

Sindrome infiammatoria multisistemica: caratteristiche genetiche e cliniche in pazienti pediatrici del Medio Oriente

Abuhammour W, Yavuz L, Jain R, et al.

Genetic and Clinical Characteristics of Patients in the Middle East With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children

JAMA Netw Open. 2022;5(5):e2214985. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.14985

Rubrica *L'articolodelmese*

a cura di Daniele De Brasi

Le caratteristiche cliniche, genetiche e di laboratorio dei pazienti pediatrici mediorientali con sindrome infiammatoria multisistemica (MIS-C) non sono ancora ben delineate, e questo studio di coorte su 45 pazienti con MIS-C, principalmente arabi e di origine asiatica, permette di definire il contributo genetico a tale patologia. Nei pazienti analizzati è stata riscontrata una concentrazione di varianti genetiche rare, verosimilmente patogeniche, a carico di geni immuno-correlati, ed è ipotizzata una possibile correlazione tra risultati genetici, insorgenza di MIS-C e resistenza al trattamento. Una alterazione significativa dei markers infiammatori è stata riscontrata in tutti i pazienti analizzati, mentre manifestazioni mucocutanee e gastrointestinali sono state riscontrate in 36 pazienti (80%), alterazioni cardiache in 22 (48.9%), manifestazioni neurologiche in 14 (31.1%). Alterazioni genetiche a carico di geni immuno-correlati, tra cui TLR3, TLR6, IL22RA2, IFNB1, e IFNA6, sono state identificate in 19 pazienti (42.2%), con una differenza significativa rispetto ai controlli (29 vs 3, $P = <0.001$). I pazienti con queste varianti tendevano ad avere un esordio più precoce di malattia rispetto ai controlli (7 pazienti [36.8%] con presenza di varianti genetiche erano all'esordio più giovani di 3 anni, rispetto ai 2 pazienti senza varianti genetiche [7.7%]) e maggiore resistenza al trattamento (8 pazienti [42.1%] con varianti genetiche hanno ricevuto 2 dosi di immunoglobuline per via endovenosa, rispetto a 3 pazienti [11.5%] senza riscontro di varianti genetiche). I risultati dello studio suggeriscono che varianti genetiche rare e probabilmente deleterie possono svolgere un ruolo nella MIS-C. Ciò apre la strada a ulteriori studi su popolazioni più ampie e diversificate per caratterizzare in maniera completa il contributo della genetica in questa nuova entità patologica.

Multisystem inflammatory syndrome: genetic and clinical characteristics in middle east pediatric patients

Clinical, genetic and laboratory characteristics of Middle Eastern patients with Multisystem Inflammatory Syndrome in children (MIS-C) are not yet defined, this cohort study of 45 patients affected by MIS-C, mainly of Arab and of Asian origin, allows to define the genetic contribution to this disease. In the patients analyzed, a concentration of rare and probably pathogenic genetic variants of immune-related genes was found, and a possible association between genetic results, onset of MIS-C and resistance to treatment was also scored. Significant dysregulation of inflammatory mar-

kers was found in all patients analyzed, while mucocutaneous and gastrointestinal manifestations were found in 36 patients (80%), cardiac alterations in 22 (48.9%), neurological manifestations in 14 (31.1%). Genetic alterations in immune-related genes, including TLR3, TLR6, IL22RA2, IFNB1, and IFNA6, were identified in 19 patients (42.2%), with a significant difference with the control group (29 vs 3, $P = <0.001$). Patients with these variants tend to have an earlier onset of disease than controls (7 patients [36.8%] with genetic variants were 3 years younger at onset than 2 patients [7.7%] without genetic variants) and more resistance to treatment (8 patients [42.1%] with genetic variants who received 2 doses of intravenous immunoglobulins, compared to 3 patients [11.5%] with no evidence of genetic variants). The results of the study suggest that rare and probably deleterious genetic variants may play a role in MIS-C. This paves the way for further studies on larger and more diverse populations to fully characterize the contribution of genetics to this novel pathological entity.

Introduzione

La sindrome infiammatoria multisistemica nei bambini (MIS-C) è una possibile complicanza del COVID-19, potenzialmente fatale in contesti pediatrici. La MIS-C è stata identificata per la prima volta in Europa, inizialmente chiamata Sindrome infiammatoria multisistemica pediatrica correlata a SARS-CoV-2. I bambini a cui era stata diagnosticata la MIS-C presentavano febbre per più di 4 giorni e risultavano positivi per infezione da SARS-CoV-2 (mediante RT-PCR o test anticorpale). La presentazione più comune era caratterizzata da sintomi gastrointestinali (80%-100%), coinvolgimento mucocutaneo, sintomi neurologici, congiuntivite e complicanze cardiache. Indagini epidemiologiche, cliniche e immunologiche hanno rivelato che la MIS-C presenta somiglianze fenotipiche con la malattia di Kawasaki. Tuttavia, la risposta immunitaria nei pazienti con malattia di Kawasaki è tipicamente caratterizzata da 'signature' proinfiammatorie, inclusi l'aumento dell'interleuchina (IL) 17 e un relativamente minore aumento delle citochine coinvolte nella sindrome da attivazione macrofagica (MAS), mentre i pazienti con MIS-C hanno alti livelli di IL-15 e interferone (IFN) γ nei casi più gravi, e oltre il 50% dei pazienti con MIS-C ha un pattern citochinico molto simile alla MAS. In un recente studio il sequenziamento

dell'esoma di 2 pazienti con MIS-C ha delineato un ruolo del gene SOCS1, nella via dell'IFN, nella predisposizione a citopenie autoimmuni associata all'infezione. Allo stesso modo, un altro studio di sequenziamento dell'esoma ha identificato difetti in XIAP e CYBB in 3 dei 18 pazienti sequenziati con MIS-C, mentre lo studio dell'RNA di pazienti con MIS-C ha rivelato una disregolazione delle risposte linfocitarie citotossiche all'infezione da SARS-CoV-2. Questi studi genetici suggeriscono una disregolazione della risposta infiammatoria come caratteristica di MIS-C, sebbene siano limitati a un piccolo numero di pazienti, per lo più di origine europea. Nel presente studio è stato praticato il sequenziamento dell'intero esoma in 45 pazienti principalmente di origine mediorientale con MIS-C paragonati a 25 bambini sani infettati da SARS-CoV-2, ma rimasti asintomatici o che avevano sviluppato solo lievi sintomi clinici. È quindi stato ipotizzato che varianti genetiche rare e deleterie che colpiscono i geni immuno-correlati siano maggiormente presenti in pazienti di origine mediorientale con MIS-C rispetto ai controlli e che tale variazione contribuirebbe all'insorgenza della malattia, ai sintomi ed esiti clinici e/o alla gestione della patologia.

Metodi

Progettazione dello studio, informazioni cliniche e demografiche dei partecipanti

Studio di coorte prospettico della durata di un anno (1 settembre 2020 - 31 agosto 2021), su 70 bambini di età 0-18 anni reclutati a Dubai o in Giordania, provenienti da paesi di lingua araba, includenti tutti i paesi del Medio Oriente, ad eccezione di Iran e Turchia. I pazienti sono stati divisi in 2 gruppi. Il primo gruppo era costituito da 45 pazienti con diagnosi di MIS-C, con criteri di inclusione per questo gruppo coerenti con la definizione del caso di MIS-C stabilita dall'OMS o dai CDC, con evidenza di infezione da SARSCoV-2 per positività di anticorpi anti SARS-CoV-2, RT-PCR, o recente esposizione a un caso confermato di COVID-19. Almeno 2 organi dovevano essere stati colpiti dalla malattia e i profili ematici di questi pazienti rivelavano un aumento dei marcatori di infiammazione. Criteri di esclusione: cardiopatia congenita, ritardo di crescita o altre condizioni associate. Il secondo gruppo è stato reclutato contemporaneamente e comprendeva 25 bambini sani (gruppo di controllo) che avevano avuto un'infezione da SARS-CoV-2 confermata da RT-PCR, ma asintomatici o con sintomi lievi. Gli individui nel gruppo di controllo venivano seguiti per 12 settimane per garantire che non fossero rilevati segni di MIS-C. Le variabili analizzate includevano informazioni demografiche, incluso paese di origine del paziente, segni e sintomi al momento del ricovero, marcatori infiammatori con profilo delle citochine, manifestazione cardiaca, decorso della malattia, ammissione alla terapia intensiva pediatrica (PICU), trattamento ed esito.

Sequenziamento dell'esoma, analisi Bioinformatica e filtrazione delle varianti

Il sequenziamento dell'intero esoma è stato eseguito dopo estrazione del DNA da sangue periferico utilizzando protocolli standard. Le 'library' arricchite sono state sottoposte a sequenziamento di nuova generazione (NGS) (2 × 150 bp) utilizzando una piattaforma altamente performante. I dati di sequenziamento sono stati elaborati utilizzando una pipeline bioinformatica su misura interna per conservare letture di sequenziamento di alta

qualità con una copertura superiore a 10 × in tutte le regioni di codifica. È stata data priorità alle varianti rare a carico di 186 geni potenzialmente implicati nella progressione di malattia in MIS-C, principalmente geni associati a risposte immunitarie, compresa la risposta cellulare alle citochine, l'immunità cellulo-mediata, e le vie di 'signaling' immunitario e dell'interferone.

Analisi di arricchimento e dell'interazione proteica

L'arricchimento di varianti genetiche rare e probabilmente deleterie in pazienti con MIS-C è stato determinato confrontando la proporzione di individui con almeno 1 allele funzionale nel gruppo MIS-C con quello nei controlli. Per l'analisi è stato utilizzato il test esatto di Fisher.

Analisi statistica

I pazienti sono stati divisi nei 2 gruppi in base alla presenza o all'assenza di variante genetica. È stato eseguito un test Mann-Whitney U per confrontare i risultati clinici e patologici, marcatori infiammatori, trattamento, gestione ed esiti. Le variabili sono state confrontate utilizzando il test esatto di Fisher.

Risultati

Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con MIS-C

Un totale di 45 pazienti con MIS-C sono stati reclutati prospetticamente nella coorte in studio (51.1% maschi; 66.7% originari di paesi del Medio Oriente; età media 6.7 anni), e 25 controlli (68% maschi; 96% originari di paesi del Medio Oriente; età media 7.4 anni). Trentasei pazienti (80%) avevano un test RT-PCR o test anticorpale positivo per infezione da SARS-CoV-2, mentre 9 (20%) avevano avuto contatto con pazienti con COVID-19. La durata media (SD) della febbre è stata di 5 giorni e tutti i pazienti avevano evidenza di infiammazione agli esami di laboratorio, compresa la linfopenia e/o marcatori infiammatori significativamente elevati, come proteina C-reattiva, velocità di eritrosedimentazione, D-dimero, ferritina, fibrinogeno e IL-6. Sintomi gastrointestinali e coinvolgimento mucocutaneo rappresentano le manifestazioni cliniche più comuni e sono stati riportati in 36 pazienti (80.0%). Sintomi neurologici sono stati riportati in 14 pazienti (31.1%) e alterazioni respiratorie sono state riportate in 12 pazienti (26.6%). Il coinvolgimento cardiaco è stato riportato in 22 pazienti (48.9%) e 19 pazienti (42.2%) avevano ipotensione e shock. Le manifestazioni cliniche presenti nella coorte analizzata erano coerenti con i risultati della letteratura scientifica.

Analisi genetica

Sono state rilevate 20 varianti eterozigoti troncanti a carico di 16 geni immuno-correlati (CD84, CD163, IFI44, IFI44L, IFIH1, IFNA21, IFNA4, IFNA6, IFNB1, IL22RA2, IRAK3, LY9, NLRP12, NLRP2, RAB27A e TLR6), in 14 pazienti con MIS-C. Viceversa, nel gruppo di controllo sono state rilevate solo 3 varianti troncanti in tutti i 186 geni (vs 20 nei pazienti con MIS-C), confermando ulteriormente il maggiore peso di tali varianti nel gruppo MIS-C. Inoltre, 6 dei 14 pazienti con MIS-C con varianti troncanti ospitavano 2 di questi varianti in 2 geni diversi, inclusi 2 pazienti che risultavano doppi eterozigoti per varianti troncanti in IL22RA2 e IFI44L e 1 paziente con 2 varianti in eterozigosi in IFNA6 e IFNA21. Risultati simili sono stati ottenuti quando l'analisi si è concentrata solo su pazienti con MIS-C risultati positivi al SARS-CoV-2, escludendo quelli con sola esposizione a

COVID-19. Sono state inoltre identificate 6 varianti rare missenso in 9 pazienti con MIS-C (3 dei quali portavano anche varianti troncanti dall'analisi di cui sopra) in 5 dei 14 geni (IFNAR2, IRF3, TLR3, TRAF3 e TRIM69) noti causare una forma grave di COVID-19 e nessuna nel gruppo di controllo. Complessivamente, in 19 pazienti con MIS-C (42.2%) sono state riscontrate varianti rare troncanti o missenso e 7 (36.8%) di questi pazienti avevano più di 1 variante. L'analisi combinata per entrambe le varianti missenso e troncanti ha mostrato che i pazienti con MIS-C avevano un carico maggiore di tali varianti rispetto al gruppo di controllo.

Analisi dei pathway e del network proteico

I geni con varianti più frequentemente riscontrate nei pazienti con MIS-C appartenevano ai pathway del 'signaling' del Toll-like receptor, del recettore del gene I-like inducibile dall'acido retinoico, della risposta immune interferone-mediata e del NOD-like receptor. Le interazioni riscontrate tra i prodotti dei geni IFNB1, IFNA21, IFNA4, IFNA6, IFNAR2, TRAF3, IRF3 e TLR3 indicano un ruolo della risposta immune IFN-mediata.

Associazioni delle caratteristiche genetiche con le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con MIS-C (Figura 1)

È stata analizzata l'associazione tra lo stato genetico dei pazienti con MIS-C e le loro caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio. Sulla base della distribuzione per età dei pazienti con MIS-C è stato osservato che nei pazienti di età inferiore ai 3 anni era più probabilmente presente una variante rara a carico dei geni immuno-correlati (7 pazienti con reperti genetici [36.8%] vs 2 senza risultati genetici [7.7%] avevano meno di 3 anni all'esordio). Non è stata trovata alcuna associazione clinica significativa tra reperti genetici e sintomi. La maggior parte dei marcatori di laboratorio sono risultati anormali in modo analogo in tutti i pazienti con MIS-C; quelli con riscontro di alterazioni genetiche avevano livelli di fibrinogeno più alti, ma questo risultato non risultava statisticamente significativo. Allo stesso modo, nessuna associazione è stata riscontrata quando l'analisi si è concentrata

solo su pazienti con MIS-C positivi per SARS-CoV-2, escludendo quelli con sola esposizione a COVID-19.

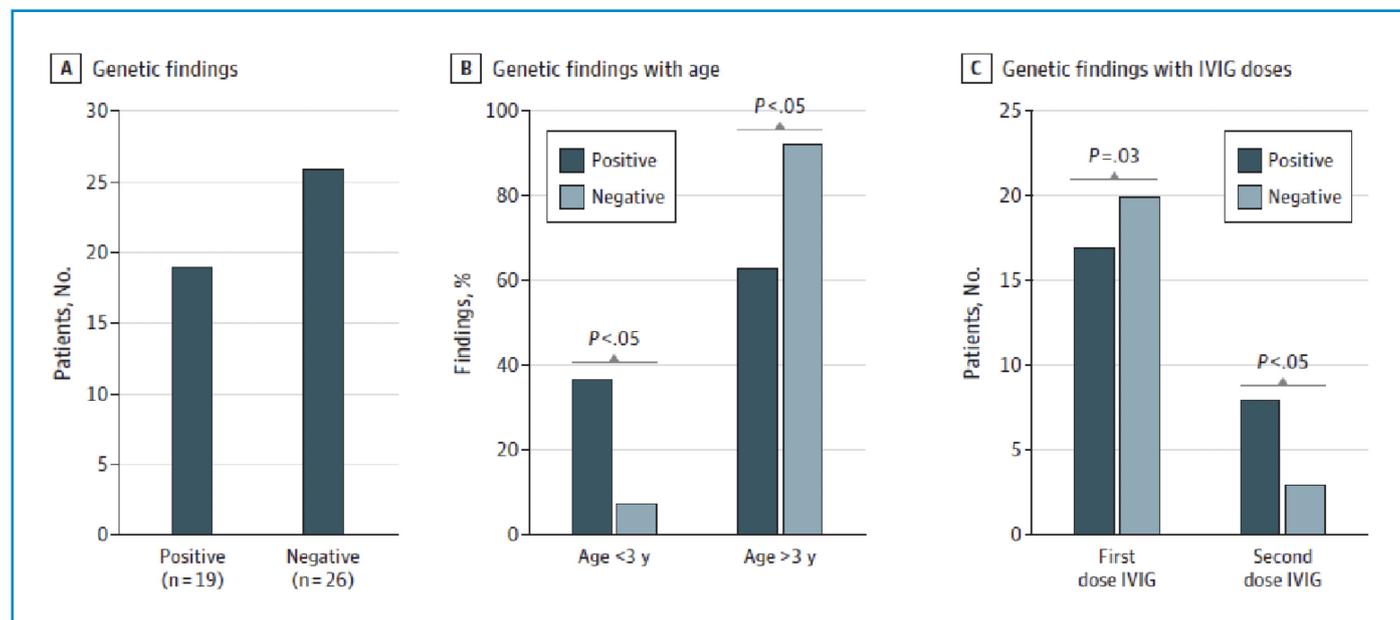
Gestione, decorso clinico e risultati

Tutti i pazienti sono guariti dopo una durata media della degenza di 6,5 giorni. Diciannove pazienti (42.2%) sono stati ricoverati in PICU. Trentasette pazienti (82.2%) hanno ricevuto almeno 1 dose elevata (2 g/kg) di IVIG per 12 ore. Degli 11 pazienti che hanno ricevuto 2 dosi di IVIG, in 8 sono state riscontrate alterazioni genetiche, suggerendo una possibile resistenza al trattamento in tali pazienti (persistenza della febbre, peggioramento della disfunzione d'organo, e aumento dei marcatori infiammatori che hanno richiesto l'intensificazione del trattamento, mediante seconda dose di IVIG). Trentuno pazienti (68.9%) sono stati trattati con corticosteroidi e 36 (80%) con aspirina. L'enoxxaparina è stata utilizzata in 9 pazienti (20,0%). Non è stata trovata alcuna associazione tra lo stato genetico e il trattamento con corticosteroidi, aspirina, enoxaparina o ossigeno. Da sottolineare che dei 7 pazienti che avevano più di 1 variante genetica, 5 sono stati ricoverati in PICU e hanno ricevuto un trattamento intensivo di cura (2 hanno ricevuto un trattamento ventilatorio invasivo e 3 non invasivo), 4 avevano disfunzioni cardiache e tutti avevano sintomi gastrointestinali. Non si sono verificati decessi tra i pazienti reclutati in questo studio.

Discussione

In questo studio di coorte, sono stati caratterizzati l'assetto genomico, il fenotipo clinico, i marcatori cellulari e infiammatori, e la gestione clinica e gli outcome della più grande coorte prospettica fino ad oggi studiata di pazienti con MIS-C del Medio Oriente. Anche se la presentazione clinica e i marcatori di laboratorio sono risultati in accordo con altri casi di MIS-C recentemente descritti, la nostra analisi ha rivelato nei pazienti un significativo aumento di varianti genetiche rare e probabilmente deleterie principalmente a carico di geni del 'signaling' del Toll-like receptor, del recettore del gene I-like inducibile all'acido retinoico, del

Figura 1. Reperti genetici e associazioni con età dei pazienti e risposta al trattamento



NOD-like receptor e delle vie di risposta immunitaria mediate dall'interferone riscontrate, rispetto all'età degli stessi pazienti ed ai controlli dello studio, e alla popolazione generale di diversa origine. Tali pathway coincidono con i profili immunologici attualmente caratterizzati nei pazienti con MIS-C. Peraltro, il profilo trascrittomico dei pazienti con COVID-19 grave ha mostrato una sovra regolazione dell'espressione di citochine e chemochine, tra cui CCL2, CCL22, CXCL9, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL3/MIP-1A, e CCL4/MIP1B e CXCL12, e di alcuni geni codificanti per interferoni e interleuchine, tra cui IFIH1, IFI44, IFIT1, e IL10. Analogamente, il profilo trascrittomico a singola cellula di individui con SARS-CoV-2 più anziani ha identificato ridotta espressione degli interferoni di tipo 1 e 2 e di geni di difesa antivirale in alcuni tipi di cellule, il che indica una diminuzione della capacità immunitaria in risposta all'infezione da SARS-CoV-2 negli anziani. Tali studi e i risultati genetici di quello attuale indicano possibili convergenze dei meccanismi patogenetici tra MIS-C e COVID-19 grave riguardo i pathway chiave immuno-correlati. Ciononostante, sebbene l'analisi genetica abbia rivelato alcune sovrapposizioni con la via IFN di tipo 1, che è risultata essere alterata nei pazienti con COVID-19 grave, la maggior parte delle varianti, in particolare quelle troncanti, identificate nei pazienti con MIS-C sono a carico di geni che non si sovrappongono a quelli dei pazienti con COVID-19 grave. Questi risultati suggeriscono che MIS-C e COVID-19 grave hanno determinanti genetici distinti, pur potendo alterare pathway infiammatori simili. La presente analisi genetica ha anche rivelato che 7 dei 19 pazienti avevano più di 1 variante, tra cui 2 pazienti con 4 e 3 varianti, rispettivamente, evidenziando ulteriormente il peso significativo di variazioni genetiche nella coorte studiata. Nonostante il tasso relativamente alto di matrimonio tra consanguinei nella popolazione esaminata, l'analisi non ha identificato alcuna variante omozigote rara che potrebbe predisporre individui alla MIS-C. È possibile che tali varianti possano portare a gravi disturbi immuno-correlati indipendentemente dall'infezione da SARS-CoV-2. I pazienti con tali varianti o disordini genetici potrebbero essere stati esclusi dallo studio attuale poiché quasi tutti i pazienti non avevano una storia medica significativa prima dell'infezione virale.

Limiti dello studio

L'analisi effettuata ha mostrato che i pazienti con alterazioni genetiche tendono ad avere un esordio precoce della malattia (età inferiore ai 3 anni) e una possibile resistenza al trattamento con IVIG; tuttavia, non sono state trovate associazioni significative tra marcatori infiammatori o sintomi clinici e reperti genetici. Tali associazioni non possono essere escluse per diversi motivi. Innanzitutto, la dimensione del campione potrebbe non essere in grado di rilevare tali associazioni, e poi la popolazione di pazienti, principalmente di origine mediorientale. In secondo luogo, lo studio è stato progettato principalmente per identificare varianti rare e con effetto relativamente rilevante in geni selezionati (N = 186). Pertanto, il contributo genetico di varianti non codificanti o varianti deleterie al di fuori dei 186 geni studiati o attribuibili a varianti poligeniche a piccolo effetto attraverso lo studio del genoma non può essere escluso. Sono ancora necessarie dimensioni del campione più grandi per identificare il contributo genetico di un così piccolo effetto. Un altro limite di questo studio è la mancanza di analisi funzionali per caratterizzare il meccanismo(i) attraverso il quale i geni mutati contribuiscono all'in-

sorgenza della malattia MIS-C e/o la sua progressione. Tuttavia, la maggior parte delle varianti sono altamente concentrate nei geni dell'IFN e Toll-like receptor, suggerendo che l'alterazione di tali vie potrebbe essere alla base della tempesta citochinica e della disregolazione dei marcatori infiammatori in tali pazienti. L'analisi del network proteina-proteina conferma ulteriormente la significativa interazione e convergenza della maggior parte dei geni mutati in questo studio.

Conclusioni

I risultati di questo studio di coorte su pazienti provenienti dal Medio Oriente suggeriscono che la MIS-C presenta una componente genetica. Ciò apre la strada a ulteriori studi progettati per includere un numero maggiore di pazienti provenienti da background diversi insieme ad analisi funzionali per caratterizzare completamente il contributo della genetica in questa nuova entità patologica.

Commento

Le caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti con sindrome infiammatoria multisistemica nei bambini (MIS-C) sono abbastanza bene definite [1], sebbene una certa variabilità esista tra le diverse popolazioni. Le potenziali basi genetiche della MIS-C viceversa sono ancora poco note e pochi lavori scientifici sono disponibili [2-4], in cui viene analizzato per lo più un numero limitato di pazienti. L'articolo ha il merito di provare a fare luce sugli aspetti genetici delle MIS-C. Tuttavia, per l'esiguità del campione e l'impostazione dell'analisi genetica, che, sebbene in grado di rilevare alterazioni di un certo rilievo e correlate con alcuni aspetti clinici, è ristretta ad un numero limitato di geni, lo studio risulta non esauriente, pur restando uno dei primi tentativi di approccio genetico al problema. Sarebbero auspicabili ulteriori studi su campione più ampio e popolazioni diverse, utilizzando tecnologie genetiche di nuova generazione più efficaci, quali lo studio dell'esoma, che consenta di analizzare anche geni non necessariamente implicati nei pathway usualmente coinvolti nella MIS-C.

1. Dufort EM, Koumans EH, Chow EJ, Rosenthal EM, Muse A, Rowlands J, Barranco MA, Maxted AM, Rosenberg ES, Easton D, Udo T, Kumar J, Pulver W, Smith L, Hutton B, Blog D, Zucker H; New York State and Centers for Disease Control and Prevention Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Investigation Team. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in New York State. *N Engl J Med.* 2020 Jul 23;383(4):347-358. doi: 10.1056/NEJMoa2021756. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32598830; PMCID: PMC7346766.

2. Lee PY, Platt CD, Weeks S, Grace RF, Maher G, Gauthier K, Devana S, Vitali S, Randolph AG, McDonald DR, Geha RS, Chou J. Immune dysregulation and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in individuals with haploinsufficiency of SOCS1. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Nov;146(5):1194-1200.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2020.07.033. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32853638; PMCID: PMC7445138.

3. Chou J, Platt CD, Habiballah S, Nguyen AA, Elkins M, Weeks S, Peters Z, Day-Lewis M, Novak T, Armant M, Williams L, Rockowitz S, Sliz P, Williams DA, Randolph AG, Geha RS; Taking on COVID-19 Together Study Investigators. Mechanisms underlying genetic susceptibility to multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Sep;148(3):732-738.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2021.06.024. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34224783; PMCID: PMC8252701.

4. Mogensen TH. Human genetics of SARS-CoV-2 infection and critical COVID-19. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Feb 24:S1198-743X(22)00097-0. doi: 10.1016/j.cmi.2022.02.022. Epub ahead of print. PMID: 35218979; PMCID: PMC8865963.