



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione generale della ricerca

FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)

FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)

CODICE PROGETTO	FISR2020IP_02472
AREA	Life Sciences
TITOLO DEL PROGETTO	Anomalie molecolari protrombotiche come marcatori di rischio di coagulopatia e outcome da COVID-19 nell'area di Bergamo
ACRONIMO	COAGinCOVID
SOGGETTI PROPONENTI	Università degli Studi di MILANO-BICOCCA
IMPORTO AGEVOLAZIONE	56.518,40 €
BREVE DESCRIZIONE	<p>I soggetti affetti da COVID-19 presentano una coagulopatia sistemica, che contribuisce significativamente alla morbilità e alla mortalità durante l'infezione. Data la grande variabilità della risposta individuale all'infezione da SARS-COV2, è importante capire se e come i fattori biologici e genetici possono predisporre ad una malattia più grave, incluso lo sviluppo della coagulopatia e della trombosi.</p> <p>La Lombardia, e in particolare la provincia di Bergamo, è stata la zona d'Italia più colpita da Covid-19 durante la prima ondata della pandemia. Per queste ragioni, lo studio COAGinCOVID ha l'obiettivo di analizzare la frequenza delle varianti alleliche nei geni associati alla trombofilia in una popolazione ad alto rischio di infezione e con un'alta incidenza di esiti gravi, come la popolazione bergamasca (n=600), rispetto alla popolazione di controllo (n=1000). I geni, oggi noti, sensibili alla trombosi sono varianti geniche (mutazioni puntuali a un singolo nucleotide) che hanno un'alta frequenza nella popolazione da essere considerate varianti polimorfiche. Sono stati descritti numerosi polimorfismi genici associati alla trombosi presenti in fattori procoagulanti tra cui fattore II (protrombina), fattore V, fattore VII, fattore IX e fattore XIII. Inoltre, i polimorfismi all'interno dei geni del sistema fibrinolitico (PAI-1) o del ciclo dell'omocisteina (MTHFR, MTR, MTRR, CBS) sono anche associati sia positivamente che negativamente alla trombosi. A tale scopo, in questa prima fase del progetto, sono stati inclusi 400 pazienti COVID-19 della provincia di Bergamo e, come controlli sani, 400 soggetti (donatori di sangue) arruolati nel progetto in corso "HYPERCAN".</p>

	(PI Anna Falanga), prima del Gennaio 2020. Tutti questi campioni sono conservati nella biobanca del PI (SIMT HPG23-BIOBANK), presso l'Ospedale Papa Giovanni XXIII e serviranno come gruppo di controllo COVID-19 free.																									
RISULTATI RAGGIUNTI	<p>Abbiamo iniziato ad analizzare le varianti polimorfiche di 137 controlli e 144 pazienti COVID-19. La metodica utilizzata prevede l'impiego di una coppia di primer (forward e reverse), che consente l'amplificazione della regione contenente il polimorfismo e di due oligonucleotidi (sonde Taqman MGB, Applied Biosystems), complementari alla sequenza bersaglio che riconoscono un singolo SNP, uno nella sua variante wild-type (wt) ed uno nella variante mutata. La sonda è caratterizzata dalla presenza in 5' di una molecola "accettore" marcata in VIC o in FAM e in 3' da una molecola "donatore". La sonda complementare all'allele 1 (wt) è marcata con il fluorocromo VIC e quella complementare all'allele 2 (mutato) è marcata con il fluorocromo FAM, al fine di generare un segnale sequenza specifico, consentendo quindi la discriminazione della variante polimorfica. Il saggio è stato ottimizzato in 20 µl di reazione, e condotto in piastre da 96 pozzetti. E' stato applicato il seguente ciclo termico: 10 minuti a 95°C (fase di attivazione), seguiti da 50 cicli da 15 secondi ciascuno a 95°C (fase di denaturazione del DNA) e 1 minuto a 60°C (fase di annealing/estensione). I campioni sono stati genotipizzati in base all'intensità del segnale fluorescente rilevato in ciascun pozzetto: la rilevazione della sola fluorescenza VIC ha indicato l'omozigosi del campione per l'allele 1, la rilevazione della sola fluorescenza FAM ha indicato l'omozigosi dell'allele 2 e in caso di rilevazione di entrambe, l'eterozigosi. I risultati sono stati visualizzati come cluster in base all'intensità del segnale emesso, a cui corrisponde uno specifico genotipo.</p> <p>Il polimorfismo V34L (rs5985) del gene del Fattore XIII, caratterizzato dalla sostituzione di una valina con una leucina in posizione 34 (wild type: C; polimorfismo: A) è associato alla protezione dal tromboembolismo venoso.</p> <table><thead><tr><th rowspan="2">rs5985 FXIII-V34I</th><th rowspan="2">n</th><th rowspan="2">C/C</th><th colspan="2">Genotype % (n)</th><th colspan="2">Allele % (n)</th></tr><tr><th>C/A</th><th>A/A</th><th>C</th><th>A</th></tr></thead><tbody><tr><td>Controls</td><td>137</td><td>1.8 (71)</td><td>42.3 (58)</td><td>1 (8)</td><td>73.0 (200)</td><td>27.0 (74)</td></tr><tr><td>Patients</td><td>144</td><td>5.0 (95)</td><td>29.9 (43)</td><td>1 (6)</td><td>80.9 (233)</td><td>19.1 (55)*</td></tr></tbody></table> <p>*=p<0.05</p>	rs5985 FXIII-V34I	n	C/C	Genotype % (n)		Allele % (n)		C/A	A/A	C	A	Controls	137	1.8 (71)	42.3 (58)	1 (8)	73.0 (200)	27.0 (74)	Patients	144	5.0 (95)	29.9 (43)	1 (6)	80.9 (233)	19.1 (55)*
rs5985 FXIII-V34I	n				C/C	Genotype % (n)		Allele % (n)																		
		C/A	A/A	C		A																				
Controls	137	1.8 (71)	42.3 (58)	1 (8)	73.0 (200)	27.0 (74)																				
Patients	144	5.0 (95)	29.9 (43)	1 (6)	80.9 (233)	19.1 (55)*																				

IMPATTI	<p>L'impatto di questo studio consiste nel valutare se le varianti alleliche nei pazienti COVID-19 possono essere associate a diversi gradi di patogenicità virale e come tali possono essere adottate nel contesto diagnostico/prognostico. Tutto ciò consentirà la stratificazione dei pazienti sulla base della scoperta di profili di polimorfismo più a rischio per il peggior outcome di COVID-19 e una migliore gestione clinica delle trombosi.</p> <p>L'introduzione dell'analisi dei test di coagulazione potrà consentire, insieme all'analisi genetica lo sviluppo di uno score che permetterà di individuare i pazienti ad alto rischio di trombosi durante la malattia da COVID-19.</p>
---------	---