbiano un ruolo nel fermare o comunque ridurre la tempesta citochinica, come per esempio il tocilizumab⁽³⁷⁾, che inibisce l'IL-6.

Un simile meccanismo di danno potrebbe operare anche nel SNC: alti livelli di citochine pro-infiammatorie circolanti possono causare confusione e alterazione della coscienza, mentre una risposta T-cellulare indebolita potrebbe essere meno efficace nell'eliminare le cellule infette nel SNC, permettendo un maggiore danno da parte del virus⁽⁵⁾.

Inoltre si ipotizza anche la possibilità di un danno nervoso immuno-mediato post-infettivo: come precedentemente descritto^(5,7,8), sono stati segnalati casi di sindrome di Guillan-Barrè e sue varianti e di ADEM associati sia a SARS-CoV-1 e MERS-CoV che a SARS-CoV-2.

Sulla base dei dati finora disponibili, queste manifestazioni sono troppo rare e la loro patogenesi troppo poco conosciuta per poter dimostrare correlazioni causali con SARS-CoV-2.

Comunque è interessante notare (e prendere come punto di partenza per futuri studi) il fatto che i 5 casi di sindrome di Guillan-Barrè descritti nell'arco di un mese da uno studio effettuato nel nord-Italia⁽³⁸⁾ su una popolazione stimata di 1000-1200 pazienti con COVID-19 suggeriscano un'incidenza superiore rispetto a quella che ci si aspetterebbe nella popolazione generale (circa 1 caso/100.000 persone/anno)⁽³⁹⁾.

È stata anche segnalata⁽⁴⁰⁾ la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni cerebrali (alcuni noti, altri sconosciuti) nel siero e nel liquor di pazienti con COVID-19 grave e manifestazioni neurologiche non spiegate (mioclono, distonia, disturbi dell'oculomozione, delirium, convulsioni).

Sono inoltre state individuate proteine espresse da neuroni di alcune strutture nervose (nucleo dorsale del nervo vago, nucleo ambiguo, ganglio nodoso, ganglio giugulare) che hanno epitopi in comune con proteine di SARS-CoV-2⁽⁴¹⁾.

Queste ultime evidenze rendono plausibile un danno autoimmune - scatenato dal fenomeno del mimetismo molecolare - che potrebbe essere causa di alcune delle manifestazioni neurologiche dell'infezione acuta, così come delle alterazioni neurovegetative (per esempio la tachicardia a riposo) che si notano in pazienti guariti dal COVID-19.

Sono necessari ulteriori studi epidemiologici e patogenetici per chiarire questa eventuale forma di danno neurologico associata a SARS-CoV-2.

La rarità delle manifestazioni legate ad una possibile invasione diretta del SNC da parte di SARS-CoV-2 (meningite/encefalite)⁽⁷⁾ così come la rarità di casi di COVID-19 con liquor positivo per il virus⁽⁴²⁾, fanno pensare che i principali meccanismi di danno neurologico nell'infezione da SARS-CoV-2 siano legati all'associata malattia polmonare e sistemica e immuno-mediati. Il danno da infezione diretta sembrerebbe quindi avere un ruolo minore ed essere raramente preponderante sugli altri meccanismi.

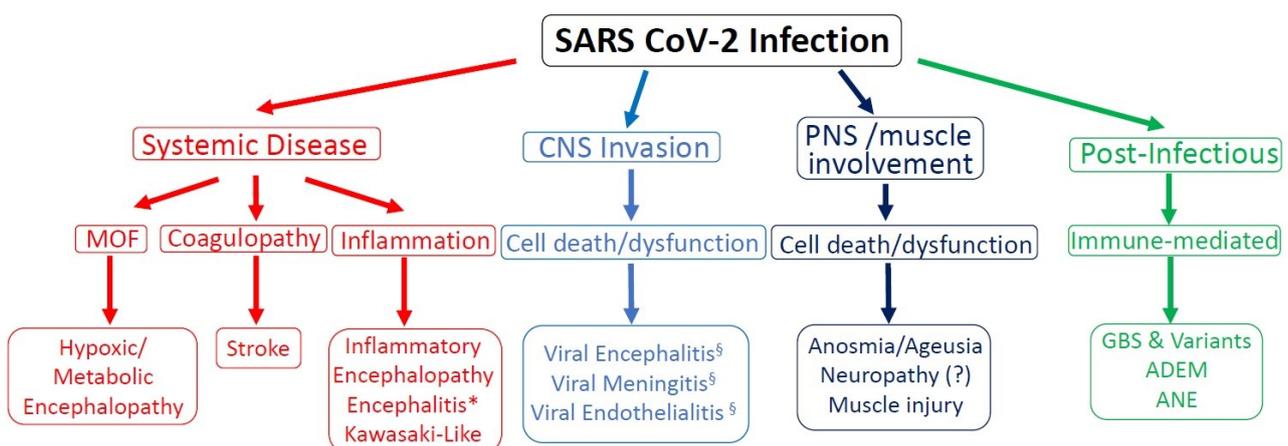


Fig.6^(da 6) Schema riassuntivo delle possibili patogenesi delle manifestazioni neurologiche del COVID-19.

4. Long-COVID: manifestazioni a lungo termine del COVID-19

Si è notato che molti pazienti che avevano superato la fase acuta del COVID-19 continuavano ad avere delle manifestazioni cliniche oppure ne sviluppavano di nuove. Questo ha allertato la comunità scientifica che ha subito iniziato a indagare su queste alterazioni e sull'eventuale correlazione con l'infezione da SARS-CoV-2.

Per indicare queste manifestazioni è stato coniato il termine "long-COVID".

Per definire meglio ciò di cui andremo a parlare ci riferiamo alla linee guida prodotte dal National Institute for Health and Care Excellence (NICE)⁽⁴³⁾, pubblicate il 18 dicembre 2020.

Queste riportano le seguenti definizioni cliniche:

- **COVID-19 acuto** (acute COVID-19): segni e sintomi del COVID-19 fino a 4 settimane dall'inizio della malattia.
- **COVID-19 che continua ad essere sintomatico** (ongoing symptomatic COVID-19): segni e sintomi del COVID-19 da 4 a 12 settimane dopo l'inizio della malattia.
- **Sindrome post-COVID-19** (post-COVID-19 syndrome): segni e sintomi che continuano o si sviluppano dopo un'infezione compatibile col COVID-19, perdurano per più di 12 settimane dall'inizio della malattia e non sono spiegati da diagnosi alternative.

Le linee guida NICE riportano che, in aggiunta alle precedenti definizioni cliniche, il termine "**long-COVID**" è comunemente usato per descrivere i segni e i sintomi che continuano o si sviluppano dopo il COVID-19 acuto, comprendendo quindi sia il "COVID-19 che continua ad essere sintomatico" che la "sindrome post-COVID-19" sopra definiti.

Definire e comprendere le manifestazioni cliniche post-acute del COVID-19 sarà molto importante per poter individuare le migliori strategie di follow-up e terapia dei numerosissimi pazienti che si prevede presenteranno questi quadri clinici.

Importante sarà l'approccio multidisciplinare a questi pazienti, visto che le manifestazioni del long-COVID sembrano essere molto varie e transdisciplinari.

4.1. Clinica

Sono già stati pubblicati molti studi sull'argomento, e la review sistematica e meta-analisi di Lopez-Leon e colleghi⁽⁴⁴⁾ attualmente ancora in pre-print e disponibile su medRxiv è il lavoro più completo disponibile finora.

Lopez-Leon et al. hanno inserito nella loro ricerca tutti gli studi riportanti casistiche di pazienti con long-COVID pubblicati prima del 1° gennaio 2021 e comprendenti almeno 100 soggetti.

I lavori che hanno rispettato questi criteri sono stati 15 (8 da Europa/UK, 3 dagli USA, 1 ciascuno da Australia, Cina, Egitto e Messico), per un totale di 47.910 pazienti.

Il tempo di follow-up varia a seconda degli studi da 14 a 110 giorni dopo l'infezione; l'età dei partecipanti è compresa tra 17 e 87 anni e sono state valutate 55 manifestazioni a lungo termine. 21 manifestazioni erano riportate in più di uno studio e quindi sono potute essere sottoposte a meta-analisi, che hanno mostrato tutte un'eterogeneità da media ad alta (la maggior parte).

Gli autori hanno stimato che l'80% dei pazienti ha sviluppato almeno un sintomo a lungo termine, di cui i cinque più comuni sono stati astenia (58%), cefalea (44%), disturbi dell'attenzione (27%), perdita di capelli (25%) e dispnea (24%).

Alterazioni alla radiologia (RX/TAC) toracica sono state riscontrate nel 34% dei casi.

Sono inoltre stati analizzati markers ematochimici, riscontrando aumento di: D-dimero (20%), NtproBNP (11%) PCR (8%), ferritina sierica (8%), procalcitonina (4%) e IL-6 (3%).

Per quanto riguarda le manifestazioni neurologiche, sono riportati astenia (58%), cefalea (44%), disturbi dell'attenzione (27%), ageusia (23%), anosmia (21%), deficit mnesici (16%), perdita dell'udito o tinnito (15%), ansia (13%), depressione (12%), dolore (11%), disturbi del sonno (11%), vertigini (3%), ictus (3%), disturbo dell'umore (2%), disturbo ossessivo-compulsivo (2%), disturbo post-traumatico da stress (1%).

Nonostante questo lavoro ci fornisca un utile quadro iniziale, vista la grande eterogeneità tra gli studi (soprattutto per diversi tempi di follow-up e mescolanza di pazienti con malattia moderata e grave) ed il campione di pazienti ancora relativamente piccolo, sono sicuramente necessari ulteriori studi (possibilmente con popolazioni stratificate per età, comorbidità, gravità del COVID-19, ecc...) per avere una migliore comprensione delle manifestazioni del long-COVID.

Riportiamo inoltre due studi che non sono stati inseriti nel lavoro di Lopez-Leon et al. perchè cronologicamente successivi.

Un lavoro cinese⁽⁴⁵⁾, pubblicato l'8 gennaio 2021 su Lancet, ha valutato le conseguenze del COVID-19 in 1733 pazienti dimessi da un ospedale di Wuhan (età media 57 anni) lungo un follow-up di circa 6 mesi dallo sviluppo della malattia. Questo studio dispone di uno dei più grandi campioni finora utilizzati per la valutazione del long-COVID, nonchè uno dei follow-up più estesi nel tempo.

Il 76% dei pazienti ha riportato al follow-up almeno un sintomo.

Le principali manifestazioni riportate sono state: astenia o debolezza muscolare (63%), disturbi del sonno (26%), ansia o depressione (23%), perdita di capelli (22%), alterazioni dell'olfatto (11%), palpitazioni (9%), artralgie (9%), alterazioni del gusto (7%), vertigini (6%), cefalea (2%).

Astenia o debolezza muscolare e ansia o depressione sono stati riscontrati più comunemente nelle femmine e nei pazienti che hanno avuto una forma più grave di malattia.

Uno studio spagnolo⁽⁴⁶⁾, pubblicato il 12 gennaio 2021 sul Journal of Infection, ha ricercato eventuali manifestazioni a lungo termine del COVID-19 in una popolazione di 277 pazienti (età media 62 anni) guariti da una forma lieve (34.3%) o grave (65.7%) della malattia dopo un follow-up medio di 77 giorni (8-12 settimane).

L'obiettivo primario dello studio era ricercare la "sindrome post-COVID" definita come la persistenza di almeno un sintomo clinicamente rilevante, alterazioni spirometriche o alterazioni significative alla RX torace. Almeno una di queste condizioni è stata riportata in 141 pazienti (50,9%), con maggiore incidenza in coloro che avevano avuto forme gravi.

Nai casi con polmonite grave, sono stati riscontrati due predittori indipendenti di "sindrome post-COVID": opacità alla RX su più del 50% della superficie polmonare e tachicardia.

Le principali manifestazioni riportate sono state: astenia (34,8%), dispnea (34,4%), anosmia-disgeusia (21,4%, significativamente più frequente nei pazienti con meno di 65 anni, p=0,03), tosse (21,3%), mialgie-artralgie (19,6%), cefalea (17,8%), disturbi mnesici (15,2%).

La presenza di sintomi respiratori e neurologici era poi risultata minore alla visita specialistica (pneumologica o neurologica) effettuata circa 7 settimane dopo il primo

follow-up (quindi 16-18 settimane dalla dimissione).

Le alterazioni laboratoristiche più rilevanti sono state linfocitopenia (19,9%) ed aumento di ferritina (40,6%), D-dimero (24,9%) e CK (13%).

I pazienti sono inoltre stati sottoposti ad un questionario sulla qualità della vita (EuroQol visual analogue scale): i soggetti con sindrome post-COVID hanno mostrato più frequentemente un impatto sulla qualità di vita percepita rispetto a quelli senza sequele (66,9% vs 43,2%; $p=0.0001$).

Non sono ancora disponibili abbastanza studi per conoscere a fondo la patogenesi delle manifestazioni del long-COVID, però è possibile ipotizzare che siano coinvolti:

infiammazione residua, danno d'organo, effetti non specifici dell'ospedalizzazione e della ventilazione prolungata (sindrome post-terapia intensiva), isolamento sociale e impatto della malattia su condizioni pre-esistenti⁽⁴⁶⁾.

In particolare - per quanto riguarda le manifestazioni neuropsichiatriche del long-COVID - la loro patogenesi sembra essere complessa e multifattoriale, potendo essere correlata a effetti diretti dell'infezione, disturbi cerebrovascolari (causati dall'ipercoagulazione), danno ipossico al sistema nervoso, effetti avversi di farmaci e conseguenze psicologiche dell'aver avuto una malattia potenzialmente letale e dell'essere stati ricoverati anche a lungo⁽⁴⁷⁾.

Sindrome da tachicardia posturale (PoTS)

Tra le manifestazioni del long-COVID sono state riportate anche tachicardia a riposo (11% dei casi) e palpitazioni (9-11% dei casi)^(44,45).

La tachicardia in ortostasi - insieme ad altri sintomi (tra cui cefalea, astenia e vertigini) - rientra in quella che viene definita sindrome da tachicardia posturale (o sindrome da tachicardia posturale ortostatica. In inglese: postural tachycardia syndrome - PoTS), alla cui base si ritiene essere una disfunzione dei meccanismi di compenso della pressione sanguigna in ortostasi mediati dal sistema nervoso autonomo⁽⁴⁸⁾.

Sono stati pubblicati case report che riportano casi di pazienti che hanno sviluppato la PoTS successivamente all'infezione da SARS-CoV-2⁽⁴⁹⁾, facendo quindi rientrare questa sindrome tra le varie possibili manifestazioni del long-COVID.

Saranno fondamentali ulteriori studi per chiarire la patogenesi, la durata e le possibili terapie della PoTS post-COVID.

Long-term effects of COVID-19

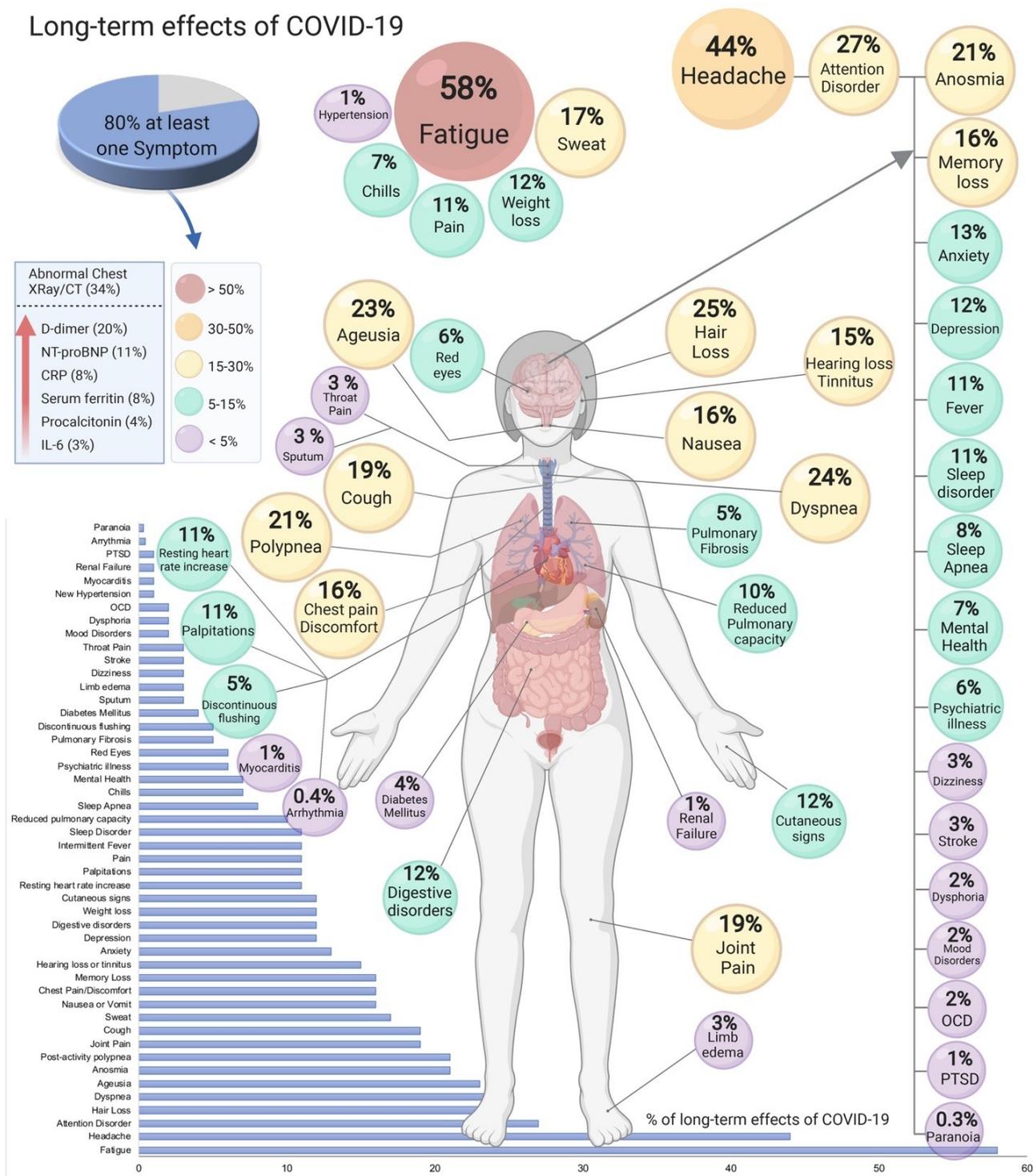


Fig.7^(da 44) Riassunto schematico delle manifestazioni a lungo termine del COVID-19.

4.2. Astenia

L'astenia è il sintomo più frequente del long-COVID, presentandosi molto spesso, anche se con frequenza variabile tra i vari studi: nei 7 lavori riportati dalla review-metanalisi di Lopez-Leon et al.⁽⁴⁴⁾ la prevalenza va dal 28 al 73% (se però non consideriamo lo studio che più si discosta dagli altri, otteniamo un range di 52-73%. Vedasi fig.8), mentre Huang et al.⁽⁴⁵⁾ e Moreno-Pérez et al.⁽⁴⁶⁾ riportano rispettivamente una prevalenza del 63% e 34,8%.

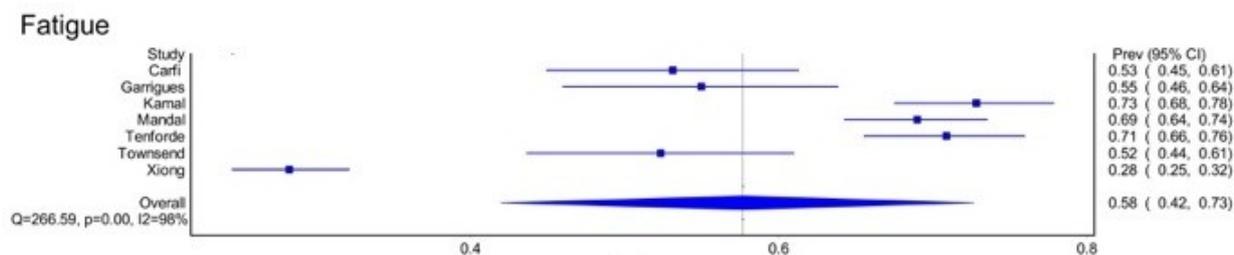


Fig.8^(da 44) La prevalenza di astenia riportata negli studi valutati da Lopez-Leon e colleghi.

L'astenia sembra inoltre essere una manifestazione molto duratura, essendo spesso presente anche dopo 6 mesi dalla guarigione⁽⁴⁵⁾.

Ci sono sindromi - come quella da distress respiratorio acuto (ARDS), che si può presentare nei casi più gravi di COVID-19 - in cui è stato osservato che dopo un anno più di due terzi dei pazienti riportava astenia clinicamente significativa⁽⁵⁰⁾.

Le manifestazioni del long-COVID ricordano in parte la sindrome da fatica cronica (CFS) che include la presenza di astenia grave incapacitante, dolore, disabilità neurocognitiva, disturbi del sonno, disfunzioni autonome e peggioramento della sintomatologia globale a seguito di lievi sforzi fisici o mentali^(51,52).

Attualmente la CFS è un'entità clinica complessa e controversa, senza fattori causali ben definiti^(52,53). Possibili cause includono virus, disfunzioni immunitarie, alterazioni endocrino-metaboliche e fattori neuropsichiatrici⁽⁵²⁾.

Tra gli agenti infettivi che sono stati correlati alla CFS vi sono il virus di Epstein-Barr, il citomegalovirus, enterovirus, herpesvirus⁽⁵⁴⁾ e SARS-CoV-1^(55,56) (che sappiamo essere molto simile a SARS-CoV-2). È sicuramente allettante speculare che SARS-CoV-2 possa essere aggiunto alla lista degli agenti virali causa di CFS⁽⁴⁴⁾.

Lidbury⁽⁵⁷⁾ propone un'ipotesi per spiegare i possibili meccanismi alla base della sindrome da fatica cronica post-virale: le citochine infiammatorie abbondantemente prodotte durante la malattia acuta andrebbero ad impattare sulla funzionalità di mTOR (mechanistic Target of Rapamycin), una serin/treonin kinasi che regola l'omeostasi cellulare influenzando - attraverso le sue vie di segnalazione - trascrizione, sintesi proteica, autofagia, metabolismo, biogenesi e mantenimento degli organelli^(58,59)(fig.9).

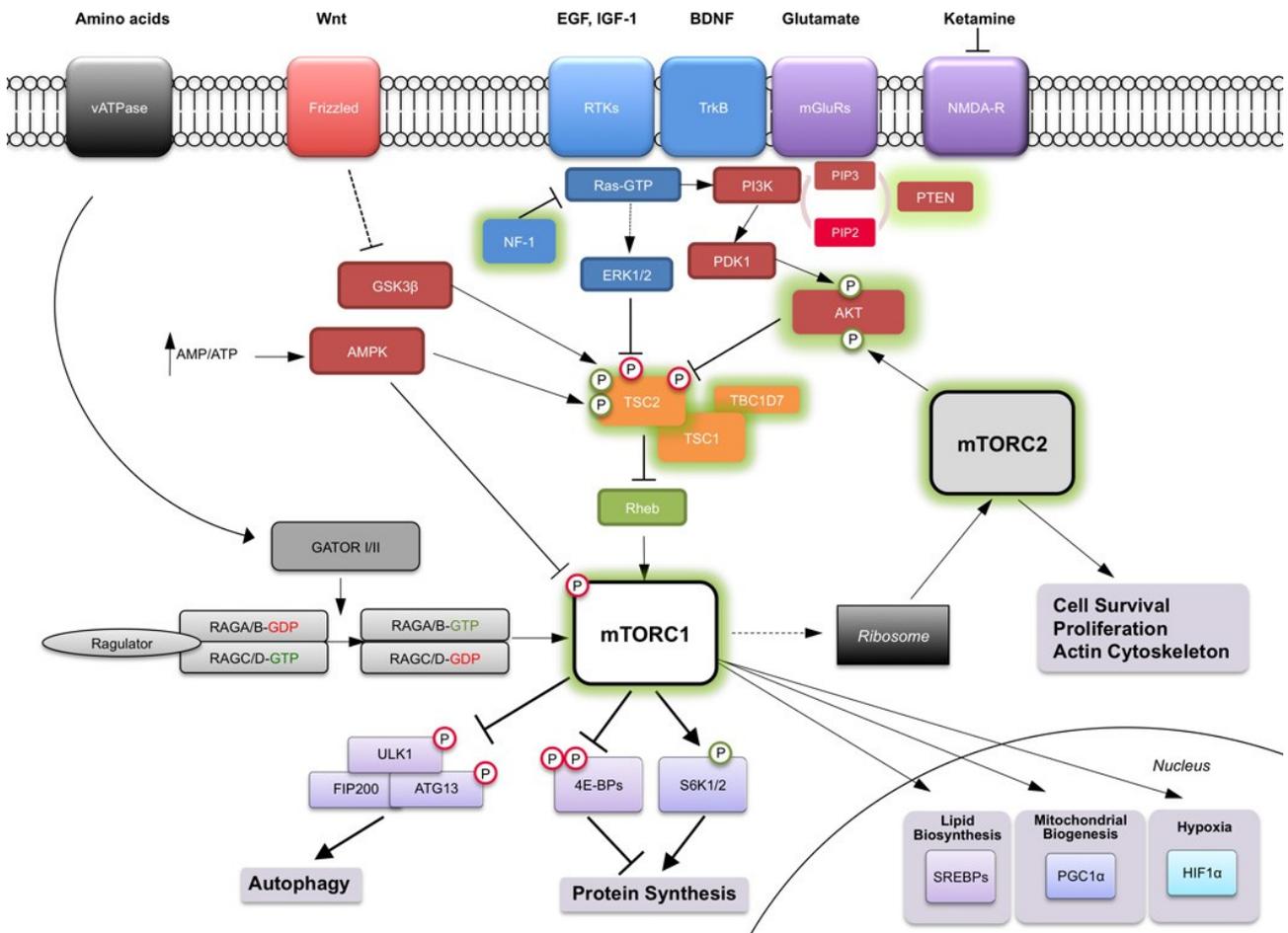


Fig.9^(da 58) *Le complicate vie di segnalazione di mTOR, che si trova all'interno di due complessi (mTORC1 e mTORC2), hanno un ruolo nella regolazione di numerose e fondamentali funzioni dell'attività cellulare.*

Tra le sue molte funzioni, mTOR ha un ruolo importante nella regolazione dell'attività mitocondriale, influenzando il consumo di ossigeno e la capacità ossidativa anche in base allo stato nutritivo ed al bisogno energetico della cellula^(59,60).

Quindi l'alterata funzionalità di mTOR causata dalle citochine infiammatorie andrebbe ad impattare sulla funzionalità mitocondriale e la regolazione energetica cellulare causando la fatica cronica.

La proteina mTOR e le sue vie di segnalazione hanno un ruolo importante anche in varie funzioni del sistema nervoso centrale, tra cui la proliferazione delle cellule staminali neurali, la formazione ed il mantenimento di circuiti, la plasticità sinaptica esperienza-dipendente (quindi apprendimento e memoria) e la regolazione di comportamenti complessi come l'alimentazione, il sonno ed i ritmi circadiani⁽⁵⁸⁾.

Inoltre la disfunzione di mTOR è coinvolta nella patogenesi di varie malattie monogeniche nonché di disturbi neurodegenerativi (Alzheimer, Parkinson, Huntington) e neuropsichiatrici (depressione e forse schizofrenia)⁽⁵⁸⁾.

Considerando le funzioni di mTOR nel SNC è quindi possibile ipotizzare che alterazioni della proteina e delle sue vie di segnalazione possano anche avere un ruolo nella patogenesi di altre manifestazioni neurologiche del long-COVID, come i disturbi attentivi e della memoria.

4.3. Manifestazioni a lungo termine nelle infezioni da altri coronavirus

Molte delle manifestazioni del long-COVID sono in linea con quanto osservato a seguito di infezione da parte di altri coronavirus.

Nei sopravvissuti alla SARS si sono riscontrati ancora dopo due anni dall'infezione alterazioni in vari parametri della funzionalità polmonare (ad esempio il 52,7% dei pazienti valutati in un ospedale di Hong Kong aveva valori anormali di DL_{CO}) e nel test della distanza percorsa camminando per 6 minuti (6 minutes walking test - 6MWT)⁽⁶¹⁾.

Per quanto riguarda le manifestazioni neuropsichiatriche, una review sistematica e meta-analisi⁽⁴⁷⁾ riporta tra i guariti da SARS o MERS una prevalenza rilevante di alterazioni dell'attenzione (19,9%), astenia (19,3%), disturbi mnesici (18,9%), ansia (12,3%), insonnia (12,1%) e depressione (10,5%).

Inoltre in diverse popolazioni (ad Hong Kong⁽⁵⁵⁾ e a Toronto⁽⁵⁶⁾) di sopravvissuti all'infezione da SARS-CoV-1 sono stati riscontrati insieme di manifestazioni che rientrano nella definizione di sindrome da fatica cronica (CFS): tra questi dolore muscoloscheletrico diffuso, astenia cronica, depressione e disturbi del sonno.

In particolare lo studio di Hong Kong, basato su un campione di 233 pazienti seguito mediamente per 41,3 mesi, riporta la presenza di patologie psichiatriche nel 42,5% dei soggetti (disturbo post-traumatico da stress [54,5%], depressione [39%], disturbo da dolore somatoforme [36,4%], disturbo di panico [32,5%], disturbo ossessivo compulsivo [15,6%]), astenia cronica nel 40,3% ed il soddisfacimento dei criteri per la CFS nel 27,1%. Interessante notare come l'essere un operatore sanitario al momento dell'epidemia, sia stato correlato significativamente ($p=0,03$) con un aumentato rischio di sviluppare patologie psichiatriche: questo dato ci suggerisce di porre particolare attenzione nel follow-up degli operatori sanitari che hanno contratto il COVID-19.

5. Metodi

Nel nostro studio sono state valutate due popolazioni:

- **popolazione 1**: composta da pazienti visitati in follow-up presso la pneumologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova e che non presentavano sintomi neurologici.

La popolazione è composta da 111 pazienti, di cui 69 maschi (62,2%) e 42 femmine (37,8%). Età media 60,9 anni (range 33-92).

I soggetti sono stati visitati dal 11/01/2021 al 03/05/2021.

- **popolazione 2 (neurologica)**: formata da pazienti visitati anch'essi presso la pneumologia del Policlinico San Martino e da qui inviati all'ambulatorio neurologico post-COVID-19 presso la clinica neurologica dello stesso ospedale, in quanto affetti da manifestazioni di interesse neurologico.

La popolazione è composta da 61 pazienti, di cui 32 maschi (52,4%) e 29 femmine (47,6%). Età media 59,8 anni (range 19-81). I soggetti sono stati visitati dal 25/11/2020 al 12/05/2021, con un tempo di follow-up medio a partire dal tampone positivo di 221 giorni (mediana 247, range 41-380) e a partire dal tampone negativo di 206,5 giorni (mediana 223, range 23-346). In questa popolazione il 23% dei pazienti non ha richiesto ossigenoterapia, il 14,8% ha richiesto ossigeno, il 29,5% ha ricevuto ventilazione meccanica non invasiva (NIMV) e il 32,8% ha richiesto l'intubazione orotracheale.

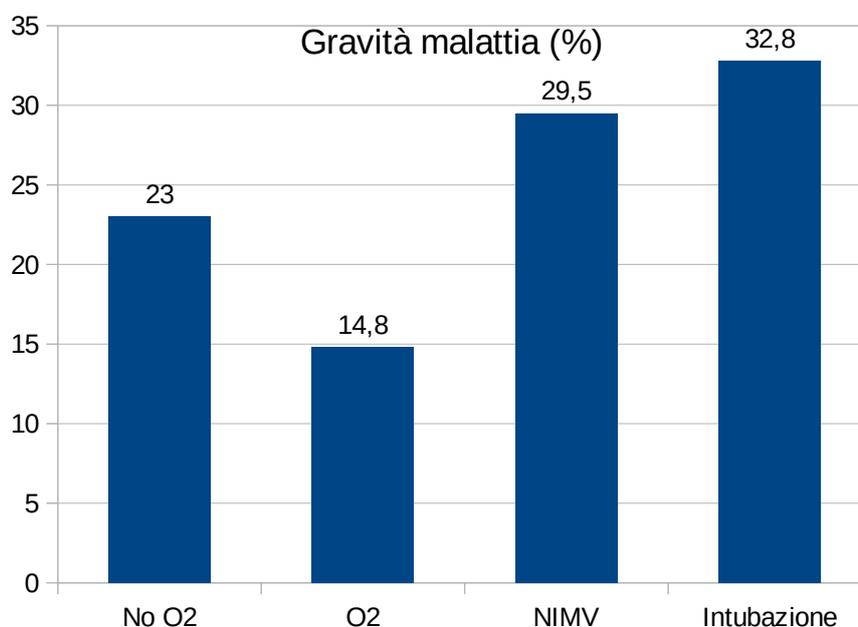


Grafico 1 La gravità di malattia dei pazienti della popolazione 2 espressa in base alla necessità di assistenza con ossigeno e/o ventilazione meccanica. NIMV = ventilazione meccanica non invasiva.

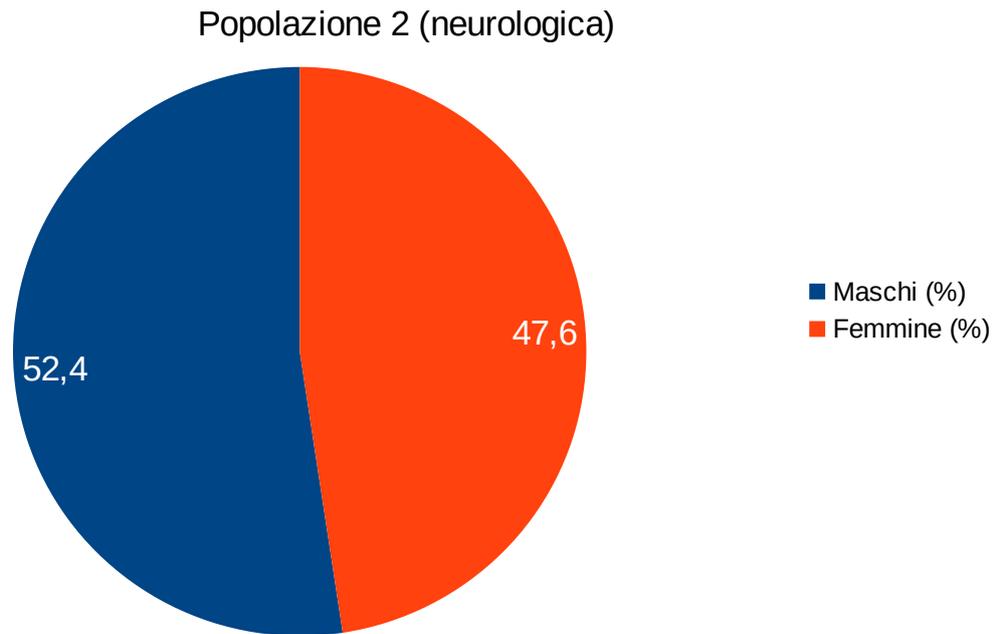


Grafico 2 *La composizione della popolazione 2 (neurologica) in base al sesso.*

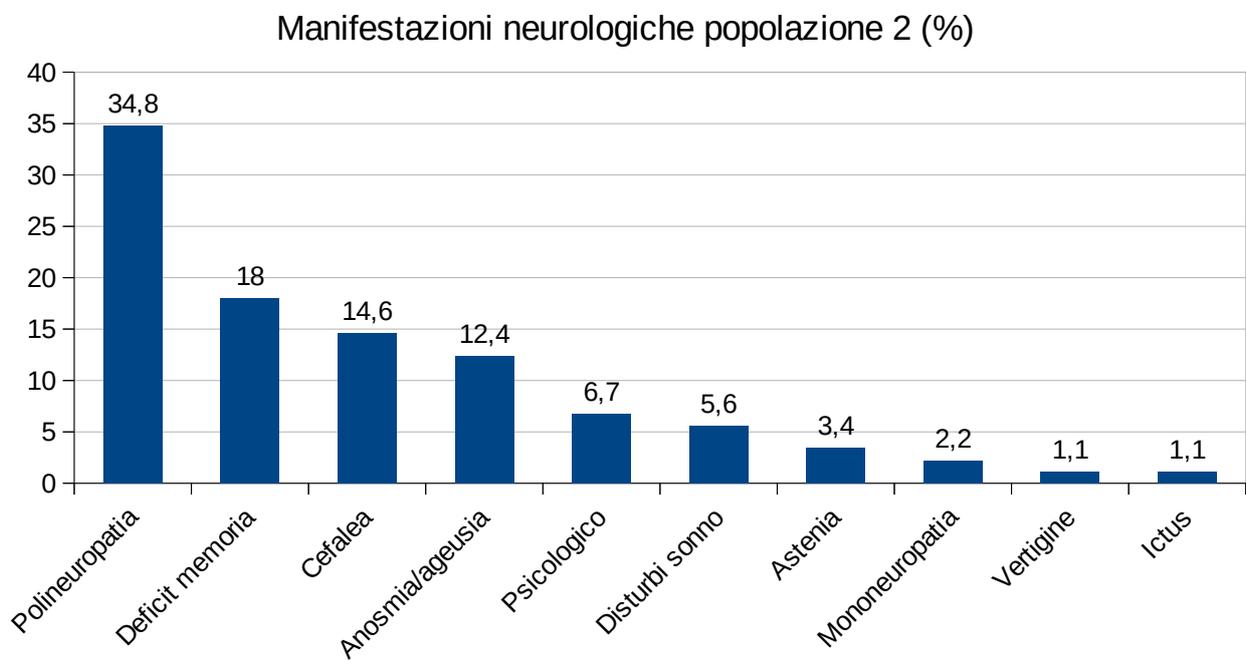


Grafico 3 *Le manifestazioni neurologiche per le quali i pazienti della popolazione 2 sono stati inviati alla visita neurologica.*

Ai partecipanti allo studio è stato somministrato in sede di visita (pneumologica per la popolazione 1 e neurologica per la 2) un questionario (fig.10) volto ad indagare la presenza e l'impatto di astenia, depressione e deficit mnesici.

5.1. Scale utilizzate

Il questionario utilizzato per lo studio è composto da tre scale: Modified Fatigue Impact Scale (MFIS-5), Patient Health Questionnaire (PHQ-2) e Perceived Deficits Questionnaire (PDQ), composte rispettivamente da 5, 2 e 4 items, per un totale di 11 domande.

Queste tre scale sono state adattate allo scopo del nostro studio inserendo prima di ognuna la proposizione "nell'ultimo mese, rispetto al suo stato di salute prima del COVID quanto spesso le è capitato di...".

Ad ogni domanda era possibile rispondere:

- "Mai", 0 punti;
- "Raramente (1-2 volte al mese)", 1 punto;
- "Qualche volta (una volta alla settimana)", 2 punti;
- "Spesso (più di una volta alla settimana)", 3 punti.

I punteggi massimi ottenibili per ogni scala sono quindi:

MFIS-5: 15 punti. PHQ-2: 6 punti. PDQ: 12 punti.

Il punteggio massimo ottenibile nella somma delle scale è quindi di 33 punti.

Scala modificata di impatto della fatica (Modified Fatigue Impact Scale - MFIS-5)

La MFIS è una versione modificata della fatigue impact scale (FIS), un questionario auto-somministrato di 40 domande, proposto nel 1994 da Fisk e colleghi⁽⁶²⁾ e volto ad indagare gli effetti dell'astenia sulla qualità della vita.

Per avere degli strumenti più pratici da gestire in un contesto clinico, dalla FIS sono state derivate la MFIS-21 e la MFIS-5⁽⁶³⁾ composte rispettivamente da 21 e 5 domande.

La MFIS-5 misura l'impatto della fatica sulle funzioni cognitive, fisiche e psicosociali del paziente, ha un'alpha di Cronbach uguale a 0,80 (che indica una buona affidabilità) ed è composta dai 5 items della MFIS-21 che correlano più fortemente col risultato finale di quest'ultima⁽⁶³⁾.

Questa scala presenta anche alcuni problemi: per esempio la depressione può essere un fattore confondente la valutazione, visto che può essere sia causa che effetto dell'astenia⁽⁶⁴⁾.

La MFIS è molto usata nella valutazione dei pazienti affetti da sclerosi multipla, tanto che è una delle componenti del Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory (MSQLI), una batteria di 10 scale presentata nel 1999 da Fischer et al.^(65,66) e volta a fornire una misurazione della qualità della vita dei soggetti con sclerosi multipla.

Questionario sulla salute del paziente (Patient Health Questionnaire - PHQ-2)

Il PHQ-9 è un questionario auto-somministrato di 9 domande, utilizzato per individuare la depressione e valutarne la gravità⁽⁶⁷⁾, derivato da una componente del test PRIME-MD (che è invece somministrato dal clinico)^(68,69).

Il PHQ-2 è composto dai primi due items del PHQ-9, che indagano la frequenza di anedonia e umore depresso, ed è frequentemente utilizzato per selezionare i pazienti a cui somministrare successivamente il PHQ-9⁽⁶⁷⁾.

Una recente review sistematica e meta-analisi⁽⁷⁰⁾, che ha analizzato 100 studi (per un totale di 44318 soggetti, di cui 4572 con depressione maggiore) riporta che, nell'individuare la depressione maggiore, la PHQ-2 ha una sensibilità e specificità rispettivamente uguale a 0,91 e 0,67 con un cutoff ≥ 2 e di 0,72 e 0,85 con un cutoff ≥ 3 . Uno studio svolto sulla popolazione generale di Hong Kong riporta per il PHQ-2 un'alpha di Cronbach uguale a 0,76⁽⁷¹⁾.

Questionario sui deficit percepiti (Perceived Deficits Questionnaire - PDQ)

Il PDQ-20 è un questionario auto-somministrato di 20 domande, utilizzato per sondare la presenza di deficit cognitivi soggettivi (in particolare riguardanti memoria, attenzione e concentrazione), proposto nel 1990 da Sullivan e colleghi⁽⁷²⁾ e sviluppato appositamente per l'uso con pazienti affetti da sclerosi multipla.

Il PDQ-20 e la sua forma abbreviata di 5 domande (PDQ-5, formato dagli items 4, 9, 11, 14 e 16 della forma estesa) sono una delle componenti del Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory (MSQLI)^(65,66).

Questa scala può essere utile per individuare i pazienti meritevoli di ulteriori indagini della funzione cognitiva (per esempio attraverso MMSE o MOCA), tenendo comunque in considerazione il fatto che l'autovalutazione delle funzioni cognitive risente molto spesso della presenza di astenia, ansia e/o depressione⁽⁷³⁾, che andranno dunque indagate anch'esse nei pazienti selezionati per ulteriori accertamenti.

Il manuale del Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory⁽⁶⁴⁾ riporta per il PDQ5 un'alpha di Cronbach uguale a 0,84.

Nel questionario usato nel nostro studio è presente una versione adattata del PDQ5, in cui è stato rimosso l'item 9 per motivi legati alla praticità della somministrazione.

5.2 Obiettivi dello studio

Gli obiettivi dello studio sono:

- valutare la presenza di astenia, depressione e deficit mnesici nelle due popolazioni, l'impatto di questi sulla qualità della vita e la loro eventuale correlazione con l'appartenenza ad una delle due popolazioni.
- valutare la validità del nostro questionario nell'individuare i soggetti meritevoli di follow-up neurologico.
- valutare l'eventuale relazione tra punteggio al questionario e sesso, età e gravità del COVID-19.
- valutare l'eventuale relazione tra età, sesso e gravità del COVID-19.

Nome _____ Cognome _____
 Data di Nascita _____ Data somministrazione _____
 Anni di studio: _____ Destrimane si no _____
 Email _____ Cellulare _____

SCALA DI VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA FATICA (MFIS)

Nell'ultimo mese, rispetto al suo stato di salute prima del COVID quanto spesso le è capitato di ...

	Mai	Raramente (1-2 volte al mese)	Qualche volta (una volta alla settimana)	Spesso (più di una volta alla settimana)
Essere meno veloce nel pensare				
Esser limitato nelle mie capacità di fare cose fuori casa				
Avere problemi a compiere sforzi fisici per lunghi periodi				
Avere maggiori difficoltà del solito a concludere compiti che richiedano uno sforzo fisico				
Avere problemi di concentrazione				

QUESTIONARIO SULLA SALUTE DEL PAZIENTE (PHQ-2)

Nell'ultimo mese, rispetto al suo stato di salute prima del COVID quanto spesso le è capitato di ...

	Mai	Raramente (1-2 volte al mese)	Qualche volta (una volta alla settimana)	Spesso (più di una volta alla settimana)
Provare poco interesse o piacere nel fare le cose?				
Sentirsi/a giù di morale, depresso/a, senza speranze?				

SCALA DEI DEFICIT PERCEPITI

Nell'ultimo mese, rispetto al suo stato di salute prima del COVID quanto spesso le è capitato di ...

	Mai	Raramente (1-2 volte al mese)	Qualche volta (una volta alla settimana)	Spesso (più di una volta alla settimana)
Avere difficoltà nell'organizzare le sue attività				
Non sapere la data				
Dimenticarsi il contenuto di una telefonata subito dopo l'averla fatta				
Avere la sensazione di "testa vuota"				

Fig.10 Il questionario sottoposto ai pazienti che hanno partecipato al nostro studio.

6. Risultati

Il punteggio medio del questionario è risultato significativamente più alto nella popolazione con alterazioni neurologiche rispetto a quella senza (14,36 vs 8,4; $p=0,00002$; grafico 4).

Da questo risultato possiamo concludere che il carico cognitivo-comportamentale è maggiore nei pazienti con almeno un'alterazione neurologica e che il questionario usato nel nostro studio potrebbe quindi essere un valido strumento per selezionare i pazienti meritevoli di un follow-up neurologico.

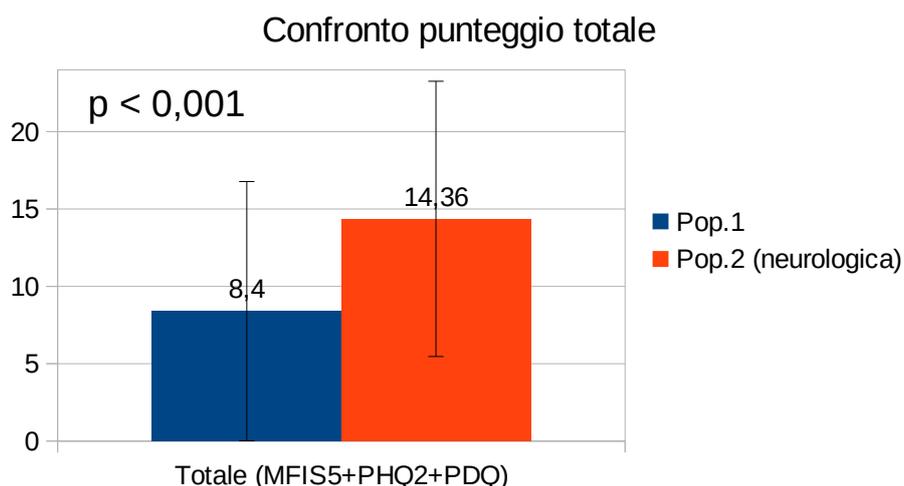


Grafico 4 Confronto tra le medie dei punteggi totali al questionario delle due popolazioni.

Confrontando la media dei punteggi delle singole scale, abbiamo riscontrato un punteggio significativamente più alto nella popolazione 2 (neurologica) nelle scale MFIS-5 (8,49 vs 5,05; $p=0,00001$) e PDQ (3,84 vs 1,87; $p=0,000067$), indicando un maggiore impatto di astenia e deficit mnesici tra questi soggetti (grafico 5).

Invece non abbiamo ritrovato una differenza significativa tra le due popolazioni per quanto riguarda il punteggio della scala PHQ2 (2,03 vs 1,46; $p=0,07$).

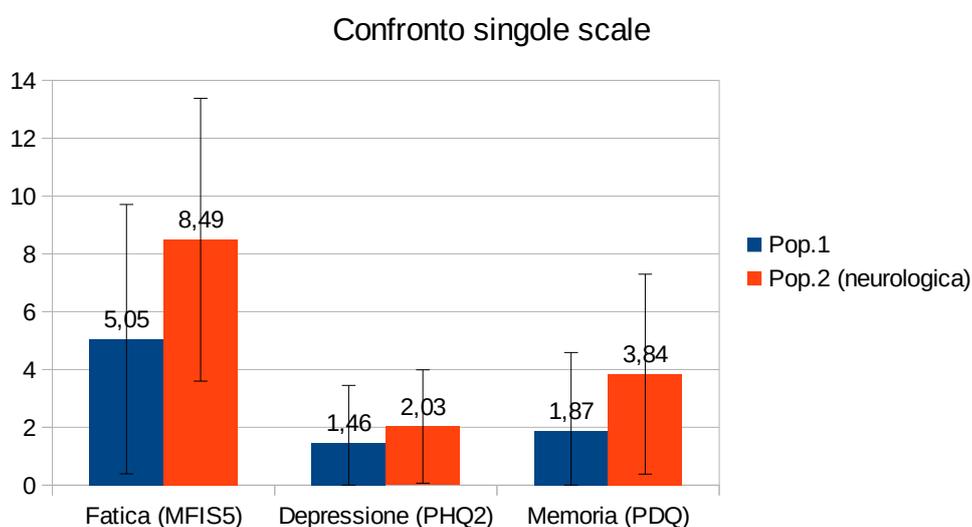


Grafico 5 Confronto tra i punteggi medi alle singole scale delle due popolazioni.

Non abbiamo riscontrato differenze significative nei punteggi medi delle scale MFIS5 e PDQ in relazione alla gravità di malattia (grafico 6).

Al contrario è risultata essere significativa la differenza tra i punteggi medi della scala PHQ2 nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica non invasiva (NIMV) rispetto a chi non ha ricevuto ossigenoterapia ($p=0,039$), chi l'ha ricevuta ($p=0,018$) e chi è stato intubato ($p=0,035$). Ipotizziamo che questo risultato possa essere spiegato dal fatto che i pazienti che hanno necessitato della NIMV vedano come un evento molto positivo l'aver evitato l'intubazione. Sono sicuramente necessari ulteriori studi e campioni più grandi per confermare questo risultato.

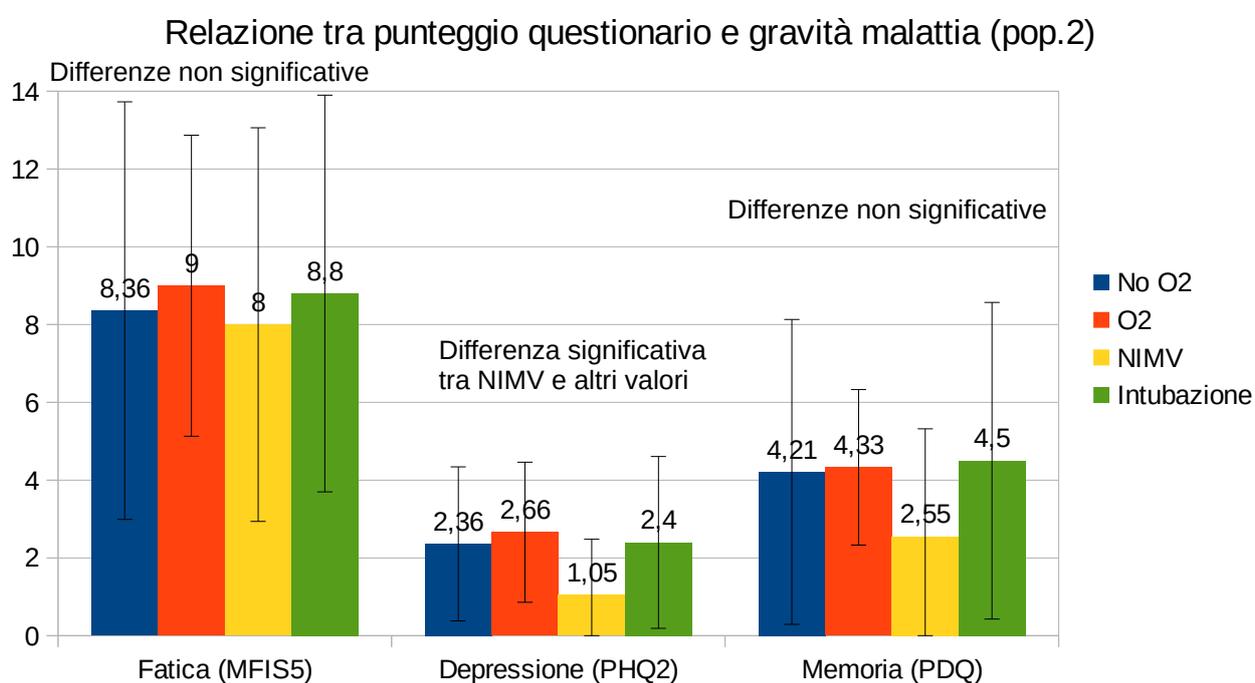


Grafico 6 Confronto tra i punteggi medi delle singole scale e la gravità di presentazione del COVID-19 nella popolazione 2.

Non abbiamo riscontrato significative correlazioni tra i punteggi medi delle singole scale e l'età o il sesso dei pazienti (grafici 7 e 8), ad eccezione della scala MFIS5, con punteggio medio significativamente più alto nelle femmine (9,93 vs 7,18; $p=0,027$).

Questo risultato indica che l'astenia impatta maggiormente sulla popolazione femminile.

Relazione tra punteggio singole scale ed età (pop.2)

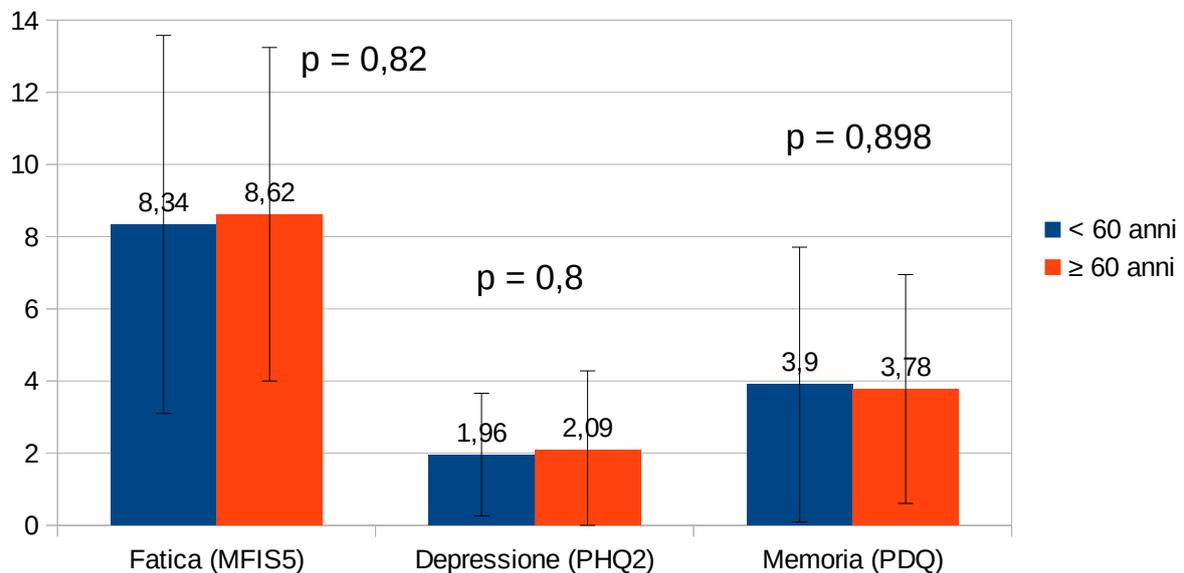


Grafico 7 Confronto tra i punteggi medi delle singole scale e l'età dei pazienti della popolazione 2.

Relazione tra punteggio singole scale e sesso (pop.2)

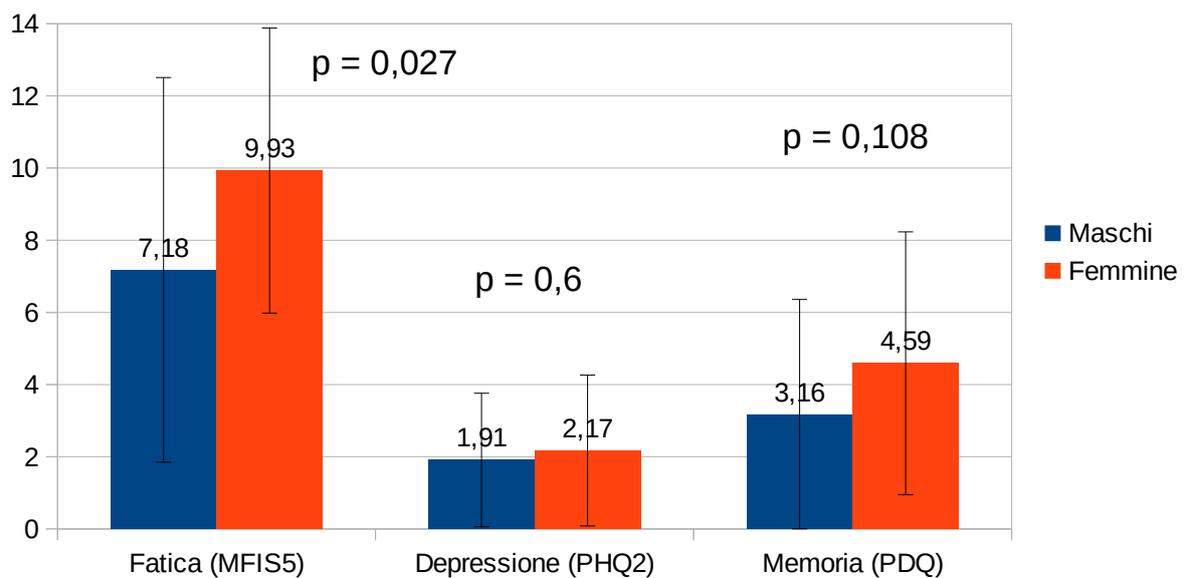


Grafico 8 Confronto tra i punteggi medi delle singole scale ed il sesso dei pazienti della popolazione 2.

Abbiamo inoltre rilevato una malattia significativamente più grave nei pazienti con 60 o più anni ($p=0,027$; grafico 9) e nei maschi ($p=0,001$; grafico 10). Questo risultato è in linea con quanto già conosciuto dalla comunità scientifica⁽¹⁵⁾.

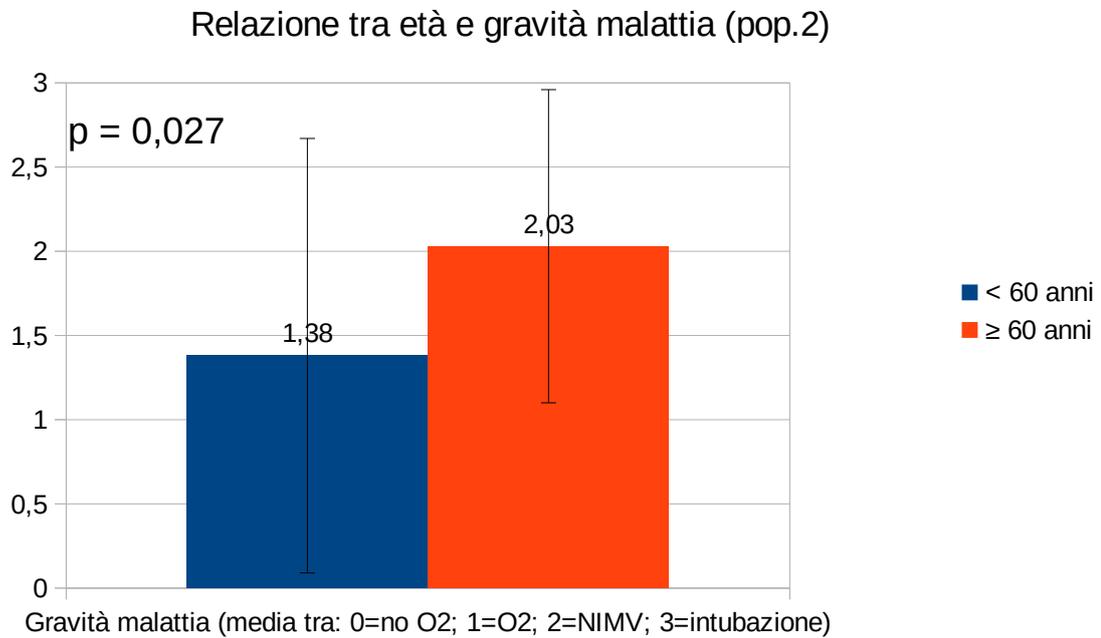


Grafico 9 Confronto tra l'età e la gravità di presentazione del COVID-19 nella popolazione 2.

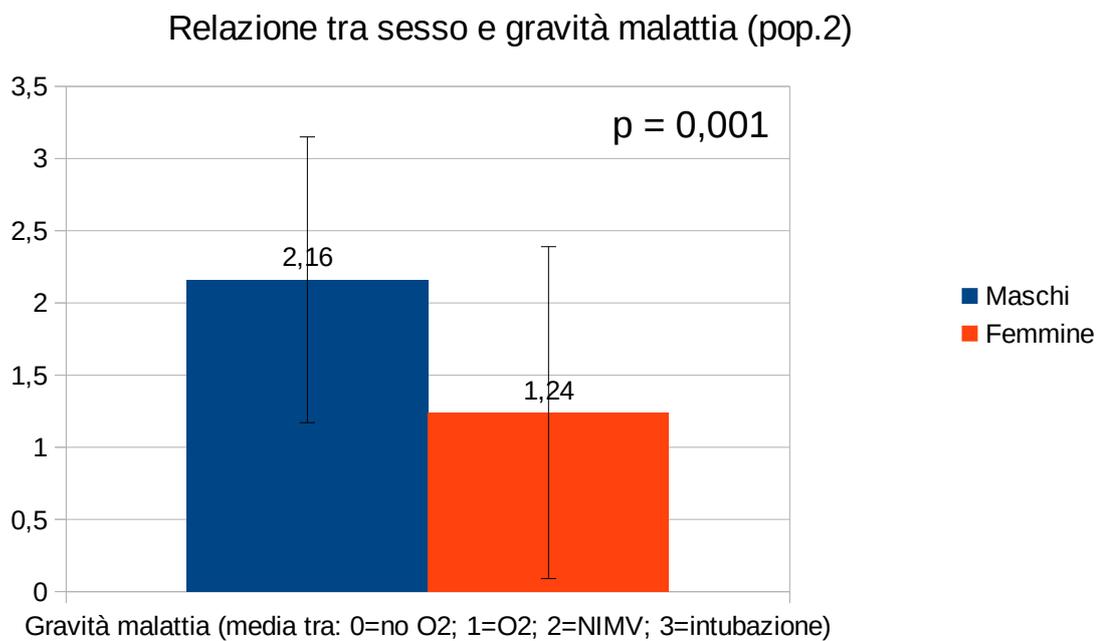


Grafico 10 Confronto tra il sesso e la gravità di presentazione del COVID-19 nella popolazione 2.

Abbiamo anche valutato la correlazione tra i punteggi delle tre scale del questionario utilizzato nel nostro studio calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson (r).

Inoltre abbiamo calcolato i coefficienti di correlazione parziale tra due scale controllando gli effetti della terza.

Notiamo come tutte e tre le scale siano significativamente ($p < 0,001$) correlate positivamente tra loro. La correlazione più forte si ha tra le scale MFIS5 e PDQ ($r = 0,679$), seguite da PH2 e PDQ ($r = 0,591$) e MFIS5 e PH2 ($r = 0,477$). I dati sono riportati in tabella 1.

Correlazioni

		MFIS5	PH2	PDQ
MFIS5	Indice di Pearson	1	,477	,679
	Significatività		,000	,000
	N	61	61	61
PH2	Indice di Pearson	,477	1	,591
	Significatività	,000		,000
	N	61	61	61
PDQ	Indice di Pearson	,679	,591	1
	Significatività	,000	,000	
	N	61	61	61

Tabella 1 *La correlazione tra le tre scale del questionario utilizzato nel nostro studio.*

Andando a calcolare i coefficienti di correlazione parziale, correlando cioè due scale correggendo il risultato per la terza, notiamo come continui ad esserci una correlazione positiva significativa tra le scale MFIS5 e PDQ ($r = 0,559$; $p < 0,001$; grafico 11) e PH2 e PDQ ($r = 0,413$; $p = 0,001$; grafico 12), ma si perda quella tra MFIS5 e PH2 ($r = 0,129$; $p = 0,327$; grafico 13).

Notiamo quindi come i pazienti con maggior presenza di astenia e/o depressione tendano ad avere anche un maggiore impatto di deficit mnesici e viceversa.

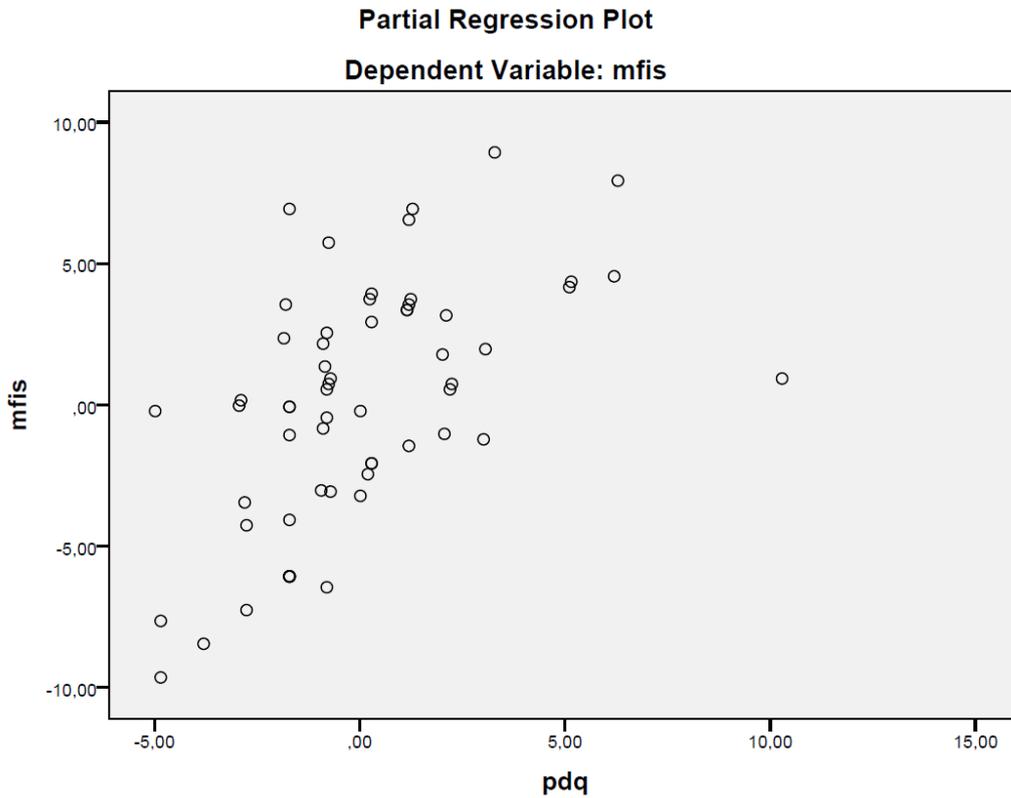


Grafico 11 *La correlazione tra le scale MFIS5 e PDQ, correggendo per la scala PH2.*

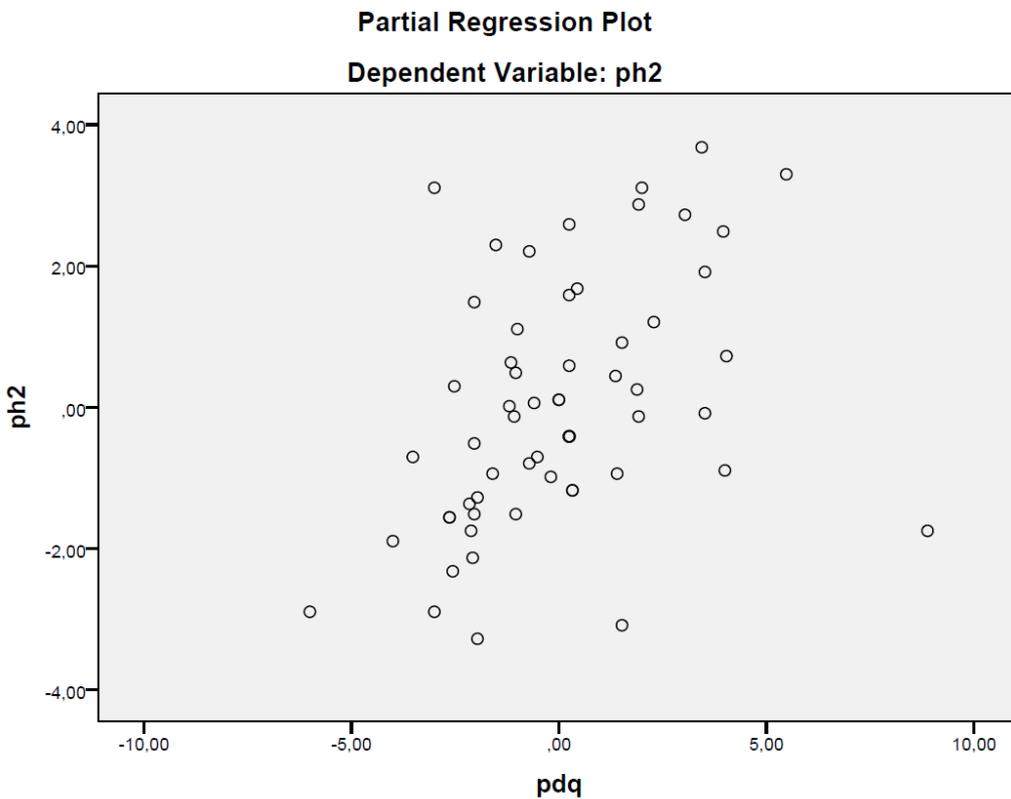


Grafico 12 *La correlazione tra le scale PH2 e PDQ, correggendo per la scala MFIS5.*

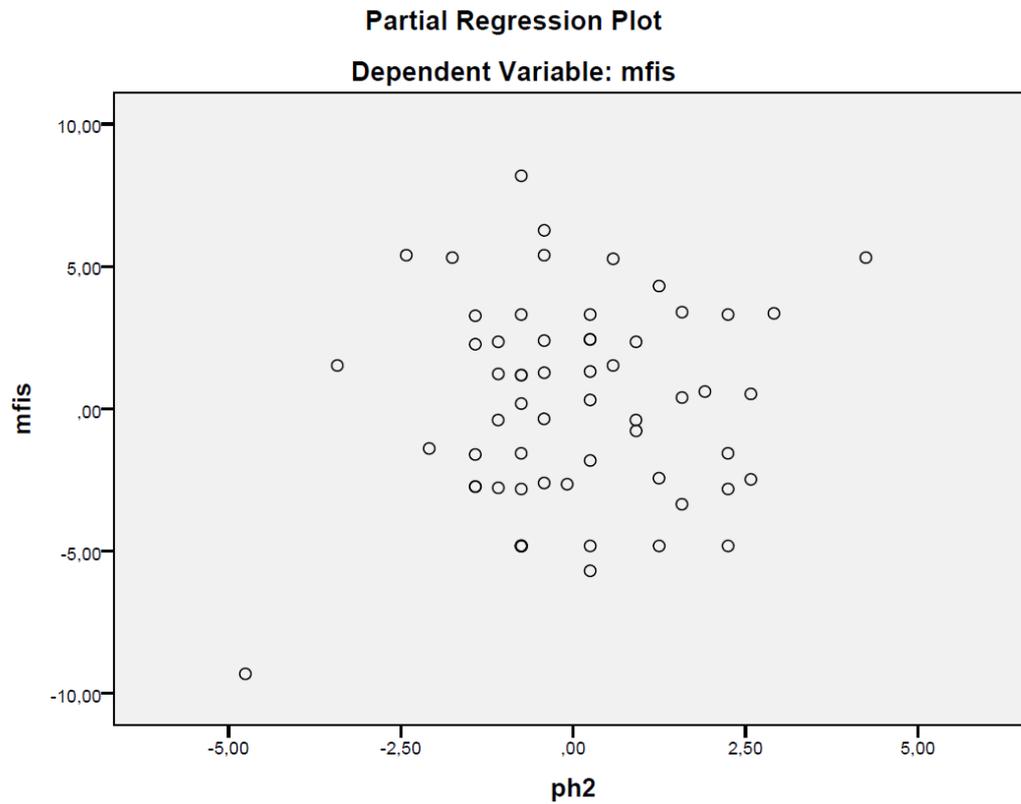


Grafico 13 *La correlazione tra le scale MFIS5 e PH2, correggendo per la scala PDQ.*

Tabelle relative ai grafici

grafico 4)

	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Pop.1	8,40	8,38	0,000022
Pop.2	14,36	8,94	

grafico 5)

MFIS5	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Pop.1	5,05	4,66	0,00001
Pop.2	8,49	4,89	

PHQ2	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Pop.1	1,46	1,99	0,071
Pop.2	2,03	1,96	

PDQ	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Pop.1	1,87	2,73	0,000067
Pop.2	3,84	3,46	

grafico 6)

MFIS5	Punteggio medio	Deviazione Standard
No O ₂	8,36	5,37
O ₂	9,00	3,87
NIMV	8,00	5,06
Intubazione	8,80	5,10

PHQ2	Punteggio medio	Deviazione Standard
No O ₂	2,36	1,98
O ₂	2,66	1,80
NIMV	1,05	1,43
Intubazione	2,40	2,21

PDQ	Punteggio medio	Deviazione Standard
No O ₂	4,21	3,92
O ₂	4,33	2,00
NIMV	2,55	2,77
Intubazione	4,50	4,07

Confronto tra media punteggio pazienti NIMV e media punteggio pazienti:	p
No O ₂	0,039
O ₂	0,018
Intubazione	0,035

grafico 7)

MFIS5	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
< 60 anni	8,34	5,24	0,825
≥ 60 anni	8,62	4,62	

PHQ2	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
< 60 anni	1,96	1,70	0,801
≥ 60 anni	2,09	2,19	

PDQ	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
< 60 anni	3,90	3,81	0,898
≥ 60 anni	3,78	3,17	

grafico 8)

MFIS5	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Maschi	7,18	5,33	0,027
Femmine	9,93	3,95	

PHQ2	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Maschi	1,91	1,85	0,600
Femmine	2,17	2,09	

PDQ	Punteggio medio	Deviazione Standard	p
Maschi	3,16	3,20	0,108
Femmine	4,59	3,65	

grafico 9)

MFIS5	Gravità media	Deviazione Standard	p
< 60 anni	1,38	1,29	0,027
≥ 60 anni	2,03	0,93	

grafico 10)

MFIS5	Gravità media	Deviazione Standard	p
Maschi	2,16	0,99	0,001
Femmine	1,24	1,15	

grafico 11)

Correlazioni

Controllo	Variabili	MFIS5	PDQ
PH2	MFIS5	Correlazione	1,000
		Significatività	.
	PDQ	Correlazione	,559
		Significatività	,000

grafico 12)

Correlazioni

Controllo	Variabili	PDQ	PH2
MFIS5	PDQ	Correlazione	1,000
		Significatività	.
	PH2	Correlazione	,413
		Significatività	,001

grafico 13)

Correlazioni

Controllo	Variabile		PH2	MFIS5
PDQ	PH2	Correlazione	1,000	,129
		Significatività	.	,327
	MFIS5	Correlazione	,129	1,000
		Significatività	,327	.

7. Conclusioni

Astenia e deficit mnesici sono riportati più spesso e con maggior gravità da pazienti con alterazioni neurologiche rispetto a quelli senza. Il carico cognitivo-comportamentale del long-COVID è quindi maggiore nei pazienti con almeno una manifestazione neurologica.

Nel long-COVID il sintomo astenia ha un impatto maggiore sulla popolazione femminile.

I pazienti con maggior presenza di astenia e/o depressione tendono ad avere anche un maggiore impatto di deficit mnesici e viceversa.

Il COVID-19 si è presentato più gravemente nei maschi e nei soggetti di età maggiore o uguale a 60 anni.

Vista la differenza significativa tra i punteggi medi della popolazione con deficit neurologici e quella senza, il questionario utilizzato nel nostro studio (così come le singole scale MFIS5 e PDQ) potrebbe essere un valido strumento per individuare i soggetti meritevoli di un follow-up neurologico.

Sono necessari ulteriori studi per valutarne in maniera più approfondita le caratteristiche psicometriche.

Ringraziamenti

Ringrazio i miei genitori per avermi incoraggiato e sostenuto in questi anni di studio.

Ringrazio i miei compagni d'università ed amici dell'inimitabile gruppo "a radiologically approach", Lorenzo, Mirko e Samuele, con cui ho condiviso le migliori partite a briscola.

Ringrazio i miei amici Alberto, Dhanya, Gloria, Marco, Nicolas, Samuele, Simone, Sofia che mi sono stati vicini ed hanno dato ciascuno un importante contributo al mio percorso.

Ringrazio il prof. Matteo Pardini per avermi dato l'occasione di lavorare a questo progetto e la dott.ssa Erica Biassoni per avermi aiutato e consigliato.

Bibliografia

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 20 febbraio 2020;382(8):727–33.
2. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. [citato 20 marzo 2021]. Disponibile su: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
3. COVID-19 situation update worldwide, as of week 21, updated 3 June 2021 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. [citato 03 giugno 2021]. Disponibile su: <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>
4. Meyerowitz-Katz G, Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection fatality rates. *Int J Infect Dis*. dicembre 2020;101:138–48.
5. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 12 marzo 2020;579(7798):265–9.
6. Korolnik IJ, Tyler KL. COVID-19: A Global Threat to the Nervous System. *Ann Neurol*. luglio 2020;88(1):1–11.
7. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. giugno 2004;203(2):631–7.
8. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol*. settembre 2020;19(9):767–83.
9. Chen X, Laurent S, Onur OA, Kleineberg NN, Fink GR, Schweitzer F, et al. A systematic review of neurological symptoms and complications of COVID-19. *J Neurol*. febbraio 2021;268(2):392–402.
10. Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, Qasim W, et al. Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. *N Engl J Med*. 4 agosto 2016;375(5):497–8.
11. Nilsson A, Edner N, Albert J, Ternhag A. Fatal encephalitis associated with coronavirus OC43 in an immunocompromised child. *Infect Dis*. 2 giugno 2020;52(6):419–22.
12. Ann Yeh E, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H. Detection of Coronavirus in the Central Nervous System of a Child With Acute Disseminated Encephalomyelitis. *PEDIATRICS*. 1 gennaio 2004;113(1):e73–6.
13. Hoffman LA, Vilensky JA. Encephalitis lethargica: 100 years after the epidemic. *Brain*. 1 agosto 2017;140(8):2246–51.
14. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. 1 giugno 2020;77(6):683.

15. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 30 aprile 2020;382(18):1708–20.
16. Pitscheider L, Karolyi M, Burkert FR, Helbok R, Wanschitz JV, Horlings C, et al. Muscle involvement in SARS-CoV-2 infection. *Eur J Neurol*. 25 ottobre 2020;ene.14564.
17. Oxley TJ, Mocco J, Majidi S, Kellner CP, Shoirah H, Singh IP, et al. Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young. *N Engl J Med*. 14 maggio 2020;382(20):e60.
18. Perry RJ, Smith CJ, Roffe C, Simister R, Narayanamoorthi S, Marigold R, et al. Characteristics and outcomes of COVID-19 associated stroke: a UK multicentre case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. marzo 2021;92(3):242–8.
19. Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis*. maggio 2020;94:55–8.
20. Jha NK, Ojha S, Jha SK, Dureja H, Singh SK, Shukla SD, et al. Evidence of Coronavirus (CoV) Pathogenesis and Emerging Pathogen SARS-CoV-2 in the Nervous System: A Review on Neurological Impairments and Manifestations. *J Mol Neurosci* [Internet]. 19 gennaio 2021 [citato 19 marzo 2021]; Disponibile su: <http://link.springer.com/10.1007/s12031-020-01767-6>
21. Chen R, Wang K, Yu J, Howard D, French L, Chen Z, et al. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. *Front Neurol*. 20 gennaio 2021;11:573095.
22. Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, Gordon RE, Reidy J, Lednicky J, et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Med Virol*. 2020;92(7):699–702.
23. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020;3.
24. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schröder AS, Edler C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol*. novembre 2020;19(11):919–29.
25. Netland J, Meyerholz DK, Moore S, Cassell M, Perlman S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Causes Neuronal Death in the Absence of Encephalitis in Mice Transgenic for Human ACE2. *J Virol*. 1 agosto 2008;82(15):7264–75.
26. Dubé M, Le Coupanec A, Wong AHM, Rini JM, Desforgues M, Talbot PJ. Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron Propagation of Human Coronavirus OC43. Diamond MS, curatore. *J Virol*. 20 giugno 2018;92(17):e00404-18, /jvi/92/17/e00404-18.atom.
27. Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus: A Review. *Front Vet Sci*. 27 febbraio 2019;6:53.
28. Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C, Lipovsek M, Van den Berge K, Gong B, et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv*. 31 luglio 2020;6(31):eabc5801.

29. Fodouliau L, Tuberosa J, Rossier D, Boillat M, Kan C, Pauli V, et al. SARS-CoV-2 Receptors and Entry Genes Are Expressed in the Human Olfactory Neuroepithelium and Brain. *iScience*. dicembre 2020;23(12):101839.
30. Kim W-K, Corey S, Alvarez X, Williams K. Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J Leukoc Biol*. 2003;74(5):650–6.
31. Desforges M, Le Coupanec A, Brison É, Meessen-Pinard M, Talbot PJ. Neuroinvasive and Neurotropic Human Respiratory Coronaviruses: Potential Neurovirulent Agents in Humans. In: Adhikari R, Thapa S, curatori. *Infectious Diseases and Nanomedicine I* [Internet]. New Delhi: Springer India; 2014 [citato 3 aprile 2021]. pag. 75–96. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 807). Disponibile su: http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-1777-0_6
32. Erecińska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*. 15 novembre 2001;128(3):263–76.
33. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. maggio 2020;395(10234):1417–8.
34. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. luglio 2017;39(5):529–39.
35. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. febbraio 2016;19(2):181–93.
36. Wu Y, Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:7.
37. Salama C, Han J, Yau L, Reiss WG, Kramer B, Neidhart JD, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*. 7 gennaio 2021;384(1):20–30.
38. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, Ruiz L, Invernizzi P, Cuzzoni MG, et al. Guillain–Barré Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020;4.
39. Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population Incidence of Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2011;36(2):123–33.
40. Franke C, Ferse C, Kreye J, Reincke SM, Sanchez-Sendin E, Rocco A, et al. High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in COVID-19 patients with neurological symptoms. *Brain Behav Immun*. marzo 2021;93:415–9.
41. Marino Gammazza A, Légaré S, Lo Bosco G, Fucarino A, Angileri F, Oliveri M, et al. Molecular mimicry in the post-COVID-19 signs and symptoms of neurovegetative disorders? *Lancet Microbe*. marzo 2021;2(3):e94.
42. Lucchese G. Cerebrospinal fluid findings in COVID-19 indicate autoimmunity. *Lancet Microbe*. ottobre 2020;1(6):e242.

43. Overview | COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19 | Guidance | NICE [Internet]. NICE; [citato 6 aprile 2021]. Disponibile su: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188>
44. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, et al. More than 50 Long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. medRxiv 2021; <https://doi.org/10.1101/2021.01.27.21250617>.
45. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *The Lancet*. gennaio 2021;397(10270):220–32.
46. Moreno-Pérez O, Merino E, Leon-Ramirez J-M, Andres M, Ramos JM, Arenas-Jiménez J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study. *J Infect*. gennaio 2021;S0163445321000098.
47. Rogers JP, Chesney E, Oliver D, Pollak TA, McGuire P, Fusar-Poli P, et al. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. *Lancet Psychiatry*. luglio 2020;7(7):611–27.
48. Arnold AC, Ng J, Raj SR. Postural tachycardia syndrome – Diagnosis, physiology, and prognosis. *Auton Neurosci*. dicembre 2018;215:3–11.
49. the American Autonomic Society, Raj SR, Arnold AC, Barboi A, Claydon VE, Limberg JK, et al. Long-COVID postural tachycardia syndrome: an American Autonomic Society statement. *Clin Auton Res* [Internet]. 19 marzo 2021 [citato 19 aprile 2021]; Disponibile su: <http://link.springer.com/10.1007/s10286-021-00798-2>
50. Neufeld KJ, Leoutsakos J-MS, Yan H, Lin S, Zabinski JS, Dinglas VD, et al. Fatigue Symptoms During the First Year Following ARDS. *Chest*. settembre 2020;158(3):999–1007.
51. Wostyn P. COVID-19 and chronic fatigue syndrome: Is the worst yet to come? *Med Hypotheses*. gennaio 2021;146:110469.
52. Cortes Rivera M, Mastronardi C, Silva-Aldana C, Arcos-Burgos M, Lidbury B. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Comprehensive Review. *Diagnostics*. 7 agosto 2019;9(3):91.
53. Beyond Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Redefining an Illness. *Mil Med*. luglio 2015;180(7):721–3.
54. Proal A, Marshall T. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome in the Era of the Human Microbiome: Persistent Pathogens Drive Chronic Symptoms by Interfering With Host Metabolism, Gene Expression, and Immunity. *Front Pediatr*. 4 dicembre 2018;6:373.
55. Lam MH-B. Mental Morbidities and Chronic Fatigue in Severe Acute Respiratory Syndrome Survivors: Long-term Follow-up. *Arch Intern Med*. 14 dicembre 2009;169(22):2142.
56. Moldofsky H, Patcai J. Chronic widespread musculoskeletal pain, fatigue, depression and disordered sleep in chronic post-SARS syndrome; a case-controlled study. *BMC Neurol*. dicembre 2011;11(1):37.

57. Lidbury BA. Ross River Virus Immune Evasion Strategies and the Relevance to Post-viral Fatigue, and Myalgic Encephalomyelitis Onset. *Front Med.* 24 marzo 2021;8:662513.
58. Lipton JO, Sahin M. The Neurology of mTOR. *Neuron.* ottobre 2014;84(2):275–91.
59. Kennedy BK, Lamming DW. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab.* giugno 2016;23(6):990–1003.
60. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Aponte AM, Shen R-F, Balaban RS, et al. The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Oxidative Capacity. *J Biol Chem.* settembre 2006;281(37):27643–52.
61. Ngai JC, Ko FW, Ng SS, To K-W, Tong M, Hui DS. The long-term impact of severe acute respiratory syndrome on pulmonary function, exercise capacity and health status. *Respirology.* aprile 2010;15(3):543–50.
62. Fisk JD, Ritvo PG, Ross L, Haase DA, Marrie TJ, Schlech WF. Measuring the functional impact of fatigue: initial validation of the fatigue impact scale. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* gennaio 1994;18 Suppl 1:S79-83.
63. D’Souza E. Modified Fatigue Impact Scale – 5-item version (MFIS-5). *Occup Med.* aprile 2016;66(3):256–7.
64. Larson RD. Psychometric Properties of the Modified Fatigue Impact Scale. *Int J MS Care.* 1 aprile 2013;15(1):15–20.
65. Fischer JS, LaRocca NG, Miller DM, Ritvo PG, Andrews H, Paty D. Recent developments in the assessment of quality of life in multiple sclerosis (MS). *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* agosto 1999;5(4):251–9.
66. Ritvo PG, Fischer JS, Miller DM, Andrews H, Paty DW, LaRocca NG. *Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory (MSQLI): A User’s Manual.* New York: The Consortium of Multiple Sclerosis Centers Health Services Research Subcommittee, National Multiple Sclerosis Society, New York, 1997. [Internet]. [citato 7 maggio 2021]. Disponibile su: http://walkcoc.nationalmssociety.org/docs/HOM/MSQLI_Manual_and_Forms.pdf
67. Levis B, Benedetti A, Thombs BD. Accuracy of Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) for screening to detect major depression: individual participant data meta-analysis. *BMJ.* 9 aprile 2019;11476.
68. Spitzer RL. Validation and Utility of a Self-report Version of PRIME-MD The PHQ Primary Care Study. *JAMA.* 10 novembre 1999;282(18):1737.
69. Kroenke K, Spitzer RL, Williams JBW. The PHQ-9: Validity of a brief depression severity measure. *J Gen Intern Med.* settembre 2001;16(9):606–13.
70. Levis B, Sun Y, He C, Wu Y, Krishnan A, Bhandari PM, et al. Accuracy of the PHQ-2 Alone and in Combination With the PHQ-9 for Screening to Detect Major Depression. *JAMA.* 9 giugno 2020;323(22):2290–300.

71. Yu X, Stewart SM, Wong PTK, Lam TH. Screening for depression with the Patient Health Questionnaire-2 (PHQ-2) among the general population in Hong Kong. *J Affect Disord.* novembre 2011;134(1–3):444–7.
72. Sullivan JJ, Edgley K, Dehoux E. A survey of multiple sclerosis. Part 1. Perceived cognitive problems and compensatory strategy use. *Can J Rehabil.* 1990;4:99–105.
73. Strober LB, Binder A, Nikelshpur OM, Chiaravalloti N, DeLuca J. The Perceived Deficits Questionnaire. *Int J MS Care.* 1 luglio 2016;18(4):183–90.
74. Christy MP, Uekusa Y, Gerwick L, Gerwick WH. Natural Products with Potential to Treat RNA Virus Pathogens Including SARS-CoV-2. *J Nat Prod.* 22 gennaio 2021;84(1):161–82.
75. New Images of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Now Available | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Internet]. [citato 22 marzo 2021]. Disponibile su: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/novel-coronavirus-sarscov2-images>