



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata (LM-6)

**RUOLO DELLA MATURAZIONE DELL'AFFINITA' DELLA RISPOSTA
ANTICORPALE NELLA DETERMINAZIONE DEL POTERE NEUTRALIZZANTE
CONTRO DIVERSE VARIANTI DI SARS-CoV-2 E DELLA SUA PERSISTENZA NEL
TEMPO**

**ROLE OF THE AFFINITY'S MATURATION OF THE ANTIBODY RESPONSE IN
THE NEUTRALIZING ACTIVITY AGAINST DIFFERENT VARIANTS OF
SARS-CoV-2 AND IN ITS PERSISTENCE**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Cori Irene (matricola 1101919)

Cov 19

Relatore, Chiar.mo Prof.
Menzo Stefano

Correlatore:
Dott. ssa Longo Roberta

Sessione Estiva

Anno Accademico 2022/2023

A dicembre 2019, è comparso un nuovo virus respiratorio, appartenente alla famiglia dei *Coronaviridae*, nella città cinese di Wuhan, successivamente denominato SARS-CoV-2. Nei mesi successivi, i casi di infezione sono cresciuti esponenzialmente in tutto il mondo principalmente a causa della modalità di trasmissione del virus e dell'assenza delle misure di prevenzione atte a limitare la diffusione del patogeno.

A seguito di questa rapida diffusione, l'11 marzo 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha dichiarato lo stato di pandemia.

L'estrema diffusione del virus ha determinato la comparsa di nuove varianti virali. Ad oggi sono stati riscontrati in tutto il mondo, 767.518.723 casi confermati di infezione da SARS-CoV-2 e 6.947.192 decessi ^[1]. L'infezione da SARS-CoV2, responsabile della malattia COVID-19, è stata caratterizzata principalmente da sindromi respiratorie alle alte e basse vie aeree a cui possono essere aggiunti altri sintomi quali: gastroenteriti, epatiti, encefaliti e, nei casi più gravi, sindromi multiorgano ^[2].

Fin da subito, la ricerca scientifica si è impegnata a fondo nello sviluppo di vaccini che proteggessero la popolazione dalla malattia grave causata da questo patogeno, generando una immunitaria specifica duratura.

Lo scopo di questa tesi è risieduto nello studio del potere neutralizzante degli anticorpi prodotti dal sistema immunitario a seguito di vaccinazione con tre dosi di vaccino e/o infezione naturale.

Lo studio è stato svolto sul personale della Direzione Sanitaria Torrette (DST) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona su partecipazione volontaria.

Sono stati considerati sia coloro che hanno ricevuto solo la somministrazione di tre dosi di vaccino contro SARS-CoV-2 sia coloro che hanno avuto un'infezione naturale prima, durante o dopo le vaccinazioni. Inoltre, i gruppi in cui sono stati suddivisi i partecipanti alla ricerca hanno compreso personale che è stato infettato da differenti varianti virali nel corso della pandemia.

Sommario

INTRODUZIONE	7
1.1 La famiglia dei <i>Coronavirus</i>	7
1.2 SARS-CoV-2 e i salti di specie	9
1.3 Il virus SARS-CoV-2: la sua struttura	10
1.4 Il genoma virale	12
1.5 Le proteine strutturali del SARS-CoV2	22
1.6 Il ciclo replicativo	24
1.6.1 L'ingresso del virus.....	24
1.6.2 Replicazione ed espressione del genoma virale.....	25
1.7 Assemblaggio e rilascio dei virioni.....	29
2. VOCs (<i>Variants of Concern</i>) e VOIs (<i>Variants of Interest</i>) del <i>Coronavirus</i>	32
3. Trasmissione	39
4. Patogenesi.....	40
4.1 Fisiopatologia del COVID-19	41
5. Immunità.....	46
5.1 Immunità innata	47
5.2 Immunità adattativa ^[2]	60
5.3 Intervento delle citochine, morte cellulare e tempesta citochinica ^[31]	74
6. Diagnosi.....	78
6.1 Saggi molecolari classici e rapidi	78
6.2 Ricerca dell'antigene virale	81
6.3 Saggi sierologici e chemiluminescenti.....	82
6.4 Saggi di neutralizzazione	85
7. Vaccini	86
8. Opzioni terapeutiche	93
9. Identificazione mediante isolamento virale.....	95
10. Materiali e metodi	97
10.1 Sequenziamento NGS Illumina	97
10.2 Coltura cellulare di cellule Vero E6	99
10.3 Conta cellulare.....	102
10.4 Isolamento virale	104
10.5 Preparazione dello stock virale	106

10.6 Titolazione dello stock virale	107
10.7 Saggio di microneutralizzazione	110
10.8 Fissaggio e colorazione delle cellule e lettura delle piastre	115
10.9 Soggetti dello studio	118
10.10 Analisi statistica	120
11. Scopo dello studio	120
12. Risultati	122
12.1 Anticorpi IgG anti-Spike leganti (espressi in BAU/ml) prodotti dopo la terza dose e l'infezione naturale.....	123
12.2 Anticorpi neutralizzanti contro le diverse varianti virali dopo la terza dose e l'infezione naturale.....	126
12.3 Capacità neutralizzante 20 giorni dall'ultima stimolazione (massiva produzione anticorpale) contro le diverse varianti.....	127
12.4 Relazione tra gli intervalli di tempo trascorsi tra le successive immunizzazioni e il potere neutralizzante.....	134
12.5 Decadimento dell'attività neutralizzazione e di legame degli anticorpi anti spike SARS-CoV-2	140
12.6 Efficienza neutralizzante specifica degli anticorpi anti-Spike.....	143
13. Discussione e conclusioni	145
14. Bibliografia	153

INTRODUZIONE

1.1 La famiglia dei *Coronavirus*

La famiglia dei *Coronavirus* è parte dell'ordine *Nidovirales* e del sottordine dei *Coronaviridae*. Essa ha compreso la sottofamiglia degli *Orthocoronavirinae*, costituita da quattro generi: alfacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus e deltacoronavirus (Figura 1). I primi due generi (alfacoronavirus e betacoronavirus) hanno infettato esclusivamente mammiferi ^[3], mentre i secondi (gammacoronavirus e deltacoronavirus) anche specie aviarie ^[12].

Fra i *Coronavirus* che infettano l'uomo sono stati inclusi virus che provocano sintomatologie respiratorie più lievi come 229E (HCoV-229E), il NL63 (HCoV-NL63), HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, e virus che hanno determinato sindromi più gravi come SARS-CoV e il SARS-CoV-2, e MERS-CoV, i quali hanno provocato la comparsa di importanti outbreak negli ultimi 10 anni (Figura 1) ^[3].

In particolare, il SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) emerso nel 2003 era un virus il cui reservoir era rappresentato dai pipistrelli. Il tasso di letalità della malattia causata da SARS-CoV è stato stimato tra il 20% e il 30%.

1.2 SARS-CoV-2 e i salti di specie

SARS-CoV-2 è stato il responsabile della pandemia che si è diffusa verso la fine del 2019 dalla città di Wuhan, Cina. È stato un virus appartenente al genere *β-Coronavirus*, con un'identità di sequenza del 79% con SARS-CoV e del 50% con MERS-CoV [2].

Il reservoir di SARS-CoV-2 è stato ipotizzato essere il pipistrello, il quale ha trasmesso il virus ad un ospite intermedio, di cui ancora non si conosce l'identità. Esso ha poi permesso il verificarsi del salto di specie di questa zoonosi ad altre specie come animali domestici (quali cani e gatti), visoni, criceti e infine roditori.

Attraverso diversi studi epidemiologici si è arrivati alla conclusione che il virus ha avuto come luogo primario di diffusione un mercato di Wuhan, dove era consuetudine vendere carne macellata e animali vivi, compresi alcuni di cui stata vietata la vendita a causa della precedente epidemia di SARS-CoV diffusasi nel 2003 nelle stesse circostanze. Grazie alla sua trasmissione per via aerea interumana, è riuscito a diffondersi prima tra i lavoratori e i clienti del mercato, e successivamente propagata in città. Da qui, si è diffuso dapprima in Cina e successivamente in tutto il mondo.

1.3 Il virus SARS-CoV-2: la sua struttura

SARS-CoV-2 è un virus pleiomorfo tipicamente rotondeggiante con un diametro di 80-160 nm che possiede un envelope, una membrana formata da un doppio strato fosfolipidico, sulla cui superficie sono esposte le glicoproteine M (membrana), S (Spike) ed E (envelope) (Figura 2).

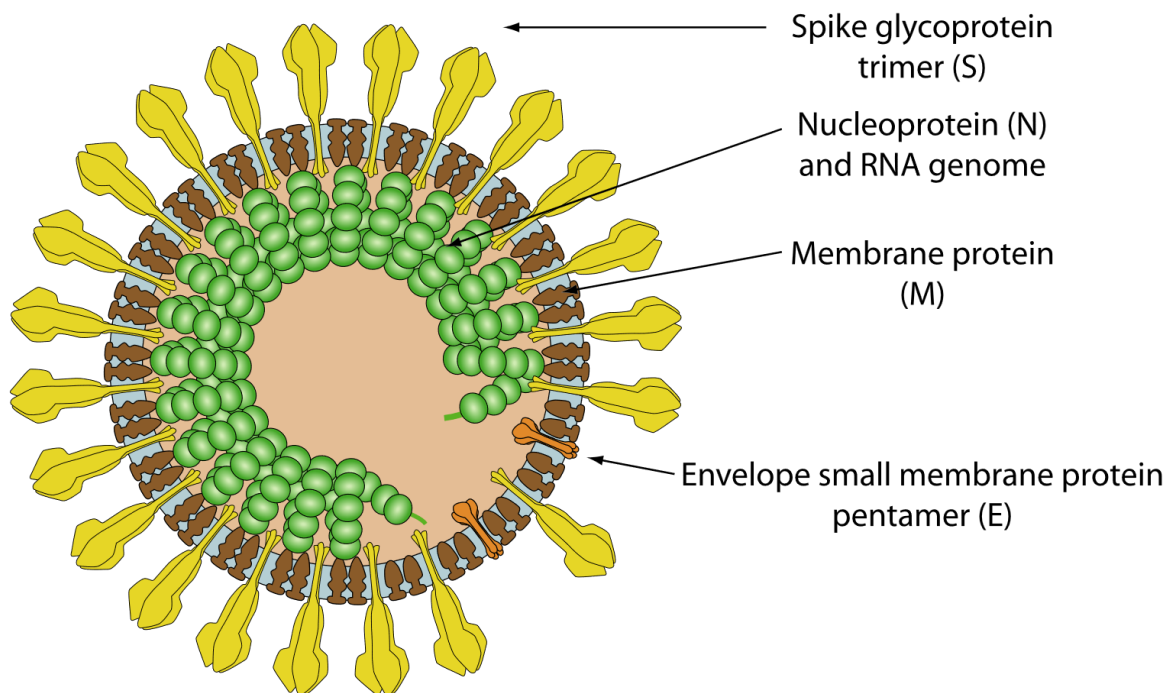


Figura 2. Struttura dei Coronavirus. Betacoronavirus ~ ViralZone (expasy.org)

Il nome *Coronavirus* proviene dalla presenza delle proteine Spike, che conferiscono al virus il classico aspetto a corona. Essa è a forma di clava ed è organizzata in due domini S1 e S2 che agiscono come omotrimeri.

La proteina Spike ha una dimensione di 1273 amminoacidi ed è formata dai domini S1 e S2. Il dominio S2 è caratterizzato da una regione (912-984) con ripetizioni di sette amminoacidi (arginine e istidine, HR) che si assemblano in una struttura elicoidale a forcina ed intersecano sei fasci di eliche.

La proteina S contiene una regione, detta receptor-binding domain (RBD), che permette il legame al recettore umano ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*) e media l'ingresso all'interno della cellula ospite ^[16].

Rispetto ad altri virus simili isolati dai pipistrelli, la proteina S possiede un'inserzione di quattro residui amminoacidici (PRRA) nella giunzione tra le subunità S1 e S2 della proteina. Questo genera un sito di clivaggio riconosciuto da proteasi e furine, il cui taglio riduce la stabilità della proteina S e facilita l'adattamento conformazionale richiesto per il legame dell'RBD al suo recettore ^[16] (Figura 3).

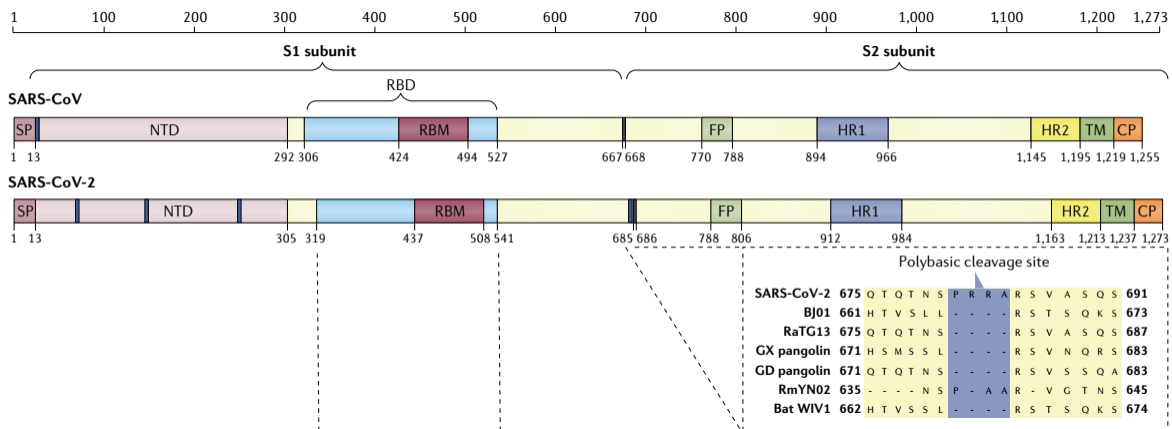


Figura 3. Rappresentazione e confronto della proteina Spike di SARS-CoV2 e SARS-CoV. Ben Hu, Hua Guo, Peng Zhou & Zheng-Li Shi, "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19", Nature Reviews Microbiology volume 19, pages141–154 (2021) [16].

Al di sotto dell'envelope è presente un nucleocapside composto dalla proteina N [2]. Quest'ultima si complessa con il genoma virale e lo stabilizza.

1.4 Il genoma virale

Il genoma di SARS-CoV-2 è rappresentato da un singolo filamento di RNA a polarità positiva monocatenario e non segmentato (ssRNA+) lungo circa 30 kbp, con un contenuto in G+C del 32-43% [6].

L'organizzazione del genoma prevede un'estremità 5' seguita da una regione leader e una regione UTR (*untranslated region*). L'ultima porzione del genoma contiene una regione 3'-UTR e la coda di poli-adenine (o poly-A).

Le regioni 5'-UTR e 3'-UTR sono regioni non tradotte coinvolte nelle interazioni RNA-RNA e RNA-proteine virali (Figura 4).

Posizionate a monte di ogni gene strutturale sono presenti quattro sequenze conservate, le sequenze di regolazione della trascrizione (TRS), che hanno un ruolo nella produzione di RNA messaggeri subgenomici (sg mRNA) durante la replicazione virale.

Il genoma comprende 11 ORF (*Open Reading Frames*): la ORF1ab copre circa i 2/3 dell'intero genoma e codifica per 16 proteine non strutturali (nsp) (Tabella 1), fra le quali le proteasi virali e la polimerasi coinvolta nella replicazione del genoma virale (Figura 5). Questa ORF viene inizialmente tradotta in una poliproteina che subisce poi l'azione delle proteasi virali, la proteinasi papaina-like (PL^{pro}) e la proteasi 3C-like (3CL^{pro} o M^{pro}), che la andranno a frammentare nelle varie proteine non strutturali.

NSP1	Degradazione dell'mRNA della cellula ospite, Inibizione della traduzione, Arresto del ciclo cellulare, Inibizione del signaling di IFN.
NSP2	Sconosciuta.
NSP3	Papain-like proteases (processamento della poliproteina), Poly(ADP-ribose) binding, Antagonista dell'IFN, Legame agli acidi nucleici.
NSP4	Formazione di DMV (vescicole del reticolo endoplasmatico).
NSP5	Main protease (processamento della poliproteina).
NSP6	Formazione di DMV (vescicole del reticolo endoplasmatico).
NSP7	ssRNA binding.
NSP8	Parte del complesso di replicazione.
NSP9	Parte del complesso di replicazione.
NSP10	Parte del complesso di replicazione.
NSP11	Sconosciuta.
NSP12	RNA Polimerasi-RNA dipendente.
NSP13	Elicasi. RNA 5'-Nucleoside triphosphatase activity.
NSP14	3'-to-5' exoribonuclease RNA cap formation (guanine-N7-methyltransferase).
NSP15	Endonucleasi.
NSP16	RNA cap formation (2' O-methyltransferase).

Tabella 1. Le Nsp del genoma del SARS-CoV2, le proteine per cui codificano e la loro funzione.

La restante parte del genoma è composto da ORF che codificano per le proteine strutturali: S, E, M, N e le proteine accessorie 3a, 6, 7a e b, 8 [6].

Una caratteristica fondamentale del genoma di SARS-CoV-2 è la sua alta frequenza di ricombinazione. Inoltre, il virus possiede enzimi virali, come la RNA Polimerasi RNA-dipendente, aventi la capacità di produrre mutazioni (come inserzioni, delezioni, transversioni, ecc.) durante la replicazione, le quali vengono solo parzialmente corrette dall'attività esoribonucleasica della Nsp14.

L'enzima chiave durante la replicazione del genoma virale è la RNA Polimerasi RNA-dipendente o Nsp12 o RdRp. È un enzima di 932 residui caratterizzata da 2 domini: il dominio NiRAN e il dominio polimerasico (Figura 6, Figura 7).

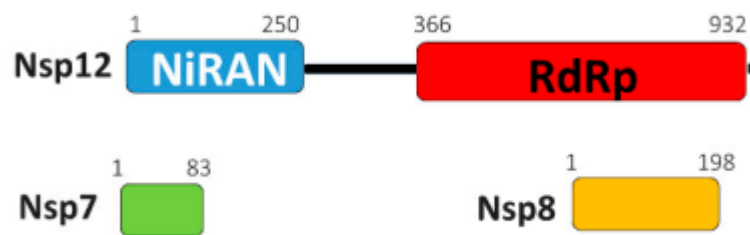


Figura 6. L'organizzazione dei domini della Nsp12 o RNA Polimerasi RNA-dipendente, con i suoi cofattori Nsp7 e Nsp8. Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

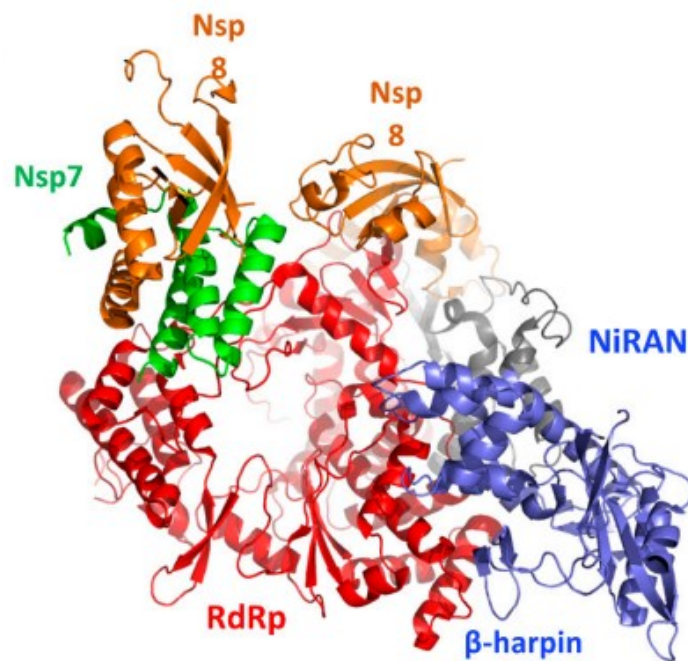


Figura 7. L'organizzazione della Nsp12 con i suoi cofattori Nsp7 e Nsp8. Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

Il dominio N-terminale della Nsp12 è altamente conservato nell'ordine dei *Nidovirus* così come la sua attività di nucleotidilazione, che gli conferisce il nome di NiRAN, derivante da nucleotidiltransferasi associata alla RdRp dei *Nidovirus*. Questo dominio è composto da α e β -foglietti composti da 8 α -eliche e 5 β -foglietti.

All'estremità N-terminale della forcina β (cioè, la regione che comprende i residui 29-50) interagisce con il palmo della RdRp; ciò determina un'azione chinastica.

Il dominio C-terminale della RNA-Polimerasi RNA-dipendente o Nsp12 (residui 366-920) crea una conformazione a mano destra, comprendente i subdomini dita (fingers), palmo (palm) e pollice (thumb), tipici della struttura delle RNA Polimerasi (Figura 8).

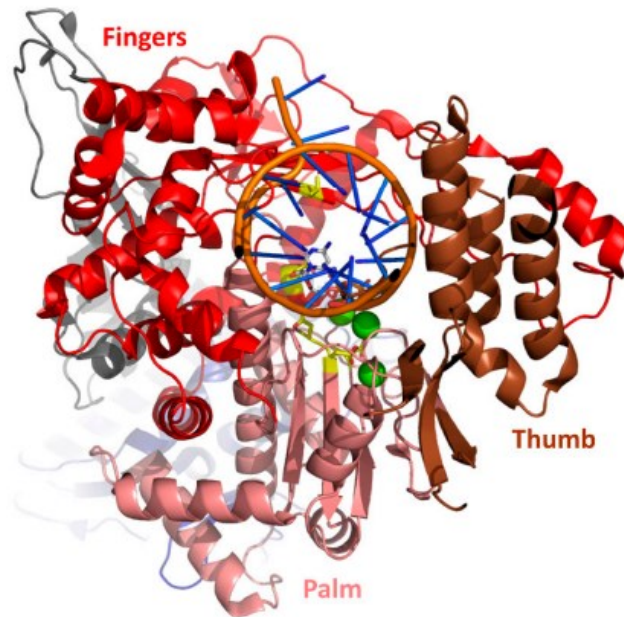


Figura 8. I subdomini della RNA Polimerasi RNA-dipendente (RdRp o Nsp12). Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

La RNA Polimerasi ha un ciclo catalitico composto da multipli e successivi step. I siti catalitici sono due residui amminoacidici, Asp618 e Asp760, spesso coadiuvati dagli Asp623 e Asp761, i quali riconoscono rispettivamente l'NTP-trifosfato e cationi bivalenti.

Un'altra proteina che interviene nel processo replicativo del SARS-CoV2 è la Nsp14 che possiede un'azione 3'→5'-esoribonucleasica. Essa contiene due domini separati da una regione a cerniera altamente conservata:

- il dominio N-terminale (ExoN): è dotato di attività esoribonucleasica, include tre motivi conservati (DE, E, D o “DEED” comprendente i residui Asp90, Glu92, Gli191, Asp272) che conferiscono un'attività di proofreading, un β-foglietto centrale formato da 5 β-strand, fiancheggiati da α-eliche.
- il dominio al C-terminale: possiede un'attività N7-guanina-metiltransferasica (N7-MTase) coinvolto nella formazione del cap dell'RNA messaggero, grazie alla demetilazione del suo coenzima S-adenosil metionina (SAM). Il 5'-cap è fondamentale per i genomi virali a RNA a polarità positiva perché mantiene la stabilità dell'mRNA, permette la sua traduzione e concorre all'evasione della risposta immunitaria dell'ospite.

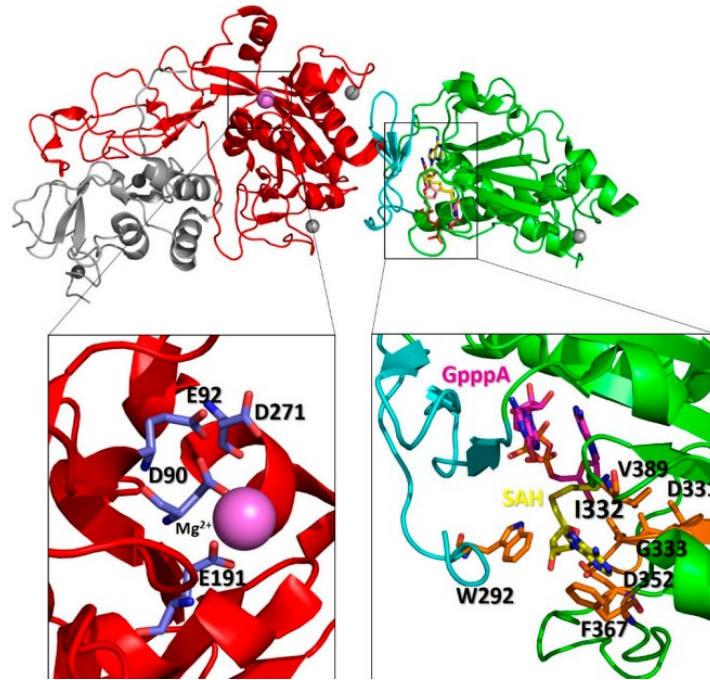


Figura 9. Rappresentazione dell'homology model del complesso Nsp14-Nsp10 usando la struttura del suo omologo SARS-CoV come template (PDB code 5C8S, covered region 1-131 in Nsp10 e 1-525 in Nsp14). Gli atomi di zinco sono evidenziati in grigio e gli ioni magnesio sono mostrati come sfere color magenta. Nelle finestre sono presentati i siti catalitici: quello del dominio ExoN è in stick blu, quello del dominio N7-MTase in stick arancio. Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

Il cofattore Nsp10, composto da un dominio ad elica e da un β -foglietto, interagisce con il dominio ExoN, potenziando di almeno 35 volte la sua attività nucleolitica (Figura 9, Figura 10).



Figura 10. I domini strutturali delle Nsp14 e Nsp10 di SARS-CoV2. Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

Uno step fondamentale nella replicazione dei genomi virali è la formazione del 5'-cap: si verifica, contrariamente a quello che avviene nelle cellule, all'interno del citoplasma. La reazione prevede l'aggiunta della 7-metilguanosa (m^7G), legata al 5'-fosfato del primo nucleotide della catena di RNA tramite il ponte trifosfato (ppp).

Il processo di formazione del 5'-cap inizia con l'idrolisi del 5' γ -fosfato della catena di RNA di nuova formazione (pppN-RNA) mediata dalla 5'-trifosfatasi, cioè l'elicasi Nsp13.

Successivamente una GTPasi trasferisce una molecola di GMP al 5'-difosfato della catena di RNA (ppN-RNA) determinando la formazione di GpppNRNA.

A questo punto si compie la metilazione del cap nella posizione N7 della guanosa tramite l'intervento del dominio C-terminale N7-MTasico della Nsp14, formando il cap-0 (m^7GpppN -RNA), usando la S-adenosil metionina come donatore del metile ^[15]. Qui la Nsp16, con la sua attività 2'O-metiltransferasica dipendente da SAM, promuove l'aggiunta del gruppo metilico sulla posizione 2'O del ribosio, creando in definitiva il cap-1 ($m^7GpppNm$ -RNA) (Figura 11).

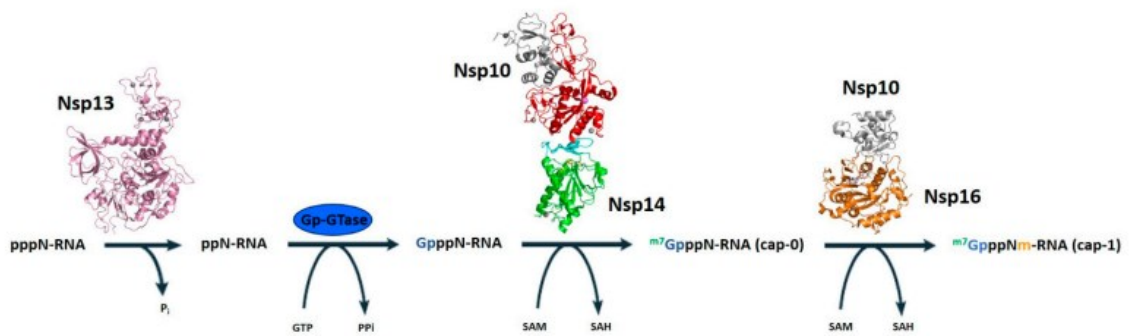


Figura 11. La sintesi del cap dell'mRNA di SARS-CoV2. In rosa la Nsp13, la GTasi, in rosso la Nsp14, in arancio la Nsp16, in grigio il cofattore Nsp10. Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squegna, Giovanni Maga, Rita Berisio, "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping", 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/> [15].

1.5 Le proteine strutturali del SARS-CoV2

Le proteine strutturali del SARS-CoV-2 sono le seguenti con le rispettive funzioni:

- la proteina Spike interagisce con il recettore cellulare durante la fase di ingresso del virus. Il recettore utilizzato dal SARS-CoV-2 è hACE2 (convertasi dell'angiotensina 2 umana). Questo recettore è presente sulla superficie di diverse cellule dell'albero respiratorio, come trachea, bronchi, ghiandole sierose bronchiali e alveoli bronchiali, così come monociti e macrofagi alveolari ^[6]. L'ACE2 è espresso anche in cellule endoteliali delle arterie e delle vene, neuroni cerebrali, cellule immunitarie, cellule epiteliali tubulari dei reni, cellule mucosali dell'intestino e cellule epiteliali dei tubuli renali⁶. Il recettore ACE2 è composto da 805 amminoacidi, possiede un singolo dominio

extracellulare N-terminale contenente il sito catalitico attivo, una porzione legante la membrana al C-terminale e un zinc-binding domain che agisce da carbossipeptidasi [8].

- la proteina M è la proteina di membrana del virus SARS-CoV-2 più abbondante. Ha tre domini transmembrana (TMD) che interagiscono con l'envelope [5] e sono coinvolti nell'oligomerizzazione della proteina M. Quest'ultima guida la particella virale nel lume degli organelli membranosi intracellulari, come i compartimenti intermedi del reticolo endoplasmatico (ER) e dell'apparato del Golgi [5] e conferisce la rigidità strutturale alla particella in contiguità con il nucleocapside.
- la proteina E è presente in minor quantità, è largamente espressa all'interno della cellula infettata ma solo una piccola quantità viene utilizzata durante la fase di assemblaggio dei nuovi virioni. La proteina E interagendo con la proteina M, ha la capacità di deformare la membrana determinando la sua curvatura. Inoltre, la co-sintesi delle proteine M ed E è necessaria per la formazione delle virus-like particles (VLP).
- la nucleoproteina N è costituita da un peptide monomero di 50 kDa e ha il compito di legare l'RNA virale creando un complesso elicoidale di ribonucleoproteine (RNP). La proteina N ha una struttura a multiplo

dominio che comprende un dominio di legame all'RNA all'estremità N-terminale (NTD), un linker ricco in serina e arginina (SR) e un dominio di dimerizzazione all'estremità C-terminale (CTD). Inoltre, la nucleoproteina interagisce con la proteina M e permette l'assemblaggio della particella virale.

1.6 Il ciclo replicativo

1.6.1 L'ingresso del virus.

L'infezione virale esordisce con l'attacco della particella virale alla cellula ospite tramite l'interazione tra il dominio S1 della proteina Spike e la membrana cellulare.

Il dominio S2 della proteina Spike media la fusione tra la membrana virale e quella della cellula interagendo con il recettore ACE2 ^[6].

Un'altra molecola spesso coinvolta in questa fase è la TMPRSS2, una serina-proteasi transmembrana di tipo II, che media il clivaggio del dominio S2 della Spike e promuove l'ingresso virale all'interno della membrana (via di ingresso precoce) ^[10].

A seguito dell'endocitosi del virus (via di ingresso tardiva), la subunità S2 promuove il processo di fusione della membrana all'interno della cellula ospite ^[9]. Questa fase è supportata dalle catepsine lisosomiale L e B (catL e

catB) le quali clivano la proteina S, determinando l'ingresso del virus nel compartimento cellulare, determinando il processo di uncoating ^[10,12].

1.6.2 Replicazione ed espressione del genoma virale

Il rilascio del genoma virale all'interno del citoplasma della cellula ospite consente la sua immediata traduzione trattandosi di un RNA messaggero ^[12].

La traduzione delle ORF1a e ORF1b determina la produzione di due poliproteine (pp1a e pp1ab), dovuta ad un frameshift di un nucleotide che fa sovrapporre le due ORF ^[12] (Figura 12). Questo causa una maggiore produzione della pp1a di circa 1.4-2.2 volte maggiore della produzione della pp1ab.

Da queste poliproteine si formano 16 proteine non strutturali (Nsp) tramite scissioni proteolitiche co-traduzionali e post-traduzionali mediate da due cisteine proteasi (PL^{pro} e 3CL^{pro}): dalla pp1a si originano le Nsp1-11, mentre dalla pp1ab le Nsp1-10 e Nsp12-16 ^[12].

Il taglio proteolitico della nsp1 avviene rapidamente in modo che essa possa svolgere la sua azione sulla cellula ospite. Essa agisce interrompendo il ciclo, interagendo con la subunità ribosomiale 40S della cellula ospite, provocando il taglio endonucleolitico vicino al 5'-UTR dell'mRNA ospite, degradandolo. L'mRNA virale, al contrario, non è suscettibile al taglio mediato dalla nsp1 grazie alla presenza della sequenza leader 5' ^[32].

A questo punto le altre Nsp agiscono per attivare il complesso di replicazione e traduzione virale (“replication/transcription complex”, RTC) localizzandosi in compartimenti cellulari che possano favorire il ciclo replicativo:

- le Nsp2-11 svolgono funzioni che supportano il complesso RTC virale, come la modulazione delle membrane intracellulari, l’evasione della risposta immunitaria e la fornitura di cofattori per la replicazione,
- le Nsp12-16 svolgono attività enzimatiche coinvolte nella sintesi dell’RNA, RNA-proofreading e modificazioni dell’RNA.

In particolare, la sintesi del genoma virale si verifica grazie alla RNA-Polimerasi RNA-dipendente, e ai suoi due cofattori Nsp7 e Nsp8, dove l’ultima possiede un’attività di primasi ^[12].

La Nsp14 possiede un’attività 3’ → 5’-esonucleasica che partecipa alla sintesi dell’RNA grazie alla sua funzione di RNA proofreading.

La Nsp10 e il suo cofattore Nsp13 svolgono l’azione di 5’-trifosfatasi, le Nsp14 e Nsp16 svolgono rispettivamente le funzioni N7-metiltransferasica e 2’-O-metiltransferasica; tutte queste proteine sono impiegate nella formazione del 5’-cap del genoma virale ^[12].

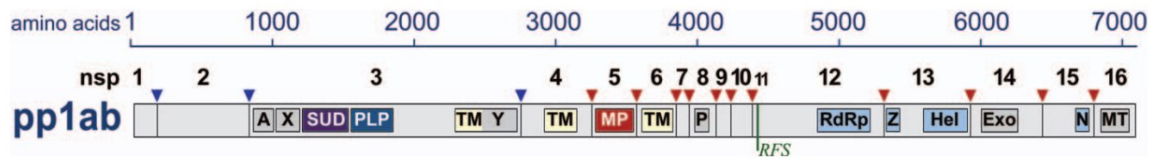


Figura 12. La poliproteina pp1ab del Coronavirus. I prodotti dei tagli determinati dalla replicasi (nsp1-16) sono numerati, i domini conservati sono evidenziati (blu, conservati tra i Nidovirus, grigio, conservati tra i Coronavirus). Domini transmembrana = TM, domini proteasici (PLP e MP), RNA primasi (P), elicasi (HEL), esonucleasi (Exo), endoribonucleasi (N), metil trasferasi (MT). RFS delimita il frameshift ribosomico tra ORF1a e ORF1b. Le frecce rappresentano i siti in cui la pp1ab viene clivata dalla proteasi nsp3 papaina-like (blu) o dalla proteasi nsp5 (rosso). Kèvin Knoops, Marjolein Kikkert, Sjoerd H. E. van den Worm, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Yvonne van der Meer, Abraham J Koster, A. Mieke Mommaas, Eric J Snijder, "SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum", Published: September 16, 2008, doi:10.1371/journal.pbio.0060226.g001 [11].

Durante la sintesi di genomi a RNA a polarità negativa, il complesso RTC può interrompere la trascrizione a causa del riconoscimento di sequenze di regolazione della trascrizione (TRS) posizionate a monte delle ORF nella regione al 3' del genoma. A seguito di ciò, la sintesi dell'RNA (-) viene interrotta (sintesi discontinua) e riprende a partire dalla TRS adiacente alla regione leader (TRS-L) localizzata circa 70 nucleotidi dall'estremità 5' del genoma. Successivamente una copia di filamento a polarità negativa della sequenza leader viene aggiunto al nuovo RNA per completare la sintesi dell'sg mRNA a polarità negativa [11].

I trascritti subgenomici originatisi permettono l'espressione dei geni che codificano per le proteine strutturali ed accessorie nella porzione 3' del genoma [11] (Figura 13).

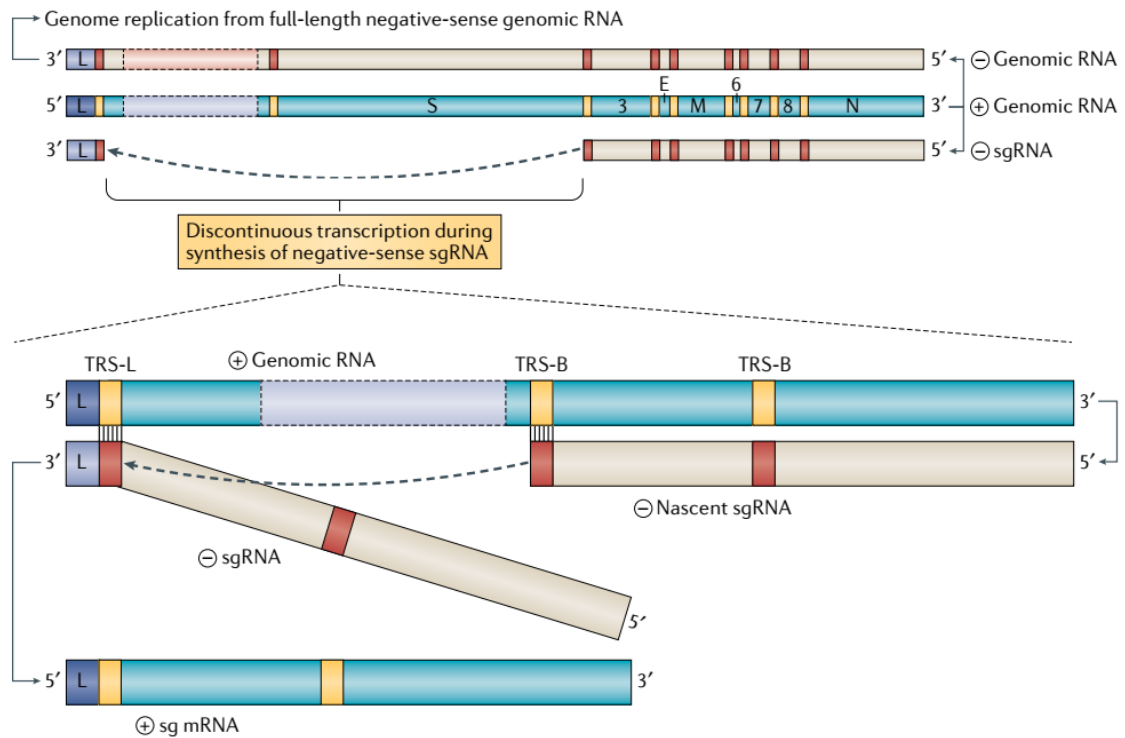


Figura 13. Replicazione e trascrizione discontinua del genoma del Coronavirus SARS-CoV2 [12].

La sintesi dell'RNA virale avviene tramite il complesso di replicazione e trascrizione (RTC), il quale è associato ad una rete di vescicole, che comprendono membrane convolute (CV) e vescicole a doppia membrana (DMV), derivanti dal reticolo endoplasmatico (RE) [15]. L' RTC è ancorato alle CV grazie alle proteine transmembrana Nsp3, Nsp4 e Nsp6, mentre i nuovi genomi virali e i sg mRNA sono contenuti nelle DMV. Questo sembra prevenire il riconoscimento di molecole di dsRNA (RNA a doppio filamento) da parte dell'immunità dell'ospite, i quali causerebbero la loro degradazione [15].

1.7 Assemblaggio e rilascio dei virioni

Una volta prodotte molte copie dei genomi virali, delle proteine strutturali e accessorie, questi si possono assemblare per formare nuova progenie virale.

Questi passaggi si verificano nel reticolo endoplasmatico e nelle cisterne del Golgi.

La proteina M viene secreta dalle vescicole trans-Golgi, che formano complessi larghi e insolubili.

La formazione dell'envelope si origina per gemmazione e incorpora le proteine di membrana virali (Spike, M ed E) [17].

A seguito della loro sintesi nel reticolo endoplasmatico (RE), le proteine virali sono incorporate in vescicole trasportate nei compartimenti intermedi del reticolo endoplasmatico e del Golgi (ERGIC).

Per formare il nucleocapside, le proteine N si assemblano per poter poi legare l'ssRNA(+). Successivamente, la ribonucleoproteina si ripiega su sé stessa e determina la formazione del nucleocapside elicoidale.

Al termine di questo processo di assemblaggio del genoma, si ottengono virioni che espongono sulla superficie dell'envelope la glicoproteina Spike.

Il rilascio dei virioni maturi avviene per gemmazione, favorita dalla proteina

E che induce la curvatura della membrana o agisce come viroporina

favorendo l'uscita della progenie virale ^[17] (Figura 14, Figura 15).

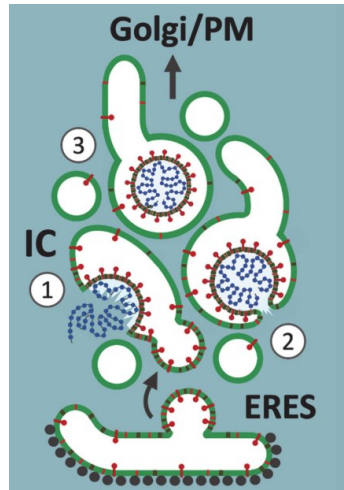


Figura 14. Assemblaggio del virus per gemmazione a partire da membrane dei compartimenti intermedi (IC) localizzati vicino ai siti ERES. Jaakko Saraste and Kristian Prydz, "Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space"; [17].

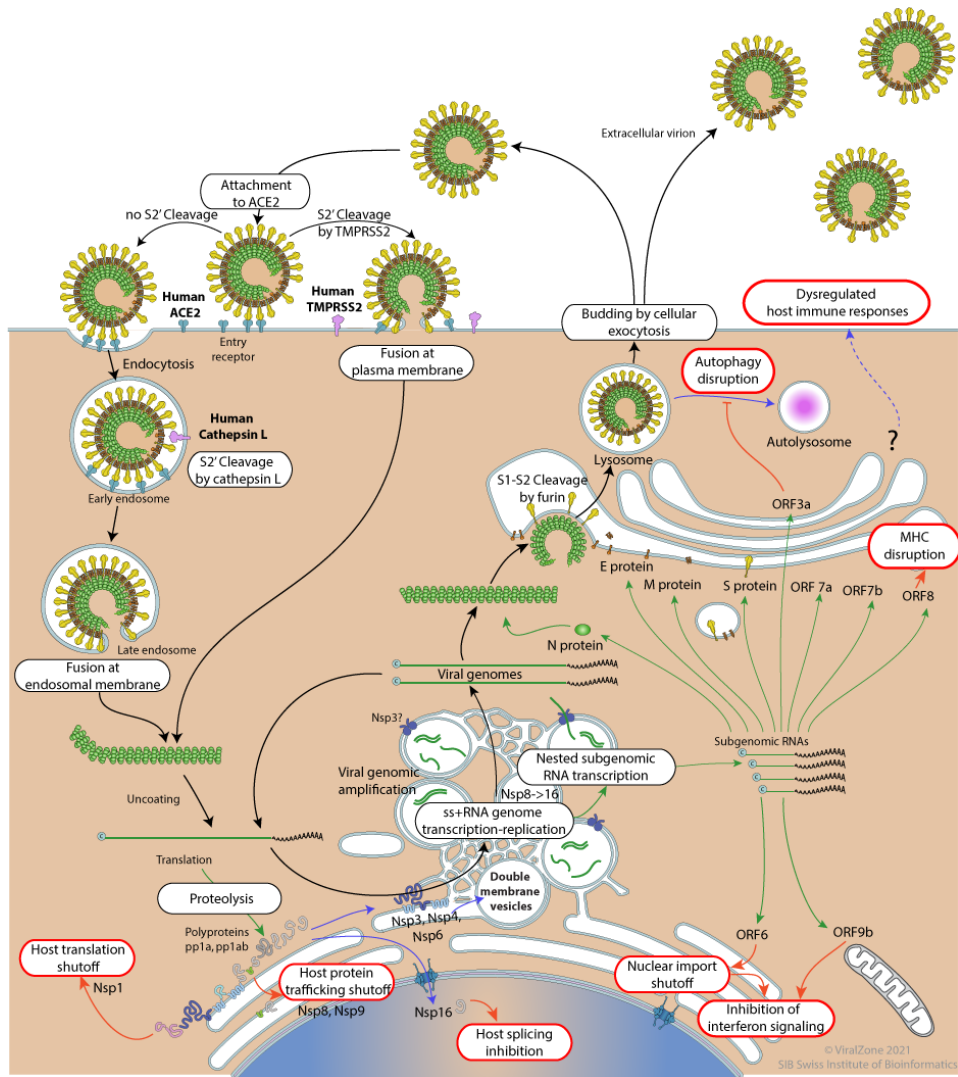


Figura 15. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2. <https://viralzone.expasy.org/9096>

2. VOCs (*Variants of Concern*) e VOIs (*Variants of Interest*) del *Coronavirus*

SARS-CoV-2, nonostante abbia sviluppato un'attività di proofreading, che sostituisce nucleotidi erroneamente inseriti dall'enzima RNA Polimerasi RNA-dipendente durante la replicazione virale, riducendo il tasso di errore nella replicazione ^[25], è riuscito a generare e ad accumulare diverse mutazioni, probabilmente aiutato dalla sua enorme diffusione nella popolazione.

Il tasso di mutazione di SARS-CoV-2 è stimato essere attorno a 1×10^{-6} - 2×10^{-6} mutazioni per nucleotide incorporate ad ogni ciclo di replicazione ^[23]. Esso viene stimato mediante metodi filogenetici, confrontando il numero di mutazioni nelle sequenze virali campionate in tempi diversi ^[23]. Tra i vari meccanismi che permettono l'insorgenza di nuove mutazioni ritroviamo:

- l'editing del genoma mediato dalla cellula ospite mediante un meccanismo di immunità innata, dove agiscono enzimi della famiglia catalitica polypeptide-like (APOBEC, *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*) i quali inducono transizioni C→U all'interno del genoma virale ^[23, 25, 54].
- l'azione delle proteine antivirali cellulari come la adenosina deamminasi (ADAR, *adenosine deaminase acting on RNA*), la quale compie mutazioni A→G o U→C ^[23, 25, 54].

SARS-CoV-2 è soggetto anche a ricombinazione, che consiste nell'unire mutazioni provenienti da diversi background genetici per creare varianti ibride, a seguito della co-infezione dello stesso individuo da parte di due virus geneticamente distinti. Mediante la ricombinazione per scelta del template, tipica di virus con genoma a ssRNA, una delle due varianti virali coinfectanti la stessa cellula prende il sopravvento sull'altra e viene utilizzata come stampo dalla RdRp. L'enzima virale trascrive uno dei due filamenti e modifica il genoma stampo, trasportandolo sull'altro filamento, per poi proseguire la replicazione su quest'ultimo. In questo modo si possono eliminare dei nucleotidi erroneamente inseriti e originare nuovi lineage virali [25].

È sempre presente, inoltre, l'azione della selezione naturale, la quale agirà al fine di eliminare o mantenere mutazioni vantaggiose che potrebbero migliorare le proprietà infettanti del virus e favorire la sua diffusione nella popolazione [23].

La modificazione della sequenza di geni e proteine virali, come la glicoproteina S, è determinata, inoltre, dal fenomeno della deriva antigenica e dall'aumento della trasmissibilità e replicazione virale.

L'insieme di questi fattori comportano meccanismi come lo sviluppo di resistenze a farmaci antivirali, l'adattamento a nuove specie ospiti e l'evasione dell'immunità dell'ospite ^[50,51].

Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che l'insorgenza di mutazioni porta ad un aumento del numero di legami idrogeno e di ponti salini, i quali incrementano l'affinità di legame al recettore ACE2 dell'ospite ^[51] e migliorano la fitness virale ^[51].

Già dai primi mesi di pandemia sono state individuate alcune mutazioni soprattutto nel gene S che codifica per la proteina Spike ^[19].

La prima mutazione individuata è stata la D614G, presente all'estremità C-terminale del dominio S1 della proteina S, capace di giocare un ruolo nella trasmissione del virus. Infatti, essa determina cambiamenti conformazionali nel sito di clivaggio, portando a tagli più efficaci dei domini S1 e S2 e migliorando l'accessibilità alla furina, oltre ad una maggiore trasmissibilità e replicazione virale ^[51].

Le nuove varianti sono state classificate dal *Centre of Disease/Control and Prevention* in:

- *Variant of interest (VOI)*: comprende quelle con una distribuzione globale limitata e per le quali si prevede che le mutazioni siano capaci di influenzare le caratteristiche del virus come la trasmissibilità, la

virulenza, l'elusione immunitaria e farmacologica. Inoltre, possono creare problemi a livello diagnostico. Un'altra caratteristica è la capacità di diffusione comunitaria con una trasmissione rapida e un numero crescente di casi nel tempo, rappresentando un rischio emergente alla salute pubblica globale ^[19]. All'interno di questo gruppo sono state inserite le varianti:

- *Epsilon* (B.1.427 e B.1.429), individuate in America,
 - *Zeta* (P.2), individuata in Brasile,
 - *Eta* (B.1.525), individuata in Nigeria,
 - *Theta* (P.3), individuata nella Filippine,
 - *Iota* (B.1.526), individuata in America, si è diffusa a partire dalla città di New York tra dicembre 2020 e maggio 2021. Le principali mutazioni sono localizzate sul gene della proteina Spike e sono L5F, T95I, D253G, D614G, A701V, Q957R, insieme alle E484K or S477N ^[26].
 - *Kappa* (B.1.617.1), individuata in India,
 - *Lambda* (C.37), individuata in Perù,
 - *Mu* (B.1.621), individuata in Colombia.
- *Variant of concern (VOC)*: rientrano nelle VOI e possiedono le seguenti caratteristiche: aumento della trasmissibilità o con conseguente impatto

sulla capacità dei sistemi sanitari di fornire assistenza ai pazienti COVID-19, aumento di virulenza o gravità clinica della malattia, diminuzione dell'efficacia di diagnosi, vaccini e terapie ^[19].

Da inizio pandemia sono state identificate cinque VOC ^[20] (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**):

- **Alpha (B.1.1.7)**: riscontrata in Inghilterra il 20 settembre 2020 e successivamente diffusasi in tutto il pianeta. Essa possiede 22 mutazioni, di cui 9 si trovano sul gene S e sono non sinonime (ovvero determinano la variazione dell'amminoacido rispetto alla sequenza di partenza ^[40]. Queste sono: D614G, N501Y, P681H, A570D, T761I, S982A, D1118H e le delezioni 69/70 e 144/145. Esse agiscono aumentando l'affinità di legame al recettore ACE2 delle cellule ospiti, aumentando la velocità di trasmissione del virus e causando l'elusione immunitaria.
- **Beta (B.1.351)**: scoperta l'8 dicembre 2020 in Sud Africa. Possiede 16 mutazioni di cui 8 presenti sul gene S. Tra queste sono presenti una delezione (del241/243) e 7 mutazioni non sinonime rispetto alla sequenza iniziale di SARS-CoV-2. Di queste ultime 3 si trovano nella regione RBD: K417N, E484K e N501Y. Le prime due aumentano la

forza di legame con il recettore ACE2 e la terza è comune alla VOC *Alpha*. Altre mutazioni sono: D804A, D215G, D614G e A701V ^[40].

- ***Gamma* (P.1 o B.1.1.28.1)**: è stata identificata in Brasile nel dicembre 2020; possiede 23 mutazioni non sinonime. 12 mutazioni sono localizzate nel gene S, di cui 4 state trovate nella regione RBD (K417T, E484K, N5010Y) ^[40] e hanno il compito di aumentare l'affinità di legame al recettore umano ACE2 e la trasmissibilità del virus. Questa variante era coinvolta in diversi casi di reinfezione.
- ***Delta* (B.1.617.2)**: si è diffusa nell'ottobre 2020 nello stato indiano di Maharashtra. Possiede 29 mutazioni, di cui 8 localizzate nella proteina S, come T19R, E156G, del157/158, L452R, T478K, D614G, P681R e D950N ^[40]. Come le mutazioni riscontrate nella altre VOC, quelle elencate aumentano il tasso di trasmissione, il legame del virus al recettore ACE2 umano e l'elusione della risposta immunitaria.
- ***Omicron* (B.1.1.529)**: si è diffusa in tutto il mondo a partire dal novembre 2021. Possiede 39 mutazioni nella proteina S, 27 delle quali sono del tutto nuove. La maggior parte delle mutazioni (15) si trovano all'interno del dominio RBD e RBM (*Receptor Binding Motif*) della proteina S. La frequenza mutagenica dell'RBM è di 760 volte maggiore di quella dell'intero gene S. La proteina S di SARS-CoV-2 contiene

1273 amminoacidi, mentre nella variante *Omicron* mancano 3 amminoacidi, quindi 1270, suddivisi in: RBD (319-545), RBM (438-507) e NTD (18-305). Il *lineage Omicron* ha una maggiore capacità di legare il recettore ACE2 rispetto al SARS-CoV-2 wild-type grazie alla presenza delle mutazioni Q493K, Q498R, e H665Y e N679K, localizzate vicino al sito di clivaggio dove agisce la furina, rendendo il virus più contagioso. Migliorando la scissione della proteina S, la mutazione P681H stimola la trasmissione. Tutto ciò favorisce un alto tasso di reinfezione in pazienti precedentemente infettati da SARS-CoV-2 con altre varianti.

- ***Omicron sub-lineages***: sono stati identificati diversi *sub-lineage* della variante *Omicron*, come BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.4 e BA.5. Tutte hanno la capacità di evadere la risposta immunitaria in modo efficiente. I sub-lineage BA.4 e BA.5 sono stati scoperti in Sud-Africa nel 2022, possiedono delle mutazioni nella regione RBD, come L452R, F486V e R493Q, che determinano, in particolare, la fuga dal sistema immunitario.

Per l'analisi di queste varianti vengono utilizzati diversi sistemi informatici, come GisaID, Nextstrain e Pango. Tramite essi è possibile caricare online le

sequenze di SARS-CoV-2 ottenute dai campioni clinici, analizzarle e classificarle (Figura 16, Figura 17).

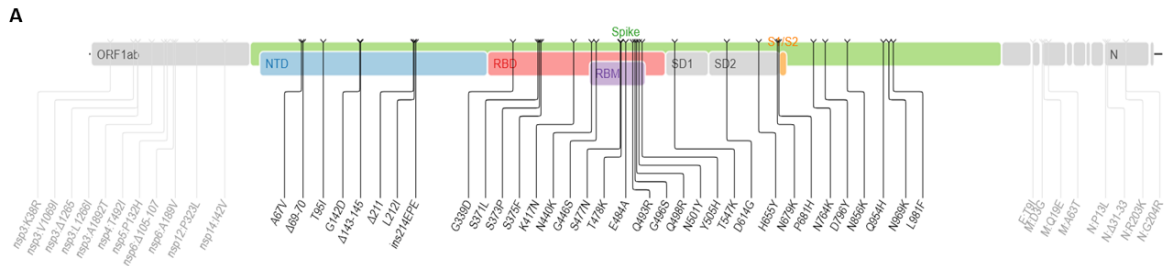


Figura 16. Mutazioni dei lineages del SARS-CoV-2.

https://www.covid19dataportal.it/images/highlights/highlightOmicron_December2021.png

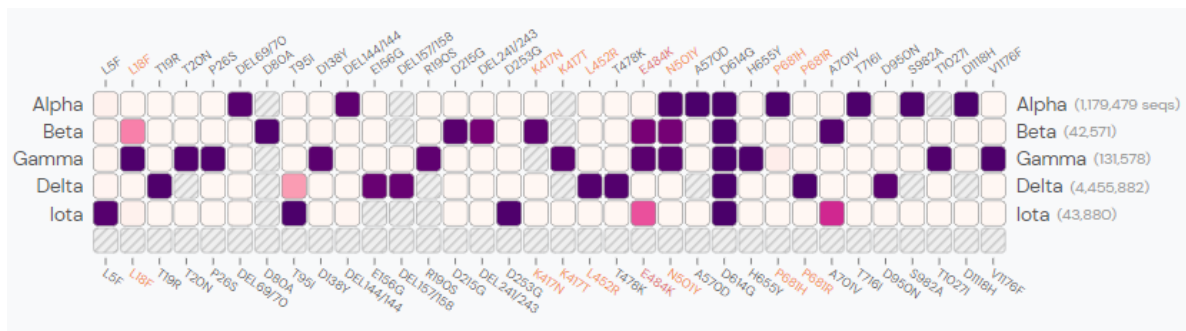


Figura 17. Mutazioni dei lineage di SARS-CoV-2.

3. Trasmissione

I *Coronavirus* infettano principalmente animali a sangue caldo e sono noti per i loro frequenti salti di specie. Essi hanno provocato delle zoonosi in seguito a trasmissione dagli animali all'uomo ma sono riusciti a diffondersi nella popolazione con trasmissione interumana.

SARS-CoV-2 viene trasmesso da un individuo ad un altro principalmente quando è presente un'elevata carica virale nelle vie respiratorie. Essa avviene mediante via aerea, tramite droplets o goccioline di saliva espulse durante l'atto respiratorio, starnuti, tosse o durante la fonazione. Un'altra via di trasmissione può essere il contatto diretto con oggetti contaminati dal virus. Dall'analisi delle modalità di trasmissione si sono potute attuare delle misure di prevenzione della diffusione del virus, quali l'utilizzo di dispositivi di protezione individuale (DPI) per ridurre la propagazione aerea dei droplets emessi, la disinfezione frequente delle mani e delle superfici, l'aerazione di luoghi chiusi e l'aumento della distanza interpersonale.

4. Patogenesi

Il virus SARS-CoV-2 è responsabile della malattia COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) [21].

L'infezione determina dapprima una fase di incubazione della durata media di 2-3 giorni e successivamente la comparsa dei sintomi. Si possono distinguere più tipologie di infezione: asintomatica, paucisintomatica, sintomatica di tipo lieve o moderata e sintomatica di tipo grave. Più frequentemente si osservano

sindromi respiratorie leggere: tosse, febbre, mal di testa, mialgia, nausea, vomito e diarrea ^[18].

I casi più gravi possono mostrare polmonite, dispnea (a seguito di ipossiemia), sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), iperinflammazione sistemica dovuta all'insorgenza della tempesta citochinica, e una mortalità maggiore ^[18].

Le manifestazioni cliniche sono influenzate, oltre che dall'infezione virale, anche dall'età del soggetto che ha contratto il virus SARS-CoV-2: gli individui con un'età maggiore di 60 anni e con comorbidità tendono ad essere più predisposti a sviluppare una malattia respiratoria più grave (talvolta fatale), che potrebbe richiedere trattamenti sanitari specifici e ospedalizzazione ^[16].

Invece i soggetti giovani e bambini, generalmente, manifestano sintomi più leggeri (non-polmonite o polmonite lieve) o sono asintomatici.

4.1 Fisiopatologia del COVID-19

Come detto nel capitolo 1.6.1, il virus SARS-CoV-2 riesce ad entrare nelle cellule dell'ospite grazie al legame tra la proteina virale Spike (S) e il recettore ACE2 dell'ospite. Successivamente si verifica l'innescò della TMPRSS2, che coadiuva il meccanismo di ingresso virale.

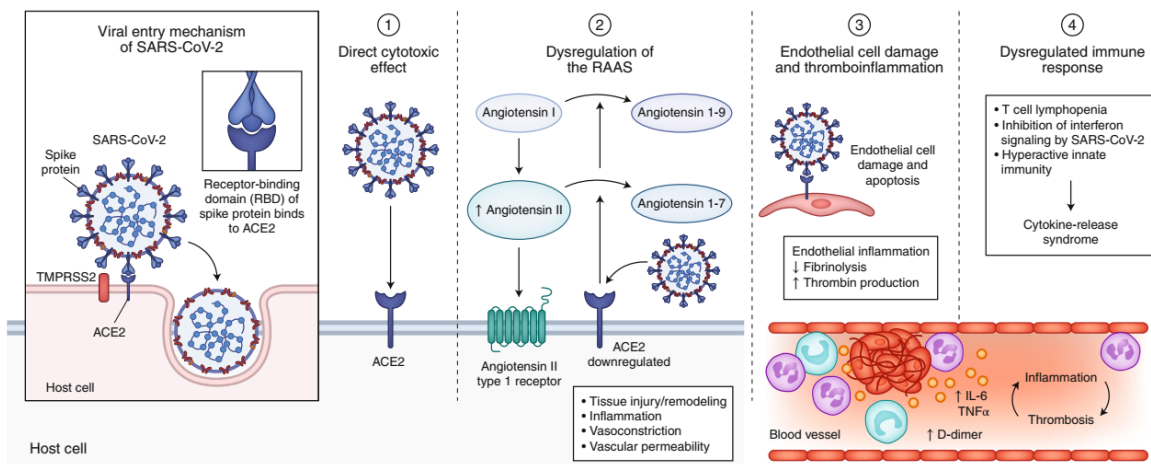


Figura 18. Fisiopatologia del COVID-19. Aakriti Gupta, Mahesh V. Madhavan, Kartik Sehgal, Nandini Nair, Shiwani Mahajan, Tejasav S. Sehrawat, Behnood Bikdeli, Neha Ahluwalia, John C. Aushiello, Elaine Y. Wan, Daniel E. Freedberg, Ajay J. Kirtane, Sahil A. Parikh, Mathew S. Maurer, Anna S. Nordvig, Domenico Accili, Joan M. Bathon, Sumit Mohan, Kenneth A. Bauer, Martin B. Leon, Harlan M. Krumholz, Nir Uriel, Mandeep R. Mehra, Mitchell S. V. Elkind, Donald W. Landry, "Extrapulmonary manifestations of COVID-19", *Nature Medicine* volume 26, pages1017–1032 (2020), published 10 July 2020, <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0968-3> [21]

I meccanismi patogenetici che si sviluppano durante COVID-19 possono includere:

1) sindromi polmonari e gastroenteriche causate dall'azione diretta del virus:

- Danno cellulare diretto, causato dal virus: il virus ha una trasmissione aerea e può determinare il danneggiamento in seguito ad infezione massiccia delle alte e delle basse vie respiratorie, a causa della presenza dei recettori ACE2 e TMPRSS2 su questi tipi cellulari. Inoltre, il virus è stato ritrovato ad alta carica anche nell'intestino, e a bassa carica in altri

materiali biologici o in distretti dell'organismo "atipici", urina, sangue, tessuto renale, miocardico, neurologico ^[21]. L'infezione si manifesta con sintomi quali polmoniti, ARDS, nausea e/o vomito, diarrea, dolori addominali ^[21].

- Polmonite interstiziale e/o bilaterale: si manifesta in soggetti con una malattia grave. Mediante radiografia si possono distinguere delle opacità a vetro smerigliato presenti nei polmoni. Le condizioni dell'individuo possono peggiorare mostrando sintomi con respiro sibilante, necessità di ossigeno, tachipnea con ridotta saturazione dell'ossigeno nel sangue. Ciò precede la ARDS ^[61].
- Sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS): è una conseguenza del danno polmonare caratterizzato da infiammazione, perdite vascolari polmonari e perdita di tessuto polmonare areato. Si presenta con una severa ipossiemia e opacità radiografiche bilaterali, entro 7 giorni dall'infezione ^[18].
- Linfopenia: si manifesta con una rapida diminuzione dei linfociti, sia delle cellule T CD4⁺ sia delle T CD8⁺ a seguito del diretto effetto di sequestro tissutale ^[21]. È spesso associata a leucocitosi e trombocitopenia.

- Coagulopatie: si manifestano con alti livelli di D-dimero e fibrinogeno (a causa di uno stato di iperinflammatione), anomalie nel tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale attivata e conta piastrinica ridotta rispetto alla fase iniziale dell'infezione ^[21]. Tra queste manifestazioni rientra anche la coagulazione intravascolare disseminata (CID): essa provoca un'eccessiva produzione di trombina e fibrina nel sangue circolante, con conseguente aumento dell'aggregazione piastrinica e consumo dei fattori della coagulazione.

2) sindromi extrapolmonari causate dall'azione indiretta del virus tramite:

- Danno delle cellule endoteliali e tromboinflammatione: l'infezione da SARS-CoV-2 può determinare un aumento della quantità del fattore di von Willebrand, dei neutrofili attivati e dei macrofagi, i quali possono condurre ad una eccessiva produzione di trombina, inibire la fibrinolisi, attivare le vie del complemento (attivato anche dagli immunocomplessi), promuovere la tromboinflammatione e infine portare alla deposizione di microtrombi e alla disfunzione microvascolare ^[21]. Inoltre, si può verificare la produzione di citochine che portano alla formazione

di reti di neutrofili extracellulari (NET) e di coaguli di fibrina e/o microtrombi ^[21].

- Danni renali: tra cui il danno acuto renale (AKI), il danno tubulare acuto e l'ostruzione nelle anse dei capillari peritubulari e glomerulari ^[21].
- Manifestazioni epatobiliari: si riscontra con livelli elevati dell'enzima amminotransferasi e danneggiamento dei dotti delle vie biliari ^[21].
- Manifestazioni endocrinologiche: pazienti ricoverati hanno mostrato un quadro clinico comprendente iperglicemia, chetosi euglicemica, chetoacidosi diabetica ^[21].
- Manifestazioni neurologiche: possono includere mal di testa, vertigini, mialgia e fatica, anoressia e anosmia, ma in casi più gravi coinvolgono ictus acuti, meningoencefaliti, sindromi da encefalopatia emorragica posteriore reversibile, encefalopatia necrotizzante acuta ^[21].
- Manifestazioni dermatologiche: possono comprendere rash eritematosi, orticaria e vescicole simili a quelle causate dalla varicella ^[21].

3) Sindromi post-infettive immuno-mediate:

- Miocarditi post-infettive: fanno parte delle complicazioni cardiovascolari insieme ad aritmie, sindrome coronarica acuta (ACS) e insufficienza cardiaca [21, 60].
- Sindrome di Guillain-Barrè (GBS): è una polineuropatia infiammatoria acuta che è caratterizzata da debolezza muscolare e lieve perdita della sensibilità distale.

L'insieme di questi sintomi e conseguenze può portare all'aumento della gravità della malattia da COVID-19 e, in alcuni casi, può condurre alla morte dell'individuo.

5. Immunità

Ogni individuo possiede un proprio sistema immunitario atto a proteggerlo da agenti estranei potenzialmente dannosi per l'individuo stesso. Tra questi ultimi sono inclusi microrganismi come virus e batteri. Essi espongono sulla loro superficie molecole, solitamente proteine e polisaccaridi, che vengono riconosciute sia dai recettori localizzati sulla membrana cellulare ospite, ma anche dalle cellule del sistema immunitario. Infatti, il compito di quest'ultimo consiste nel loro riconoscimento e nella loro eliminazione al fine di impedire l'infezione da essi promossa e l'insorgenza di malattie.

Il sistema immunitario comprende due tipi di immunità: l'immunità innata e l'immunità adattativa.

5.1 Immunità innata

L'immunità innata, detta anche naturale o nativa, viene chiamata in questo modo perché rappresenta la prima linea di difesa per i soggetti non ancora immunizzati in maniera specifica verso un determinato patogeno [27,21].

Essa comprende:

- 1) le barriere fisiche e chimiche (come epitelii e sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici epiteliali), che hanno il compito di ostacolare fisicamente la penetrazione del patogeno,
- 2) le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi) e le cellule natural killer (NK). Tra queste troviamo:
 - i monociti derivano dal midollo osseo; localizzati nella sede di infezione si differenziano in macrofagi.
 - i macrofagi sono attivati da prodotti microbici e da citochine prodotte dai linfociti T; hanno il ruolo di fagocitare e uccidere i microrganismi, secernendo citochine proinfiammatorie e presentare gli antigeni ai linfociti T helper [27].

- i neutrofili o leucociti polimorfonucleati (PMN) sono cellule fagocitarie prodotte dal midollo osseo, contenenti enzimi litici; sono riversati nel circolo sanguigno per raggiungere la sede di infezione ^[2, 27].
 - le cellule dendritiche (CD) sono cellule prodotte dal midollo osseo; agiscono come cellule che presentano l'antigene (o cellule APC) per linfociti T naïve ed espletano una risposta immunitaria specifica verso antigeni proteici ^[27].
- 3) le proteine del sangue (fattori del sistema del complemento e chemochine). Il sistema del complemento è composto da 20 proteine che possono essere solubili oppure associate alle membrane di alcune cellule e riconoscono in maniera standardizzata e non adattabile una serie di antigeni. Ciò determina:
- il reclutamento delle cellule fagocitarie e dei granulociti nel sito di infezione,
 - l'opsonizzazione dei patogeni in modo da renderli più facilmente aggredibili dalle cellule del sistema immune,
 - la distruzione diretta dei patogeni o delle cellule infettate ad opera di una serie di fattori complementari (*membrane attack complex*, MAC).

- 4) le citochine che regolano e coordinano molte attività delle cellule dell'immunità innata. Un esempio sono le citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina 1 β (IL-1 β), l'IL-18 e gli interferoni di tipo I (quali IFN- β e IFN- α), prodotte da macrofagi, cellule NK e linfociti T ^[27].

L'interferone γ (IFN- γ) è una citochina prodotta dai linfociti T e dalle cellule NK la cui funzione è quella di attivare i macrofagi nella risposta immunitaria innata e cellulo-mediata.

Il meccanismo d'azione dell'immunità innata si aziona nel momento in cui proteine ed elementi non-self, dette PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), vengono legati dai recettori PRR (*pattern-recognition receptors*) presenti sulla cellula ospite. Alcuni PRR fondamentali sono (Tabella 2) ^[2]:

- *toll-like receptors* (TRL): una famiglia di proteine transmembrana comprendenti macrofagi e cellule dendritiche espressi per tutto il tratto respiratorio ^[31]; i principali TRL sono: il TLR-2, espresso sulla superficie cellulare e riconosce PAMP localizzati sulla membrana cellulare o all'interno degli endosomi, attivato in risposta a infezioni da virus a DNA; e i TLR-3,7,8 e 9 localizzati intracellularmente nel reticolo endoplasmatico e sulle membrane endosomiali ^[27], attivati da PAMP virali all'interno di vescicole di endocitosi o sulla superficie cellulare;

- *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors (RLR)*: recettori che fungono da sensori di RNA virali nel citoplasma delle cellule infette;
- *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors (DAI)*: è il sensore a DNA intracitoplasmatico, riconosce regioni ricche in AT all'interno di molecole di DNA virale o batterico;
- *nucleotide-binding oligomerization (NOD)-like receptors (NLR)*: essi multimerizzano in grandi complessi multiproteici (inflammasomi) che portano all'attivazione della componente effettrice del sistema, cioè la conversione della procaspasi-1 in caspasi-1, la quale favorisce la maturazione proteolitica e la secrezione di citochine pro-infiammatorie.

Famiglie	PRR	PAMP	Effetto
<i>Toll-like receptors</i> (TLR)	TLR2	DNA batterico e virale	Secrezione di mediatori proinfiammatori
	TLR3	dsRNA virale	Attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi con secrezione di mediatori proinfiammatori
	TLR7	ssRNA virale	Attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi con secrezione di mediatori proinfiammatori
	TLR8	ssRNA virale	Attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi con secrezione di mediatori proinfiammatori
	TLR9	DNA batterico e virale	Attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi con secrezione di mediatori proinfiammatori
<i>RIG-I-like receptors</i> (RLR)	RIG-I	dsRNA virale	Secrezione di mediatori proinfiammatori
	MDA5	dsRNA virale	Secrezione di mediatori proinfiammatori
	LGP2	dsRNA virale	Secrezione di mediatori proinfiammatori
<i>NOD-like receptors</i> (NRL)	NLRP3	RNA batterico e virale	Attivazione dell'inflammasoma
<i>DNA sensors</i>	DAI	DNA batterico e virale	Secrezione di mediatori proinfiammatori

Tabella 2. I recettori pattern recognition receptors (PRR) e pathogen-associated molecular patterns (PAMP) coinvolti nell'attivazione dell'immunità innata nel corso di un'infezione virale. Antonelli Guido, Clementi Massimo, Pozzi Gianni, Rossolini Gian Maria, "Principi di Microbiologia Medica", 4 edizione, casa editrice Ambrosiana, 2023 [2].

Quando il microrganismo supera la barriera epiteliale, incontra i macrofagi situati al di sotto, i quali lo fagocitano, inducono la produzione di citochine e promuovono la sua eliminazione da parte dei loro enzimi lisosomiali.

Le citochine reclutano i leucociti circolanti nel sangue, facendoli arrivare al luogo dell'infiammazione. Qui vengono riconosciuti dalle proteine del complemento, i quali:

- attivano la risposta infiammatoria,
- si azionano al contatto con la superficie microbica,
- rivestono la superficie dei microbi per favorire la fagocitosi,
- generano pori sulla superficie dei microbi per causarne la lisi.

Tra le citochine che intervengono in questa fase della risposta immunitaria si trovano gli interferoni, i quali spesso inducono uno stato antivirale. Si distinguono in interferoni di tipo I (IFN- α e IFN- β), II (IFN- γ) e III (IFN- λ e IL-29) a seconda del tipo di cellula esposta all'attacco microbico ^[2].

I recettori PRR coinvolti nella sintesi di IFN di tipo I e III durante l'infezione virale sono: il TLR-2, TLR3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9, oltre ad alcuni sensori citoplasmatici di acidi nucleici come RIG-1, MDA-5, PKR e 2'-5'OAS.

La protein-chinasi dsRNA-dipendente (PKR) fosforila e inattiva il fattore di inizio della sintesi proteica eIF-2 (*eukaryotic initiation factor-2*), impedendo la traduzione degli mRNA. Inoltre, in presenza di dsRNA, attiva il fattore

trascrizionale NF- κ B¹, per indurre l'IFN- β e provocare l'apoptosi delle cellule infettate.

La 2'-5' oligoadenilato sintetasi (2'-5' OAS) è una polimerasi che, in presenza di un dsRNA (*double-stranded RNA*), sintetizza oligomeri adenilici con legame fosfodiesterico 2'-5' capaci di attivare una ribonucleasi cellulare (RNasi L) che degrada l'RNA virale. Inoltre, l'enzima promuove l'apoptosi cellulare e partecipa all'induzione dell'IFN di tipo I.

Un enzima RNA specifico, detto adenosina deaminasi (ADAR-1), coinvolto nell'attività antivirale, catalizza la conversione dell'adenosina in inosina, alterando la sequenza nucleotidica e la funzione delle molecole di RNA virali.

Infine, può intervenire la proteina VIPERIN, che ha il compito di alterare la fluidità della membrana plasmatica della cellula ospite ostacolando la liberazione dei virioni.

Durante l'infezione da SARS-CoV-2, la proteina E virale viene riconosciuta dal recettore TLR2 e causa un aumento della risposta infiammatoria inducendo diversi pathway di segnale proinfiammatori e la produzione di citochine (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**)^[31].

¹ NF- κ B: è un fattore trascrizionale necessario per l'espressione di numerosi geni collegati all'immunità innata e all'infiammazione^[27].

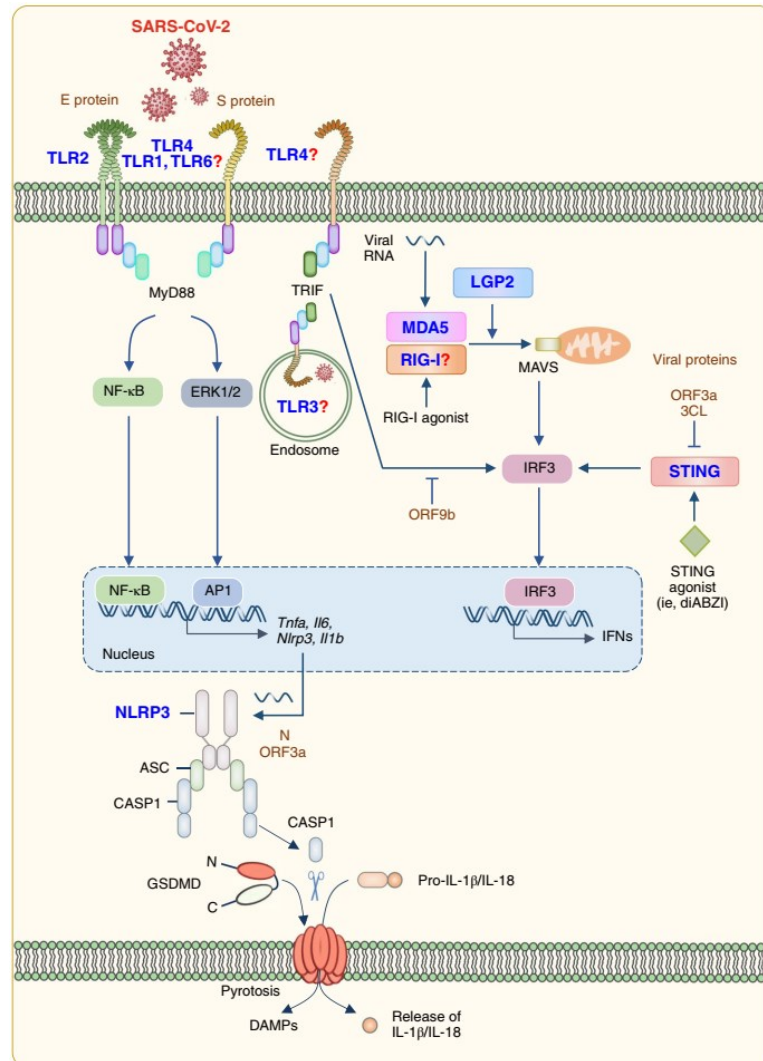


Figura 19. Attivazione del segnale PRR durante l'infezione da SARS-CoV-2. 31) Michael S. Diamond, Thirumala-Devi Kanneganti, "Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2", *Nature Immunology* volume 23, pages165–176 (2022), published 01 February 2022, <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01091-0> [31]

Un altro recettore coinvolto nella risposta contro l'infezione da SARS-CoV-2 è il TLR7: anomalie al gene *TLR7* sul cromosoma X sono spesso coinvolte nello sviluppo di una patologia grave da COVID-19 in individui giovani, per cui il ruolo del recettore TLR7 è quello di proteggere dall'infezione virale [31].

Intermedi replicativi, genomici e sub-genomici del genoma di SARS-CoV-2 possono essere riconosciuti dai recettori MDA5, RIG-I e LGP2.

Come tutti i *Coronavirus*, SARS-CoV-2 si è evoluto per contrastare efficacemente la risposta interferonica. L'azione antivirale dell'IFN- γ consiste nel blocco della maturazione e la liberazione dei virioni dopo il ciclo replicativo oppure nella stimolazione della produzione di microRNA che si appaiano a sequenze nucleotidiche complementari al genoma virale ^[2].

Grazie alle molteplici funzioni svolte dall'IFN- γ nel contrastare le infezioni virali, virus come SARS-CoV-2, hanno adottato meccanismi per sfuggire a questo controllo, bloccando:

- la sintesi di IFN mediata dai PRR,
- il legame ai recettori cellulari TLR, proteine RIG-1 e MDA-5,
- il segnale di trasduzione indotto dall'IFN,
- l'induzione e l'attivazione delle proteine IFN-indotte.

Proteine virali coinvolte in questo meccanismo sono, ad esempio, la proteasi papain-like PL^{pro}, la quale impedisce l'attivazione del recettore MDA5; l'ORF9b e le proteine N e M che inibiscono l'espressione dell'IFN- β e citochine pro-infiammatorie interferendo con i pathway RIG-I e MDA5. La ORF9b può bloccare il pathway TLR-3-TRIF ^[31].

Le ORF6 e ORF8 inibiscono l'espressione dell'IFN- β e l'attivazione delle ISG (globuline sieriche immuni). Le NSP1 e NSP14, oltre ad altre proteine virali, possono inibire la traduzione e prevenire l'espressione di componenti appartenenti alla via di segnalazione dell'IFN ^[31]. Infine, la proteina N del SARS-CoV-2 previene l'aggregazione dell'RNA virale con i MAVS per bloccare l'induzione del pathway IFN ^[31].

Oltre ai recettori PRR esistono i recettori NLR, i quali inducono la produzione di interferone di tipo I (IFN-I) e citochine proinfiammatorie. Ad esempio, il NLRP3 viene attivato in risposta ai PAMP² e ai DAMP³, mediando l'attivazione della caspase-1, la produzione e il rilascio delle IL-1 β e IL-18 e il clivaggio della gasdermina D (GSDMD). Questi eventi portano alla rottura della membrana plasmatica, mediante la formazione di pori, e alla morte della cellula ^[31].

Quando proteine virali vengono riconosciute dai recettori TLR2, TLR7/8 e RIG-1, si ha la sintesi di IFN- $\alpha\beta$ e IFN- λ , i quali attivano i fattori di trascrizione NF- κ B, IRF7 e IRF3, che inducono la sintesi di citochine e IFN, traslocando dal citoplasma al nucleo. L'IFN- γ viene prodotto dalle cellule NK

^{2, 6} PAMP e DAMP: pattern espressi dalle cellule dell'ospite durante il danno cellulare o la morte cellulare.

e dai linfociti T in risposta allo stimolo virale ¹²¹. Gli interferoni secreti legano specifici recettori situati sulla membrana plasmatica:

- gli IFN- α/β legano il recettore IFNAR,
- gli IFN di tipo III, ancorati alle proteine Tyk2 e JAK1, riconoscono un recettore formato da due subunità,
- l'IFN- γ attiva il recettore IFNGR associato alle proteine JAK1 e JAK2.

Successivamente, vengono attivate le vie di trasduzione del segnale che conducono alla traslocazione nel nucleo di complessi proteici che stimolano la trascrizione di geni IFN-indotti (*IFN stimulated genes*, ISG) in seguito al legame a sequenze dette ISNE (*IFN-stimulated response element*) per gli IFN- α/β e IFN- λ s o GAS (*IFN-gamma-activated sequence*) per l'IFN- γ ¹²¹ (Figura 20).

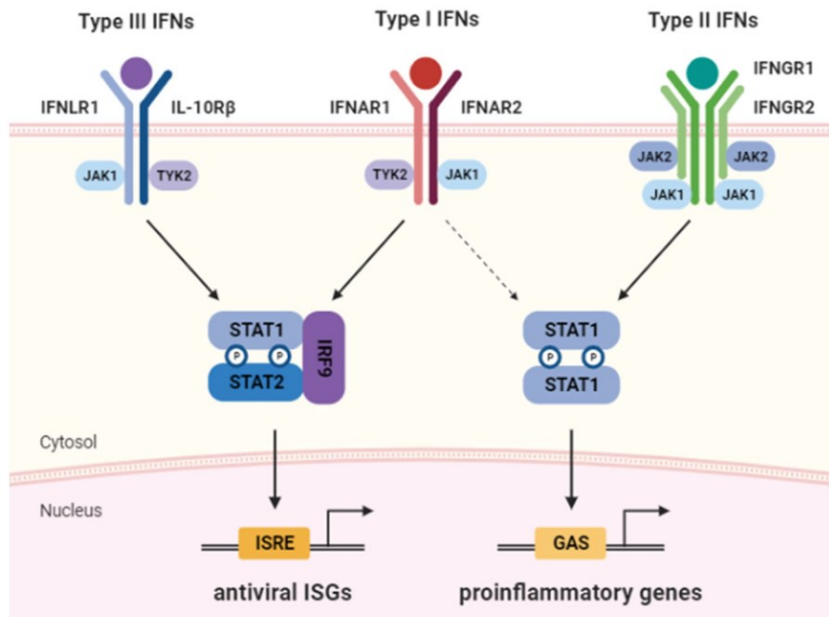


Figura 20. I recettori e i pathway di segnale mediati dagli interferoni di tipo I, II e III. You-Me Kim, Eui-Cheol Shin, "Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection", *Experimental & Molecular Medicine* volume 53, pages750–760 (2021), published 06 May 2021, <https://www.nature.com/articles/s12276-021-00592-0> [30].

La produzione e il rilascio di IFN stimolano la via di segnale a valle condotta dai recettori IFN con meccanismi autocrini e paracrini per produrre centinaia di globuline sieriche immuni (*immune serum globulin*, ISG) con varie funzioni antivirali, tra cui la prevenzione dell'ingresso e della replicazione virale [31].

Alcuni pazienti infettati da SARS-CoV-2, che possiedono degli anticorpi circolanti che riconoscono l'IFN-I, hanno manifestato una riduzione della risposta interferonica all'infezione, la quale ha determinato un aumento del rischio di malattia grave COVID-19 e persino morte.

Autoanticorpi contro l'IFN di tipo I sono stati trovati nello 0.3% della popolazione campione (1227 individui) tra 20 e 69 anni con infezione da SARS-CoV-2. Questo tipo di anticorpi viene prodotto durante l'infanzia.

Per tutti i soggetti gli autoanticorpi sono risultati protettivi verso IFN- α 2.

È stato osservato come gli autoanticorpi che neutralizzano l'IFN- α 2 o l'IFN- ω sono presenti in individui maschi con età superiore ai 65 anni e che manifestano polmonite da COVID-19.

Inoltre, nello studio svolto da Bastard e colleghi, circa il 13% dei soggetti presi in considerazione (3595 individui con un'età compresa tra i 20 e 99 anni) sono stati condotti a morte dopo aver contratto l'infezione da SARS-CoV-2 e aver sviluppato una polmonite severa ^[48].

Questi risultati indicano che l'immunità mediata dagli interferoni di tipo I sono essenziali per l'immunità protettiva dell'infezione respiratoria causata da SARS-CoV-2.

Altri fattori di rischio riscontrati sono:

- l'età, la quale può favorire l'ospedalizzazione e la morte di soggetti infettati da SARS-CoV-2 che hanno sviluppato una polmonite ^[48];
- la maggiore percentuale di soggetti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile nello sviluppo di una malattia grave ^[48];

- errori congeniti del recettore TLR-3 e del fattore IRF7 (*interferon regulatory factor 7*) possono essere alla base di una polmonite da COVID-19 rischiosa per la vita in una piccola percentuale di pazienti [48].

La finalità dell'immunità è quella di contenere il diffondersi di eventuali patogeni e di favorire una risposta più caratteristica da parte dell'altra componente del sistema immunitario, cioè l'immunità adattativa.

5.2 Immunità adattativa ^[2]

Quest'ultima, detta anche immunità specifica o acquisita, viene chiamata in questo modo perché ha la capacità di "adattarsi" nei confronti di ciascun patogeno riuscendo a riconoscere e rispondere più vigorosamente ad esposizioni ripetute ad uno stesso microbo, grazie alla sua memoria immunologica ^[27].

I componenti che agiscono in questo tipo di immunità sono i linfociti, le cellule presentanti l'antigene (APC) e le cellule effettrici.

I linfociti sono cellule che riconoscono e rispondono in modo specifico agli antigeni estranei utilizzando differenti recettori distribuiti in modo clonale,

ovvero ogni clone linfocitario riconosce un motivo antigenico diverso utilizzando i recettori presenti sulla sua superficie [27].

I linfociti si distinguono in:

- linfociti B: maturano nel midollo osseo; producono anticorpi a seguito del contatto con l'antigene, oppure possono differenziarsi in cellule secernenti anticorpi, mediando l'immunità umorale.
- linfociti T: maturano nel timo; riconoscono solo antigeni peptidici associati ad alcune proteine espresse sulla superficie delle cellule dell'ospite e codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). I linfociti T si differenziano in:
 - linfociti T helper: esprimono una proteina di membrana, detta CD4; secernono citochine, le quali stimolano la proliferazione e differenziazione dei linfociti T, B, macrofagi e altri leucociti.
 - linfociti citolitici o citotossici (CTL): esprimono una proteina di membrana, detta CD8; uccidono cellule che producono antigeni estranei, come cellule infettate da virus e batteri.
 - cellule natural killer (NK): uccidono cellule infettate e attivano fagociti secernendo IFN- γ ; utilizzano recettori per l'antigene diversi da quelli dei linfociti.

Le cellule accessorie o presentanti l'antigene (APC) sono, ad esempio, le cellule dendritiche che catturano antigeni estranei e li portano agli organi linfoidi. Successivamente avviene la presentazione degli antigeni ai linfociti T naïve per attivare la risposta immunitaria umorale e cellulare [27].

Le cellule effettrici sono cellule come i linfociti T attivati, fagociti mononucleati e altri leucociti; hanno il compito di eliminare il microorganismo [27].

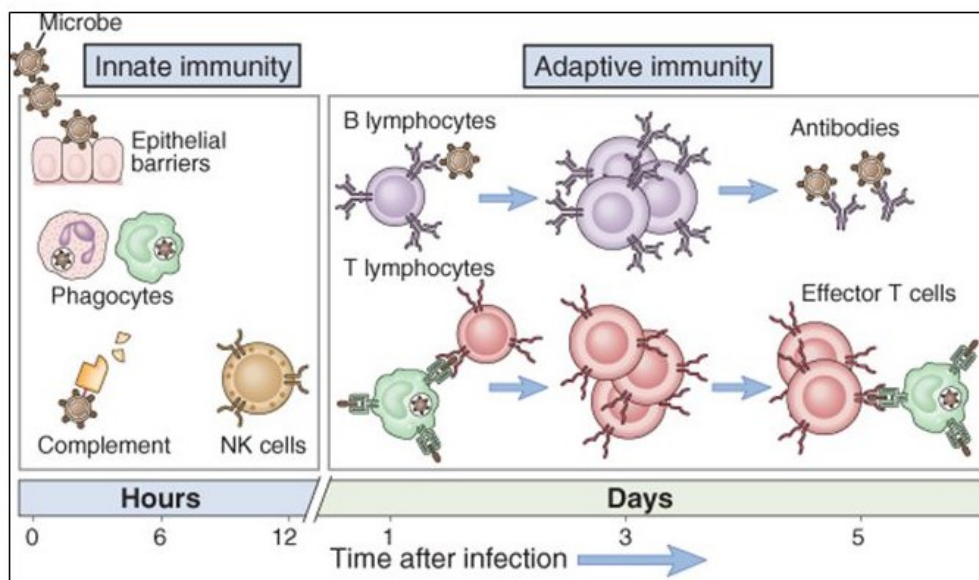


Figura 21. Le componenti dell'immunità innata e adattativa. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, "Cellular and molecular immunology", sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders [27]

L'immunità adattativa è divisa in immunità cellulo-mediata e immunità umorale (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

Entrambi i tipi di risposte si avvalgono di cellule della memoria. Esse possono sopravvivere in uno stato di quiescenza o replicarsi lentamente anche dopo

molti anni dal contatto con l'antigene. I linfociti B della memoria esprimono sulla loro membrana classi diverse di immunoglobuline (o isotipo) quali IgG, IgE, IgA che si originano dallo scambio isotipico; le cellule B naïve esprimono solo IgM e IgD. Le cellule T della memoria e i linfociti T naïve, invece, esprimono il recettore per l'IL-7.

L'immunità umorale è mediata dagli anticorpi, proteine prodotte dai linfociti B, o plasmacellule, a seguito dell'incontro con molecole eterologhe non riconosciute dall'organismo, dette antigeni.

Le plasmacellule hanno nuclei con abbondante citoplasma con denso reticolo endoplasmatico rugoso, da cui vengono prodotti gli anticorpi, e il sistema di vescicole del Golgi posizionato in zona perinucleare, dove gli anticorpi vengono preparati nella forma finale e assemblati per secrezione ^[27].

Gli anticorpi, detti anche immunoglobuline (Ig), sono composti da quattro catene polipeptidiche legate tra loro: due catene pesanti (*heavy*, H) e due catene leggere (*light*, L). Ogni catena leggera ha una lunghezza di 220 *base-pair* e un peso molecolare di 25 kDa mentre ogni catena pesante è costituita da 440 *base-pair* e pesa 55-70 kDa.

Le catene polipeptidiche contengono una serie di unità omologhe ripetute di circa 110 amminoacidi ripiegate a formare una struttura globulare, definita dominio Ig, formata da due foglietti β -planari uniti da un ponte disolfuro ^[27].

Sia le catene pesanti sia le catene leggere presentano regioni variabili (V) ammino-terminali e regioni costanti (C) carbossi-terminali che si appaiano tra loro: le prime possiedono una sequenza amminoacidica che distingue gli anticorpi originati da cloni differenti e serve per il riconoscimento di vari epitopi antigenici; le seconde sono responsabili delle funzioni effettrici degli anticorpi [27]. Solo le regioni costanti della catena pesante servono per ancorare l'anticorpo stesso alla membrana plasmatica dei linfociti B [27]. Nelle catene pesanti, la regione V è composta da un dominio Ig e la regione C da tre-quattro domini Ig, mentre le catene leggere sono costituite da una regione V e da una regione C ognuna con un singolo dominio Ig [27] (Figura 22).

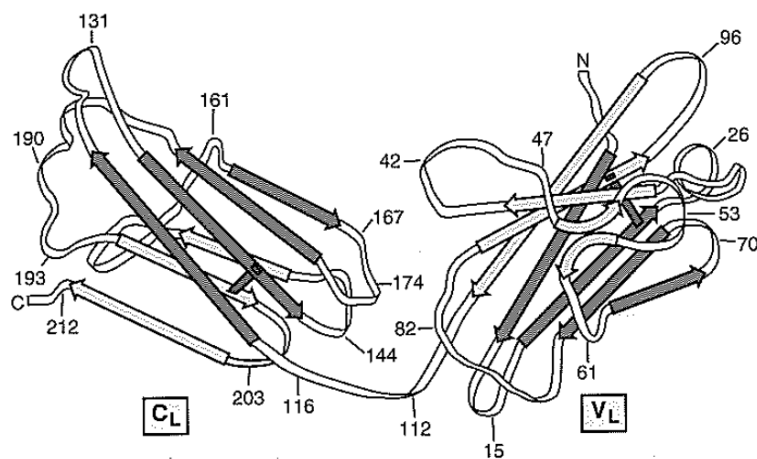


Figura 22. Struttura della catena leggera di un anticorpo. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, "Cellular and molecular immunology", sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders. [27]

Tra le catene pesanti sono presenti due ponti disolfuro preceduti da una regione a cerniera (regione *hinge*) che consente una discreta flessibilità del

sistema, importante per consentire la massima interazione e adattamento con l'antigene.

Le differenze di sequenza tra i diversi anticorpi si concentrano in tre segmenti delle regioni V della catena pesante e della catena leggera, definiti regioni ipervariabili o regioni che determinano la complementarità (*complementary-determining regions*, CDR). Sono tre anse sporgenti, di una lunghezza di 10 amminoacidi, che connettono i nastri adiacenti dei foglietti β formanti i domini V delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline ^[27]. Le CDR del dominio VL e del dominio VH si associano a formare una struttura tridimensionale, ovvero il sito di legame per l'antigene, e sono definite CDR1, CDR2 e CDR3 ^[27].

Altra struttura fondamentale è la regione Fab, ovvero quella porzione anticorpale che comprende tutte le regioni variabili e la prima sequenza delle catene costanti H e L coinvolte nel riconoscimento antigenico.

Una terza porzione dell'anticorpo è quella composta da due peptidi identici legati da ponti disolfuro contenenti i domini CH2 e CH3 della catena pesante; essi tendono ad aggregarsi tra loro e a cristallizzare formando un reticolo; per questo motivo sono chiamati frammenti Fc (*fragment crystallizable* o frammento cristallizzabile) ^[27] (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

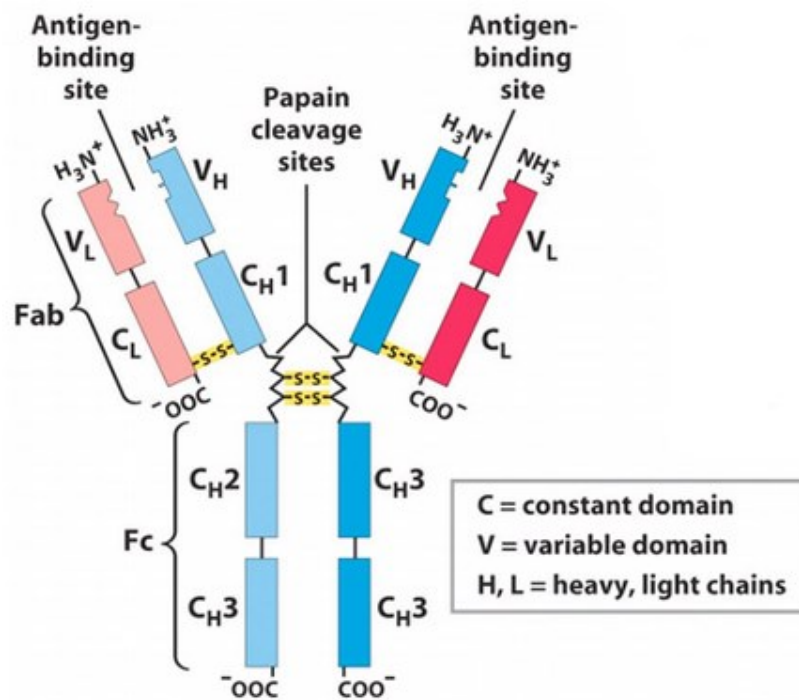


Figura 23. Struttura di un anticorpo. <https://www.microbiologiaitalia.it/immunologia/generare-diversita-come-le-nostre-cellule-producono-anticorpi/>

I linfociti B si sviluppano, durante lo sviluppo embrionale, nel fegato fetale, mentre dopo la nascita, dal midollo osseo. Essi subiscono un processo di maturazione che si basa su riarrangiamenti e sull'espressione di geni delle immunoglobuline, portando alla selezione e alla proliferazione delle cellule B allo stadio maturativo che, nell'uomo, impiega 2-3 giorni ^[27] (**Errore.**

L'origine riferimento non è stata trovata.)

In questa fase viene espresso il pre-recettore per l'antigene che conduce alla selezione del repertorio di linfociti B maturi ^[27].

Il primo progenitore midollare è detto cellula pro-B: non produce immunoglobuline ma si distingue in cellule immature che esprimono marker di superficie come CD19 e CD10.

Si verifica una ricombinazione della sequenza della catena pesante mediata dalle proteine Rag e l'aggiunta casuale di nucleotidi N mediata dall'enzima Tdt; ciò origina il gene della catena H ricombinato (VDJ ricombinato).

Successivamente si verifica l'aggiunta di code di poliadenine all'estremità 3' dell'RNA C μ , degli eventi di splicing e la traduzione della catena pesante I μ .

Segue la differenziazione della cellula in cellula pre-B, ovvero della linea differenziativa B, che esprime la proteina I μ .

Le due catene, leggera e pesante si assemblano creando le proteine I α e I β e formando il recettore delle cellule pre-B (pre-BCR). Esso regola il riarrangiamento dei geni delle Ig, determinando la l'espressione di proteine della catena pesante delle Ig codificate da uno solo dei due alleli ereditati.

Ogni cellula B riarrangia i geni della catena leggera κ o λ , producendo la proteina della catena leggera, la quale si associa alla catena μ , formando la IgM completa. Questo tipo di cellula appena formata prende il nome di linfocita B immaturo.

I linfociti B immaturi non proliferano e si differenziano in risposta agli antigeni, migrando verso la milza per proseguire la maturazione.

In questa localizzazione, le cellule acquisiscono la capacità di proliferare e popolare gli organi linfoidi secondari. Infine, raggiungono i follicoli linfoidi, dove riconoscono e rispondono ad antigeni estranei (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

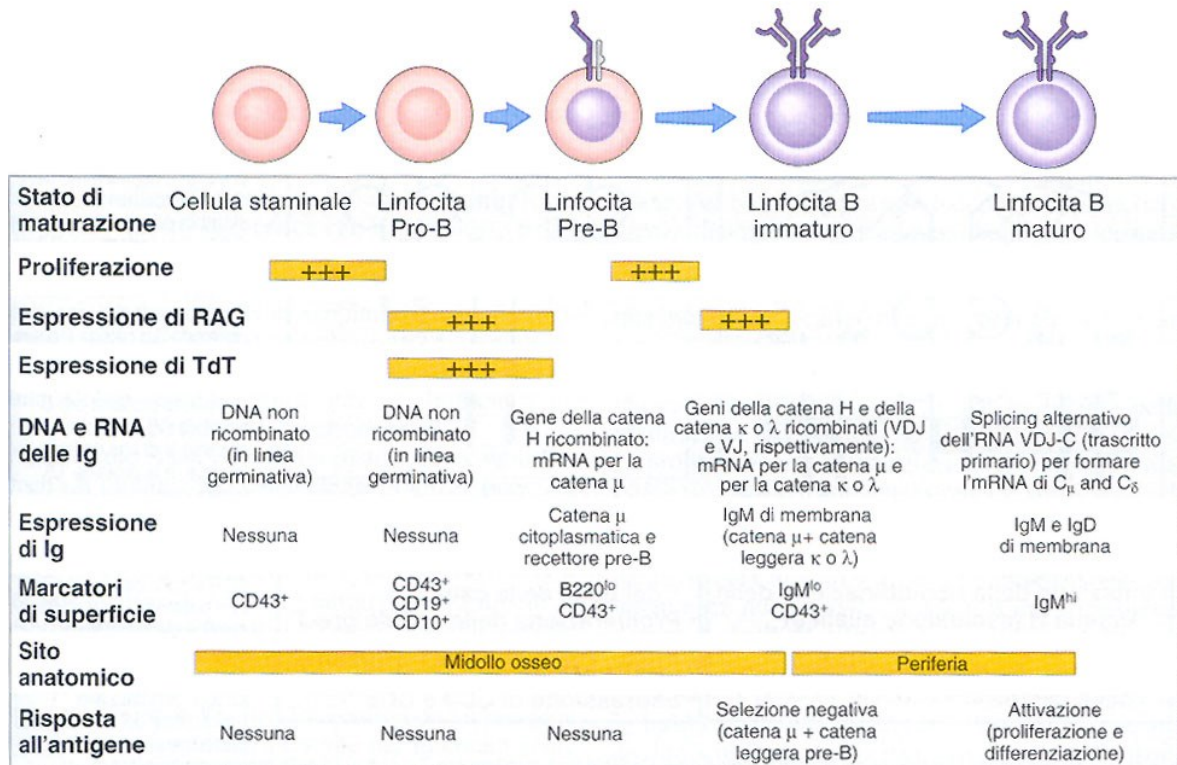


Figura 24. Fasi della maturazione dei linfociti B. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, "Cellular and molecular immunology", sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders [27].

Tra le funzioni mediate dagli anticorpi sono comprese la neutralizzazione dei microbi e delle tossine microbiche, l'attivazione del sistema del complemento, l'opsonizzazione degli antigeni per facilitarne la fagocitosi e l'ipersensibilità immediata tramite cui si verifica l'attivazione dei mastociti [27].

Il riconoscimento tra antigene e anticorpo avviene in modo specifico sulla membrana delle cellule B naïve, attivando i linfociti B e favorendo l'eliminazione del microrganismo tramite fagocitosi o mediante il rilascio di mediatori della flogosi da parte di alcuni leucociti, come, ad esempio, i mastociti.

Durante il meccanismo di difesa, il sistema immunitario produce vari tipi di immunoglobuline, ognuna con una specifica struttura e azione (**Errore.**

L'origine riferimento non è stata trovata.). Quelle più importanti sono:

- immunoglobulina A (IgA): ha una struttura dimerica dove le unità sono legate dalla catena J ausiliaria al C-terminale; possiede la catena pesante α (1 o 2); si trova nel colostro e nelle secrezioni, è importante per l'immunità delle mucose e l'immunità neonatale perché rappresenta la prima linea di difesa trasferita dalla madre al lattante. È prodotta dal tessuto linfoide e si trova nel tratto digerente e respiratorio, nella bile, nella saliva e nel latte materno.
- immunoglobulina D (IgD): si trova sulla superficie dei linfociti B immaturi, è coinvolta nell'attivazione dei linfociti B e nella loro maturazione in plasmacellule, non si trovano nel plasma; possiede una catena pesante δ .

- immunoglobulina E (IgE): ha una struttura monomerica, possiede una catena pesante ϵ ; è associata ai mastociti e coinvolta nell'ipersensibilità immediata (allergie), nelle malattie di immunosensibilità e nella difesa contro i parassiti.
- immunoglobulina G (IgG): ha una struttura monomerica, possiede una catena pesante γ (1, 2, 3 o 4); è coinvolta nell'opsonizzazione, nell'attivazione del complemento e dei macrofagi, nella citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, nell'immunità neonatale, nel feedback inibitorio delle cellule B. Esistono 4 classi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- immunoglobulina M (IgM): ha una struttura pentamerica le cui unità sono assemblate dalla catena J ausiliaria mediante ponti disolfuro; contiene una catena pesante μ ; può essere presente in forma monomerica quando è ancora attaccata alla superficie dei linfociti B; si trova nel siero dopo l'avvenuto contatto con l'antigene; è coinvolta nell'opsonizzazione e nell'attivazione del complemento per la distruzione del patogeno.

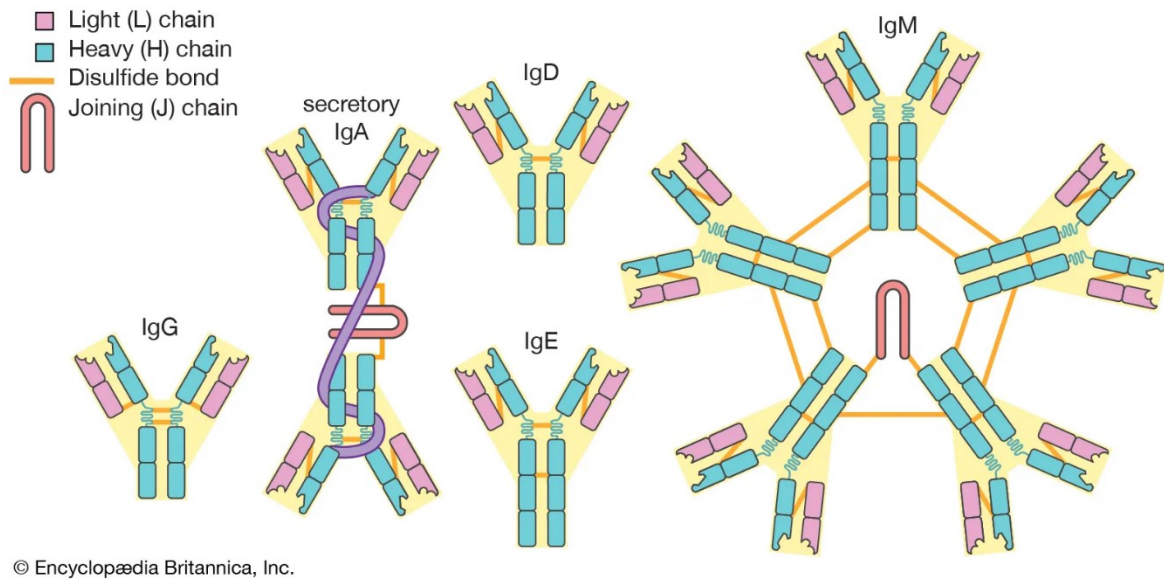


Figura 25. Le diverse classi di immunoglobuline. <https://www.britannica.com/science/immune-system/Classes-of-immunoglobulins>

Le caratteristiche della risposta immunitaria adattativa sono ^[27] (**Errore.**

L'origine riferimento non è stata trovata.):

- specificità e diversificazione: la risposta immunitaria è specifica verso porzioni distinte di una singola proteina, o polisaccaride o altre macromolecole, identificate come epitopi o determinanti antigenici. Questi vengono riconosciuti dai linfociti, i quali esprimono recettori di membrana in grado di discriminare le piccole differenze tra i diversi antigeni. I linfociti possono riconoscerne un enorme numero, denominato repertorio linfocitario, stimato essere composto da 10^9 discriminanti antigenici. Questa proprietà è detta diversificazione ed è

il risultato della variabilità dei siti di legame con l'antigene dei recettori linfocitari.

- memoria: l'esposizione del sistema immunitario ad un antigene estraneo permette di sviluppare una memoria immunitaria per cui, in seguito a successive reinfezioni (o infezioni secondarie) da parte dello stesso microrganismo, la risposta è più rapida, potente e qualitativamente diversa dalla risposta primaria. Questo si realizza perché ogni esposizione ad un antigene espande il clone linfocitario specifico per quell'antigene e si verifica la stimolazione di linfociti naïve per produrre cellule della memoria.
- espansione clonale: i linfociti appartenenti allo stesso clone proliferano a seguito del riconoscimento con l'antigene. Ovvero si ha l'aumento del numero di linfociti che esprimono un recettore identico per lo stesso antigene. Ciò permette una migliore risposta immunitaria adattativa.
- specializzazione: la natura degli anticorpi o dei linfociti T varia in base alla classe di microbi coinvolti, sfruttando al meglio l'efficienza dei meccanismi di difesa.
- risoluzione e omeostasi: le risposte immunitarie si esauriscono nel tempo dopo la stimolazione antigenica, riportando il sistema immunitario al suo stato di riposo (o omeostasi). Lo stato di risoluzione

si mantiene perché le risposte immunitarie mirano ad eliminare gli antigeni, eliminando lo stimolo fondamentale per l'attivazione dei linfociti stessi e inducendo la morte dei linfociti per apoptosi.

- non reattività verso il self: il sistema immunitario riconosce, risponde ed elimina antigeni estranei all'organismo (nonself) senza reagire alle sostanze antigeniche prodotte dall'individuo (self). La non reattività è detta tolleranza; essa viene preservata mediante, ad esempio, l'eliminazione dei linfociti che esprimono recettori specifici per alcuni antigeni self. Alterazioni nell'induzione o nel mantenimento della tolleranza al self determinano risposte immunitarie contro antigeni self (antigeni autologhi) che spesso causano malattie autoimmuni.

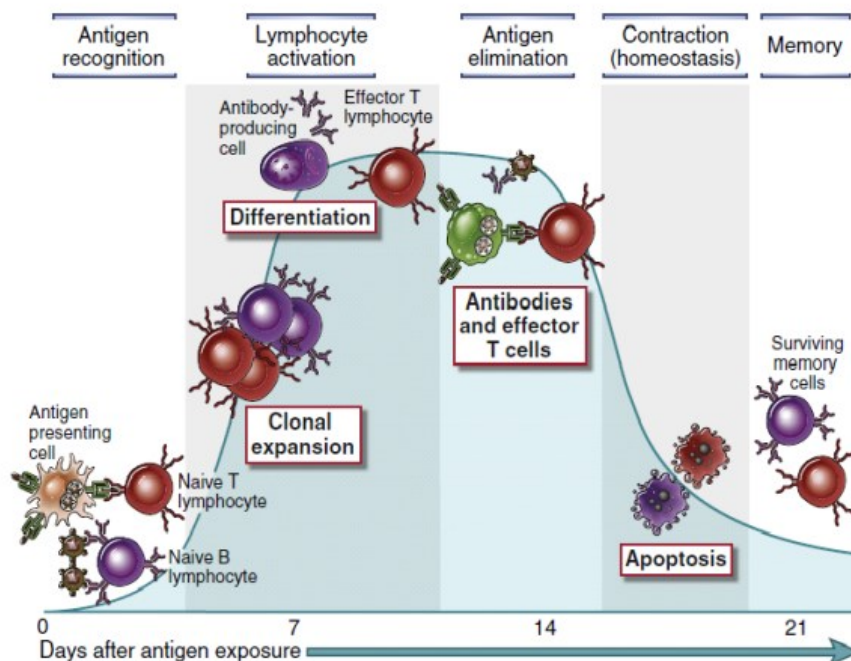


Figura 26. Fasi dell'immunità adattativa. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, "Cellular and molecular immunology", sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders [27].

5.3 Intervento delle citochine, morte cellulare e tempesta citochinica [31]

L'attivazione del segnale PRR sostenuta dall'infezione da SARS-CoV-2 induce il rilascio simultaneo di IFN e di citochine proinfiammatorie, quali IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- β , IFN- γ e IL-17. Il loro ruolo è eliminare l'infezione e mantenere l'omeostasi cellulare [31].

Durante l'infezione virale, però si può verificare una disregolazione del rilascio di citochine proinfiammatorie che contribuisce alla comparsa della cosiddetta tempesta citochinica, una condizione causata dall'eccessiva

produzione di citochine determinata dalla morte cellulare infiammatoria (PANoptosi), alla quale contribuiscono anche il TNF e l'IFN- γ ^[31]. Essa rappresenta un tipo di morte cellulare programmata indotta dall'infezione e stimolata dall'immunità innata con il coinvolgimento dei PANoptosomi, complessi contenenti la caspasi con o senza i componenti dell'inflammasoma e le proteine contenenti RHIM. Come detto in precedenza, la PANoptosi è indotta dalla cooperazione del TNF e del IFN- γ , e dipende dalla trasduzione e dall'attivazione della trascrizione dei segnali STAT1 e IRF1, i quali attivano la caspasi-8 per condurre alla morte della cellula (Figura 27).

Quindi, per riassumere, è possibile affermare che, a seguito dell'infezione virale, si manifesta una stimolazione dei macrofagi, i quali portano al rilascio di alti livelli di STAT1, IFNGR1, IFNGR2, NFKB1 e IL-1 β , coinvolti nella determinazione della malattia grave da COVID-19. Ad aggravare la situazione, si può verificare una grande secrezione di citochine, nota come “tempesta citochinica”, che provoca danni potenzialmente letali ai tessuti e agli organi dell'individuo ^[31] (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

Il legame tra la tempesta citochinica e la morte cellulare, causate dall'infiammazione, può giustificare il danno polmonare e la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), il deterioramento strutturale delle

membrane cellulari endoteliali e dei vasi cardiaci riscontrati in alcuni pazienti con COVID-19 [31].

Dopo l'infezione da SARS-CoV-2, le cellule T CD4+ vengono attivate in cellule T helper 1 (Th1) che secernono il fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi (GM-CSF), il quale induce a sua volta la produzione di monociti CD14+ e CD16+ e livelli elevati di IL-6.

L'interazione delle cellule immunitarie causa un aumento della sottopopolazione di monociti CD14+ e IL-1β+ in pazienti con COVID-19 [28].

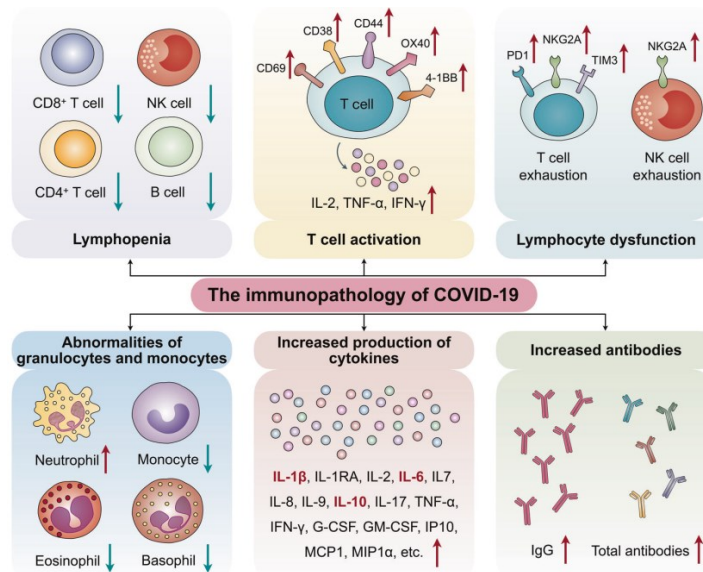


Figura 27. L'immunopatologia del COVID-19. Li Yang, Shasha Liu, Jinyan Liu, Zhixin Zhang, Xiaochun Wan, Bo Huang, Youhai Chen, Yi Zhang, "COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics", *Signal Transduction and Targeted Therapy* volume 5, Article number: 128 (2020), *Nature*, published 25 July 2020; <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00243-2> [28]

Altre anomalie sono state riscontrate nei livelli di granulociti e monociti, inoltre, il rapporto tra neutrofili e linfociti è più elevato in pazienti gravi rispetto a pazienti non gravi, mentre il numero di eosinofili, basofili e monociti è notevolmente ridotto in pazienti gravi [28].

Un eccesso di TNF limita la maturazione dell'affinità delle cellule B, lo switching isotipico e la produzione di anticorpi maturi, conducendo ad ulteriori danni su questi pazienti [31] (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

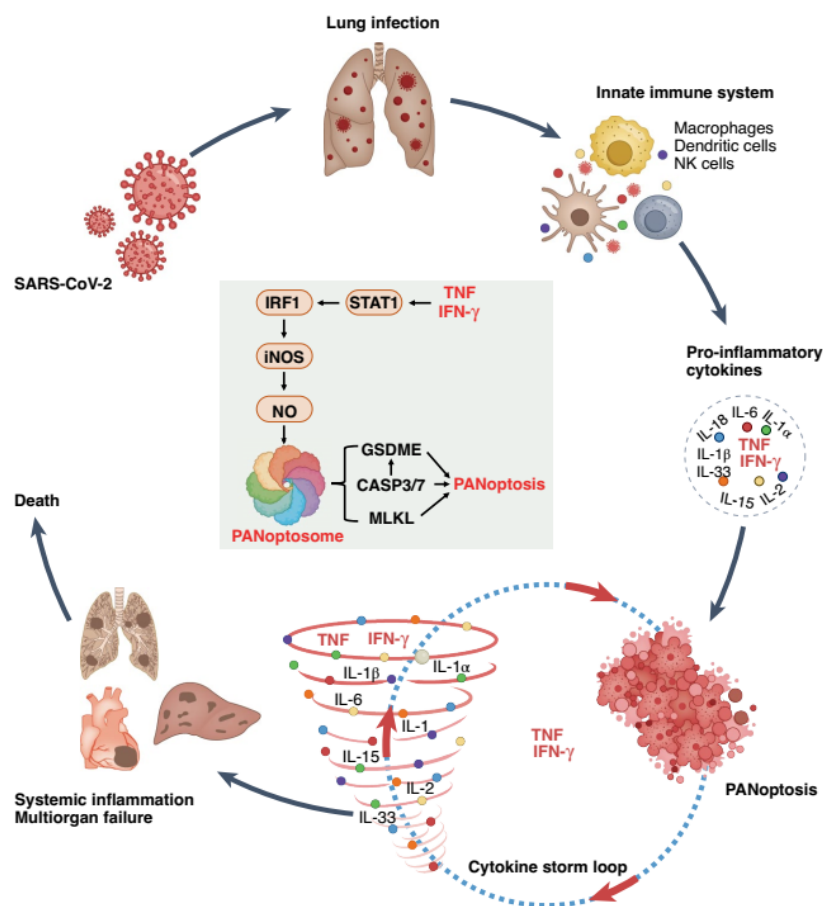


Figura 28. PANoptosi e tempesta citochinica durante l'infezione da SARS-CoV-2. Michael S. Diamond, Thirumala-Devi Kanneganti, "Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2", *Nature Immunology* volume 23, pages165–176 (2022), published 01 February 2022, <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01091-0> [31]

Inoltre, le cellule Th17 producono citochine infiammatorie IL-17, che reclutano monociti, macrofagi e neutrofilo sul sito di infezione e stimolano un'ulteriore cascata citochinica mediata dalle IL-1 β e IL-6 ^[28].

6. Diagnosi

La diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 può avvenire in varie modalità: con la diagnosi diretta a partire da tampone naso-faringeo, o lavaggio bronco-alveolare (BAL) o saliva, oppure con la diagnosi indiretta ricercando immunoglobuline, come le IgG e le IgM in un campione di siero.

La diagnosi diretta prevede l'utilizzo di saggi molecolari classici o rapidi oppure la ricerca dell'antigene virale mediante metodi immunocromatografici o chemiluminescenti.

6.1 Saggi molecolari classici e rapidi

I saggi molecolari classici e rapidi eseguono una Real Time PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) su un tampone orofaringeo o nasale, per la determinazione della presenza di RNA virale, compresi i geni dell'envelope (env), del nucleocapside (N), della spike (S), della RNA Polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e della ORF1 ^[35].

In seguito all'estrazione dell'RNA genomico dal campione clinico, si effettua una retrotrascrizione del genoma a RNA di SARS-CoV-2 al fine di ottenere una molecola di DNA copia (cDNA) la quale verrà amplificata. Essa servirà per rilevare e quantificare la molecola di RNA virale di SARS-CoV-2 presente nel campione originario utilizzando sonde marcate che emettono fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione in modo proporzionale, nella fase esponenziale della reazione, alla quantità di RNA virale presente nel tampone di partenza.

La determinazione della quantità di genoma virale all'interno del campione avviene stabilendo una linea soglia (o linea di *threshold*), ovvero una linea tracciata dall'operatore (o dal sistema automatizzato) in modo da intersecare la fase esponenziale della curva in cui l'efficienza della reazione è massima e separa il rumore di fondo da un segnale a crescita esponenziale. Il ciclo soglia (o ciclo di threshold o Ct) corrisponde al ciclo di amplificazione della reazione in cui il segnale di fluorescenza è superiore alla threshold; esso è inversamente proporzionale alla quantità di materiale di partenza: più basso è il ciclo soglia, maggiore sarà la quantità di genoma virale presente nel campione; più alto è il ciclo soglia, minore sarà la quantità di genoma virale presente (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) ^[2].

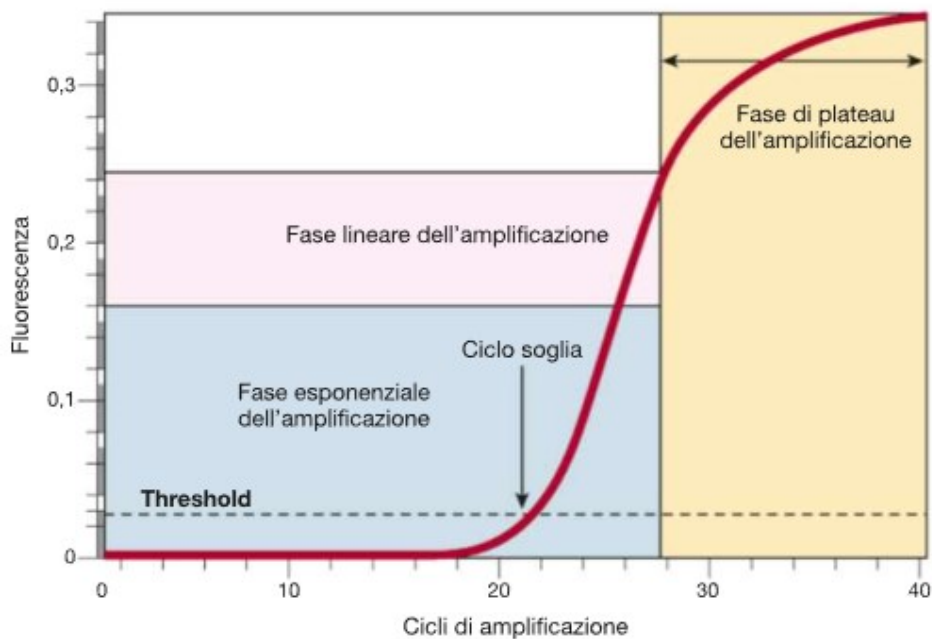


Figura 29. Curva di amplificazione in una Real Time PCR. Antonelli Guido, Clementi Massimo, Pozzi Gianni, Rossolini Gian Maria, "Principi di Microbiologia Medica", 4 edizione, casa editrice Ambrosiana, 2023 [2]

Questo tipo di test viene eseguito in un arco di tempo che intercorre dalla comparsa dei primi sintomi fino alla loro scomparsa.

Un fattore importante da considerare è che un risultato positivo alla Real Time PCR riflette la determinazione di RNA virale e non necessariamente la sua presenza [35]. Infatti, in alcuni casi l'RNA virale è stato identificato anche dopo 6 settimane dal primo risultato positivo [35].

6.2 Ricerca dell'antigene virale

In un campione salivare o nasofaringeo, si possono ricercare gli antigeni virali, tra cui la proteina S, più frequentemente, la proteina N di SARS-CoV-2. Essi possono essere rapidi immunocromatografici o strumentali chemiluminescenti.

I metodi rapidi immunocromatografici si basano sul test immunocromatografico a flusso laterale o *Lateral Flow Test*, ovvero una reazione antigene-anticorpo su un supporto solido poroso. A seguito dell'aggiunta del campione biologico e dell'eventuale formazione di un complesso antigene-anticorpo coniugato con sfere colorimetriche o fluorescenti, si manifesterà la comparsa o meno di una striscia sulla zona di test. Questa si verifica grazie alla presenza o di anticorpi specifici che riconoscono un altro epitopo antigenico (zona test) o di anticorpi anti-anticorpi coniugati (zona controllo).

Nel caso di test positivo, il complesso antigene-anticorpo si legherà nella zona di test; mentre nel caso di test negativo il complesso antigene-anticorpo non si sarà creato precedentemente e di conseguenza non verrà evidenziata la linea di test. Il risultato deve essere sempre confermato dalla presenza della linea di controllo (figura 27) ^[2].

6.3 Saggi sierologici e chemiluminescenti

Gli anticorpi prodotti da un individuo venuto in contatto con il virus

rimangono circolanti nel sangue, e in particolare nel siero, per alcuni mesi. Da qui il nome di sierodiagnosi. Con questo metodo diagnostico vengono ricercate le immunoglobuline IgM, ovvero le prime immunoglobuline a comparire a seguito del contatto con gli antigeni virali, ma anche le prime a scomparire, e IgG, che compaiono più tardivamente e rimangono in circolo per mesi o anni. Contrariamente a quanto si verifica per altre infezioni virali, per virus come SARS-CoV-2, la ricerca delle IgM può essere fuorviante, poiché è stato notato come le IgM possano comparire anche dopo le IgG, o prima dell'inizio dei sintomi o permanere per molto tempo.

Nella figura 30 si può vedere come la comparsa di immunoglobuline IgG e IgM sia quasi contemporanea dopo circa 1 settimana dall'inizio dell'infezione.

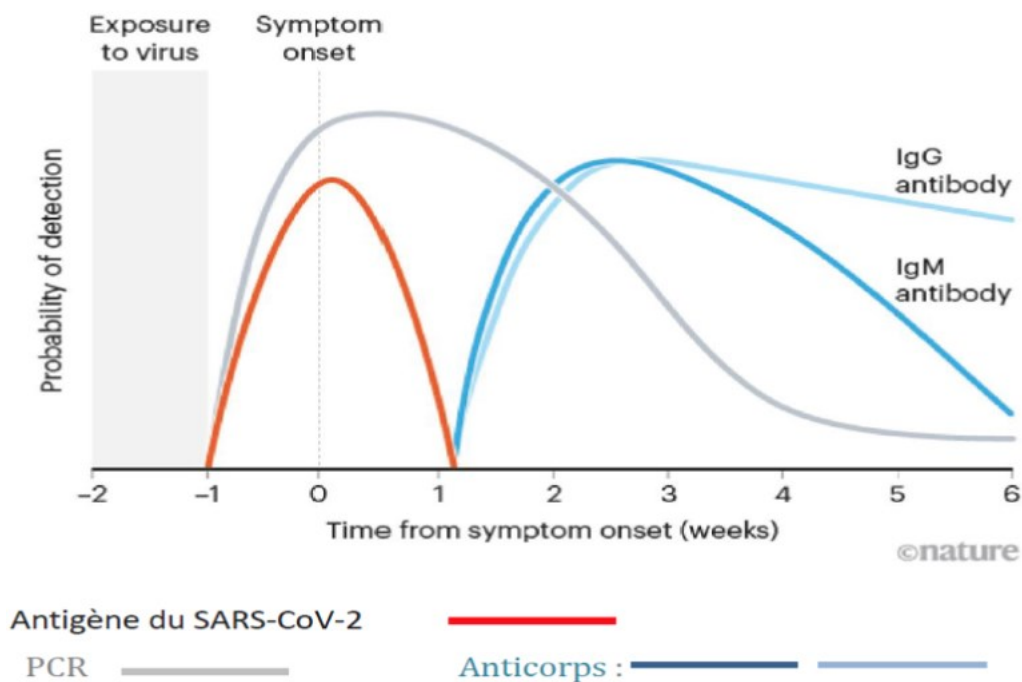


Figura 30. Evoluzione della risposta anticorpale mediata dagli anticorpi IgG e IgM. François Simon, 27 ottobre 2020, DOI: 10.1056/NEJMp2025631, <https://www.imea.fr/article/sars-cov-2/le-point-virologique-sur-les-test-de-detection-des-antigenes-du-sars-cov-2>

In altri casi è possibile valutare l'aumento del titolo anticorpale, ovvero la differenza del quantitativo di anticorpi rilevata in più fasi dell'infezione, come la fase acuta o la fase di convalescenza ^[2].

Tipicamente vengono ricercate le immunoglobuline totali, ovvero IgG e IgM, perché la sierconversione da IgM a IgG avviene tra la terza e la quarta settimana dall'esordio dell'infezione. Infatti, i livelli delle IgM iniziano a diminuire verso la 5 settimana di infezione per poi scomparire dalla settimana; da questo momento compaiono le IgG che permangono per molti mesi o anni ^[35].

Tra i metodi sierologici la tecnica più utilizzata è il saggio di legame basato su tecniche immunometriche come ELISA (saggio di legame immunometrico) e CLIA (saggio in chemiluminescenza).

Essi prevedono l'adesione di proteine virali (Spike e N) ad un supporto solido con biglie di polistirene. A seguito dell'aggiunta del campione biologico, se contenente anticorpi specifici, si crea il complesso antigene-anticorpo. A questo si lega un anticorpo anti-immunoglobuline umane e coniugato con un enzima che reagisce con idonei substrati determinandone il cambiamento di colore (per l'ELISA) o una reazione chemiluminescente (per il CLIA). La rilevazione della colorazione o della luminescenza avviene con sistemi opportuni ^[2].

Questo test viene eseguito per pazienti che hanno una malattia da lieve a moderata, o a partire dalle prime 2 settimane dall'infezione virale ^[35] (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

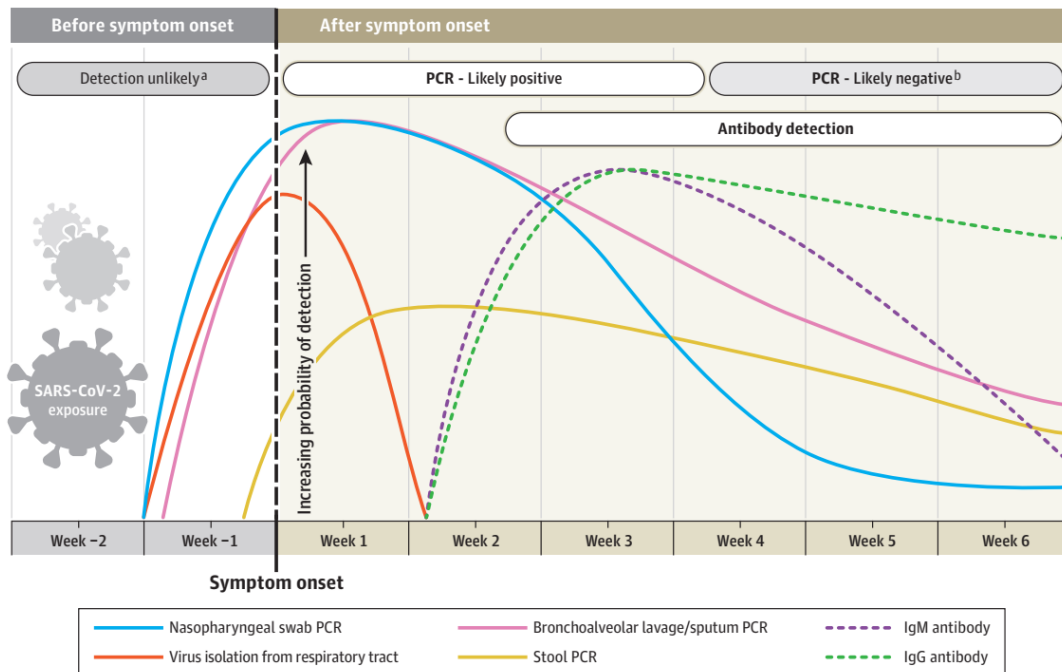


Figura 31. Variazione stimata nel tempo dei test diagnostici per la determinazione dell'infezione da SARS-CoV-2. Nandini Sethuraman, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Akihide Ryo, "Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2", May 6, 2020, JAMA. 2020;323(22):2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259, <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2765837> ^[35]

6.4 Saggi di neutralizzazione

La prova di neutralizzazione è una tecnica generale che comprende

l'inibizione dell'emoadsorbimento, l'inibizione dell'interferenza, la riduzione delle placche o l'inibizione.

In questo saggio, piccole quantità standard di virus sconosciuto e di antisiero di riferimento vengono fatti reagire insieme, in condizioni di tempo e temperatura idonee per determinare la formazione del complesso antigene-anticorpo.

Il prodotto della reazione viene inoculato in cellule (*in vitro*) in modo da poter determinare l'infezione. L'assenza di segni dell'infezione indica che l'infettività virale è stata neutralizzata dall'antisiero e permette così di identificare l'agente infettivo.

7. Vaccini

Alcuni mesi dopo la diffusione del SARS-CoV-2, che ha provocato la pandemia da COVID-19, sono stati sviluppati diversi vaccini per combattere l'infezione e prevenire la manifestazione di una malattia grave.

Inizialmente sono stati tentati diverse tipologie di vaccini ad oggi conosciute, come vaccini a virus inattivato, vaccini con particelle pseudovirali veicolanti la proteina S, vettori adenovirali con sequenze di cDNA di SARS-CoV-2, vaccini a DNA e infine vaccini a mRNA [2].

Un vaccino, per poter essere approvato, deve superare tre fasi di sperimentazione (su piccola, media e larga scala) per verificare eventuali effetti collaterali che potrebbe possedere. Molti dei vaccini proposti da aziende farmaceutiche di tutto il mondo non hanno superato questa fase. Gli unici ad essere stati approvati entro il 2020 dalla FDA (*Food and Drug Administration*) e dall'EMA (*European Medicine Agency*) sono stati:

BioNTech/Pfizer, Moderna, Johnson & Johnson, Gamaleya (Sputnik V), Astra Zeneca, Novavax, Sinopharm e SinoVac.

Vaccino BioNTech/Pfizer Comirnaty BNT162b2

Il vaccino BioNTech Comirnaty BNT162b2 è un vaccino ad mRNA prodotto dall'azienda BioNTech Pfizer.

Il principio con la quale è stato creato si basa sull'incapsulamento dell'acido nucleico RNA messaggero (mRNA) codificante per la glicoproteina S di SARS-CoV-2 all'interno di glicoparticelle lipidiche. A seguito dell'inoculazione intramuscolo del vaccino, le particelle lipidiche permettono il trasferimento dell'mRNA nelle cellule ospiti, determinando l'espressione dell'antigene S di SARS-CoV-2. Il sistema immunitario viene così stimolato a produrre una risposta anticorpale contro l'antigene virale e conferisce una protezione dalla malattia da COVID-19 [36].

Il vaccino può essere somministrato:

- ad adulti e bambini con età non inferiore ai 12 anni con un quantitativo di 2 dosi (ognuna da 0.3 ml) dalle 3 alle 8 settimane di distanza,
- a bambini tra i 5 e gli 11 anni con 2 dosi da 0.1 ml dalle 3 alle 8 settimane di distanza,

- a bambini dai 6 mesi ai 4 anni con 2 dosi da 3 mcg dalle 3 alle 8 settimane di distanza,
- a soggetti immunocompromessi con una distanza di 28 giorni tra la seconda e la terza dose.

Gli effetti collaterali riportati a seguito di somministrazione vaccinale comprendono: dolore e gonfiore nel sito di inoculazione, febbre, affaticamento, mal di testa, dolori muscolari, nausea, linfadenopatia, rara reazione allergica e raro abbassamento unilaterale temporale del viso ^[36]. Sono stati identificati dei casi di morte a seguito di vaccinazione, ma è stata constatata una non-correlazione con la somministrazione: infatti, si è ritenuto che la causa fosse dovuta ad arterosclerosi e arresto cardiaco.

Vaccino Moderna (NIAID) Spikevax mRNA-1273

Il vaccino Moderna (NIAID) Spikevax mRNA-1273 è basato sull'utilizzo di un mRNA incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNP) che codifica per la proteina S di SARS-CoV-2 e i suoi siti di clivaggio S1 e S2, i quali includono una componente transmembrana. Una volta avvenuta la codifica dell'mRNA all'interno delle cellule ospiti, verranno espressi gli antigeni S del virus, i quali verranno riconosciuti dagli anticorpi prodotti dall'individuo e prevenire così la malattia da COVID-19 ^[36].

Il vaccino viene somministrato intramuscolo con 2 dosi da 100 mcg dalle 4 alle 8 settimane di distanza a individui adulti e ad individui dai 12 ai 17 anni. Per individui immunocompromessi sono consigliate 3 dosi a distanza di 28 giorni dalla seconda.

Il vaccino può provocare effetti collaterali quali dolore e gonfiore nel sito di inoculazione, febbre, affaticamento, mal di testa, dolori muscolari e articolari, nausea, ipersensibilità. Durante gli studi clinici sono stati evidenziati dei casi (<0.1%) di paralisi di Bell [36].

Complessivamente i due vaccini a mRNA hanno avuto un'efficienza, a distanza di 7 o più giorni dopo la somministrazione della seconda dose, pari a 69% nella prevenzione dell'infezione e 86% contro malattia grave o morte [36].

Vaccino Oxford AstraZeneca ChAdOx1 nCov-19

Questo vaccino è basato su sull'Adenovirus di scimpanzé Y25, modificato in modo da poter esprimere la proteina S di SARS-CoV-2. La sua potenzialità è quella di saper indurre una risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata [37].

Tra gli effetti collaterali causati dal vaccino si sono riscontrati dolore e rossore nel sito di inoculazione, mal di testa, affaticamento, mialgia, febbre e nausea

ma anche trombocitopenia trombotica immune indotta dal vaccino (VITT) e trombosi con sindrome trombocitopenica (TTS) ¹³⁸l.

Vaccino Johnson & Johnson Janssen Ad26.CoV2.S

Il vaccino Ad26.CoV2.S è basato su un vettore virale ricombinante che porta il dsDNA della proteina S di SARS-CoV-2 in cellule umane provocando una risposta immune nei suoi confronti mediata dalle cellule B e T.

Il vaccino viene somministrato a individui adulti e con età non inferiore ai 18 anni in singola dose. Una inoculazione aggiuntiva viene raccomandata per individui immunocompromessi.

Tra gli effetti collaterali che può provocare il vaccino si possono riscontrare: dolore e rossore nel sito di inoculazione, mal di testa, affaticamento, mialgia, febbre e nausea. Le reazioni avverse variano in base all'età, nelle fasce 18-59 anni e 60-65 anni; quelle gravi comprendono trombosi con sindrome trombocitopenica (TTS), trombocitopenia immunitaria (ITP) e sindrome di Guillain-Barré (GBS) e sincope ¹³⁶l.

Vaccino Novavax Nuvaxovid NVX-CoV2373

Esso contiene nanoparticelle della proteina Spike ricombinante, prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante, e adiuvanti della proteina M ¹³⁶l.

L'inoculazione del vaccino avviene intramuscolo e, a seguito dell'espressione delle proteine ricombinanti, il sistema immunitario dell'individuo produrrà anticorpi che serviranno per la protezione dalla malattia da COVID-19 [36].

La somministrazione di due dosi viene consigliata ad individui con età maggiore di 18 anni e con una distanza temporale di 3-8 settimane. Al contrario degli altri vaccini, questo non è stato autorizzato per la vaccinazione di individui immunocompromessi e reazioni allergiche a componenti del vaccino [36].

Gli effetti collaterali comprendono: dolore e rossore nel sito in inoculazione, affaticamento e malessere, dolori muscolari e articolari, mal di testa, nausea e vomito, febbre. Tra quelli più gravi si evidenziano miocardite, pericardite, reazioni di ipersensibilità, reazioni correlate a linfadenopatia, diminuzione dell'appetito.

Sono stati condotti degli studi registrativi per comprendere l'efficacia dei singoli vaccini tra prima e seconda dose.

Dopo 14 giorni, l'efficacia della vaccinazione con una dose di ChAdOx1 nCov-19 (*AstraZeneca*) e una seconda dose con un vaccino a mRNA (*BioNTech* o *Moderna*) era dell'88% [20].

Di seguito viene illustrata l'efficacia dei vaccini a mRNA (*Pfizer-BioNTech* o *Moderna*) e *AstraZeneca* [20]:

- dopo la seconda dose è stata del 44,8%, 71,3% e 75,1% per il vaccino *AstraZeneca*, il vaccino *Pfizer-BioNTech* e il vaccino *Moderna*, rispettivamente;
- dopo la seconda dose, il vaccino *Pfizer-BioNTech* ha manifestato un'efficacia del 96% nel prevenire casi gravi, fatali o critici di infezione da COVID-19;
- in bambini dai 5 agli 11 anni è stata riscontrata un'efficacia del 90,7% per il vaccino *Pfizer-BioNTech*;
- il vaccino *Moderna* ha avuto una efficacia del 96,3%.

Al fine di ottenere una migliore copertura vaccinale e una maggiore stimolazione immunitaria, è stata consigliata la somministrazione di una terza dose. I vaccini proposti sono stati *Pfizer-BioNTech* e *Moderna* poiché è fondamentale per la protezione contro la malattia COVID-19. Questo vaccino ha un'efficacia vaccinale del 93%. Per ricovero ospedaliero, 92% per malattia grave, e 81% per mortalità dovuta a COVID-19 dopo una dose di richiamo. Inoltre, un altro studio ha dimostrato che le persone con COVID-19 beneficiano del terzo dosaggio. L'efficacia della vaccinazione è stata del 92,9% greggio e 89,1% rettificato, secondo i dati ^[20].

8. Opzioni terapeutiche

Al fine di contrastare l'infezione virale e attenuare i sintomi causati dalla malattia da COVID-19, oltre alla somministrazione di dosi vaccinali e di ossigeno per i casi più gravi, sono state proposte terapie antivirali o immunomodulatorie, quali:

- antivirali:
 - inibitori degli enzimi virali (remdesivir, molnupiravir, paxlovid),
 - anticorpi monoclonali,
 - plasma iperimmune,
- antiinfiammatori:
 - FNS (paracetamolo, salicilato, ibuprofene),
 - cortisone (in casi gravi),
- anticoagulanti: eparina a basso peso molecolare,
- potenziali terapie immunomodulanti.

I farmaci antivirali e gli anticorpi monoclonali hanno il compito di bloccare o inibire la replicazione virale, inibendo l'attività degli enzimi virali o prevenendo il legame della proteina S del virus ^[31].

In aggiunta, sono state investigate delle strategie antivirali che modulano l'attivazione della risposta immunitaria e dell'infiammazione: l'interferone di

tipo I è stato testato per casi clinici gravi. In particolare, il trattamento con l'IFN- $\alpha 2\beta$ riduce il tempo di clearance virale nel tratto respiratorio superiore e il tempo di risoluzione dell'inflammation sistemica ^[31].

Le terapie immunomodulatorie sono state valutate per casi clinici di COVID-19 indotte dalla tempesta citochinica e dalla morte cellulare. È stato proposto l'utilizzo di corticosteroidi, come il dexametasone, il quale può inibire la produzione di citochine proinfiammatorie e prevenire l'infezione sistemica. Il trattamento con dexametasone è stato consigliato a pazienti che necessitano di ventilazione meccanica e ossigeno supplementare ^[31].

Sono state considerate anche terapie anti-citochine come l'anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 diretto contro il recettore dell'IL-6, detto tocilizumab: esso viene somministrato a pazienti ospedalizzati che ricevono corticosteroidi sistemici e ossigeno supplementare, ventilazione. Ciò avviene perché la IL-6 svolge ruoli protettivi e patologici nella risposta immunitaria all'infezione virale attraverso il controllo dell'espressione genica e delle vie di segnale. Il trattamento di pazienti con anti-IL-6 e un mix di anticorpi monoclonali migliora lo stato clinico e riduce la mortalità ^[31].

Tra gli anticoagulanti è stata riscontrata l'ottima azione dell'eparina a basso peso molecolare, la quale viene utilizzata per infezioni gravi e risolve problemi di micro- e macro-trombosi.

9. Identificazione mediante isolamento virale

Il virus SARS-CoV-2 può essere isolato a partire da un tampone naso-faringeo risultato positivo dopo l'analisi con strumenti diagnostici che effettuano un test molecolare o un test antigenico.

L'isolamento di SARS-CoV-2 avviene su linee cellulari mantenute in coltura, come le cellule epiteliali renali della scimmia cercopiteco grigioverde comunemente denominate cellule Vero E6, che possiedono dei recettori che legano la proteina Spike e hanno deficit nel sistema interferon, permettendo lo sviluppo dell'infezione in vitro.

L'infezione virale si manifesta con effetti biologici, come alterazioni morfologiche visibili al microscopio ottico. Per il SARS-CoV-2 si osserva un effetto citopatico (CPE), dove le cellule infettate vengono danneggiate morfologicamente e strutturalmente, perdendo la forma, creando un'unica cellula multinucleata, inclusioni citoplasmatiche, sincizi cellulari e inducendo la necrosi (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

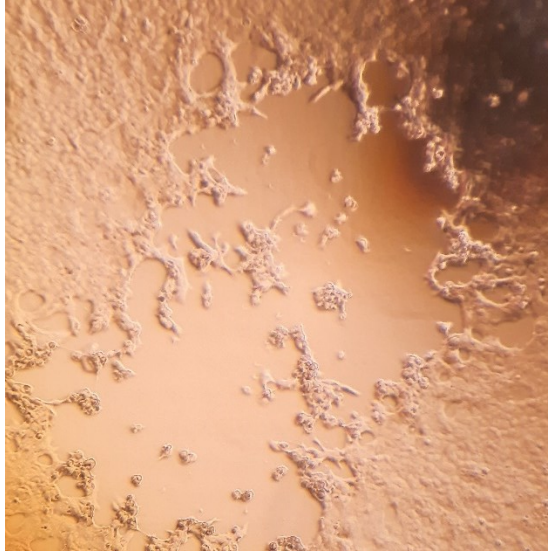


Figura 32. Effetto citopatico causato dall'infezione di SARS-CoV-2 su cellule Vero E6.

L'isolamento virale prevede un'incubazione per lunghi periodi (anche settimane), è poco sensibile perché dipende dalla carica virale, dal tipo di cellule su cui viene eseguito e inoltre è soggetto all'azione di sostanze tossiche presenti nel campione e ad alterazioni delle condizioni di conservazione.

10. Materiali e metodi

10.1 Sequenziamento NGS Illumina

Il sequenziamento viene svolto quando un tampone naso-faringeo, analizzato con test molecolare o antigenico, risulta positivo. Serve per determinare la sequenza del genoma virale presente in quel campione biologico.

Uno dei sequenziamenti di ultima generazione utilizzato all'interno della SOSD Virologia è il *Next Generation Sequencing* (NGS) il quale è una tecnologia di sequenziamento massivo in parallelo. A questo tipo di sequenziamento appartiene il metodo Illumina.

A partire dal campione risultato positivo con alta carica, si esegue un'estrazione automatizzata del genoma virale utilizzando lo strumento automatizzato Elite InGenius (ELITechGroup MDx, Italia).

Successivamente si crea una library del genoma virale, utilizzando il kit EasySeq Nimagen SARS-CoV-2 WGS Library Prep Kit e lo strumento EP Motion 7055. La library consiste nell'amplificazione del genoma virale in numerose copie di cDNA della lunghezza di 300-500 bp. Ad entrambe le estremità, utilizzando un enzima, si aggiunge una adenina (A) che protrude dalla doppia elica e a cui si legano degli adattatori, ovvero brevi segmenti a doppio filamento costituiti da nucleotidi con una timina (T) protrudente.

Si verifica l'appaiamento delle singole molecole di DNA, grazie alla presenza degli adattatori alle estremità, all'oligonucleotide presente sulla cella a flusso che viene poi caricata sullo strumento (MiSeq, Illumina Inc., California, America). Segue la sintesi del filamento complementare di DNA da parte della DNA Polimerasi che utilizza come primer l'oligonucleotide fissato sulla cella a flusso. Ciò genera un doppio filamento di DNA dove solo uno dei due filamenti è legato alla cella, mentre l'altro (utilizzato come stampo), a seguito della denaturazione e del lavaggio, viene eliminato.

Il filamento rimanente (fissato alla cella a flusso) va incontro ad un'amplificazione mediante bridge PCR ^[59]: esso si piega a ponte in modo tale che l'adattatore legato alla sua estremità libera si possa appaiare con un altro oligonucleotide presente sulla cella a flusso. Successivamente avviene la sintesi del filamento complementare da parte della DNA Polimerasi. Essi subiscono un'ulteriore denaturazione che porta alla generazione di singoli filamenti, i quali vanno incontro a nuove bridge PCR. Così, ogni frammento della library viene amplificato diverse volte, generando dei cluster contenenti circa 10^3 copie del filamento da sequenziare. Questo ha lo scopo di rendere il segnale abbastanza forte da poter essere catturato dallo strumento.

Dopo ciò, si rimuovono i filamenti reverse per convenzione, lasciando solo quelli forward. A questi ultimi si appaiano i primer di sequenziamento e inizia la sintesi del filamento complementare.

Durante questo processo, si esegue un sequenziamento di terminazione reversibile a quattro colori, ovvero ogni nucleotide è marcato con un fluoroforo diverso e possiede la capacità di interrompere momentaneamente la sintesi del nuovo filamento fino alla lettura, da parte dello strumento, della fluorescenza del nucleotide precedentemente incorporato. Dopo di essa la sintesi riprende [58,59].

Le sequenze vengono analizzate con l'utilizzo di database online (ad esempio, Stanford) per determinare il *lineage* del virus presente nel campione di partenza.

Le nuove varianti riscontrate vengono sottoposte ad isolamento virale e a test di microneutralizzazione.

10.2 Coltura cellulare di cellule Vero E6

Per poter isolare, propagare e studiare il virus SARS-CoV-2 vengono utilizzate delle linee cellulari specifiche per l'infezione.

Le cellule utilizzate sono in questo studio sono cellule epiteliali renali di scimmia della specie *Cercopithecus aethiops*, comunemente denominate Vero E6.

Esse hanno la caratteristica di esporre sulla loro superficie membranosa il recettore ACE2 e la serina proteasi TMPRSS2, utili per l'ingresso del virus.

Inoltre, avendo dei difetti nel sistema di difesa antivirale basato sull'interferon, permettono la rapida espansione dell'infezione in vitro ^[34].

Queste cellule sono mantenute in coltura all'interno di fiasche. Le fiasche utilizzate hanno una superficie di 25 cm² per cui vengono denominate fiasche piccole, o una superficie di 75 cm² o dette fiasche grandi. Entrambe sono dotate di un filtro forato per permettere lo scambio di aria e mantenere le migliori condizioni (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania).

Le cellule al loro interno formano un monostrato cellulare che si estende fino alla fase di confluenza, ovvero quando la loro proliferazione si arresta alla manifestazione dell'inibizione da contatto. Questa avviene nel momento in cui hanno occupato tutto il substrato a loro disposizione e non possiedono più spazio per potersi dividere.

Il mantenimento in coltura avviene aggiungendo un terreno di crescita completo costituito da:

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM*, Euroclone S.p.a, Italia),
- siero fetale bovino (SFB) al 10% (Euroclone S.p.a, Italia),
- 5 ml di antibiotici e antimicotici (Euroclone S.p.a, Milano, Italia),
- 12.5 ml di tampone Hapes (Sigma Aldrich),
- 5 ml di amminoacidi non essenziali (Gibco, Fisher Scientific, Italia).

Per favorire la proliferazione cellulare devono essere mantenute le condizioni di crescita ottimali, quali una temperatura di 37°C e il 5% di anidride carbonica all'interno di termostati.

Periodicamente (circa due volte a settimana), quando sono a confluenza, le cellule vengono staccate dal substrato solido affinché, mediante un fattore di diluizione, possano riacquisire spazio per potersi dividere.

Questo processo consiste nell'aspirazione del terreno consumato, a cui segue un trattamento con 1,5 ml di tampone salino (*Phosphate buffered saline* o PBS, Euroclone S.p.a, Italia) come risciacquo per eliminare i residui dell'antitripsina sierica. Infine, sono introdotti 0.5 o 2 ml (a seconda della fiasca) di tripsina (Gibco, Fisher Scientific, Italia), un enzima che permette il distacco delle cellule dal substrato. Dopo l'incubazione in termostato per qualche minuto, le cellule si risospendono nella tripsina.

A questo punto si aggiungono 3 ml di terreno completo e si effettua una diluizione con un fattore di 1:5 o 1:10, prelevando con delle pipette sterili il

volume necessario. Infine, si completa il procedimento aggiungendo un quantitativo di terreno in modo da poter avere un volume totale all'interno della fiasca di 10-12 ml.

10.3 Conta cellulare

Le cellule che hanno subito un'espansione possono essere raccolte in una provetta a fondo conico con tappo a vite da 15 ml (falcon15) ed essere contate con l'ausilio di una camera di conta o di Burker (Securlab, Roma, Italia) (figura 29-30).

Essa è composta da un grande quadrato suddiviso a sua volta in 9 quadrati di medie dimensioni, ognuno contenente 9 quadrati più piccoli (**Errore.**

L'origine riferimento non è stata trovata., Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.).

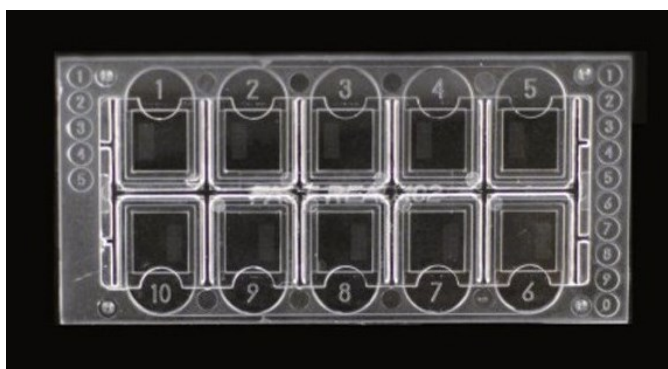


Figura 33. Vetrino in plastica a 10 celle. VETRIPLAST - VETRINI PER SEDIMENTI URINARI A 10 POSTI

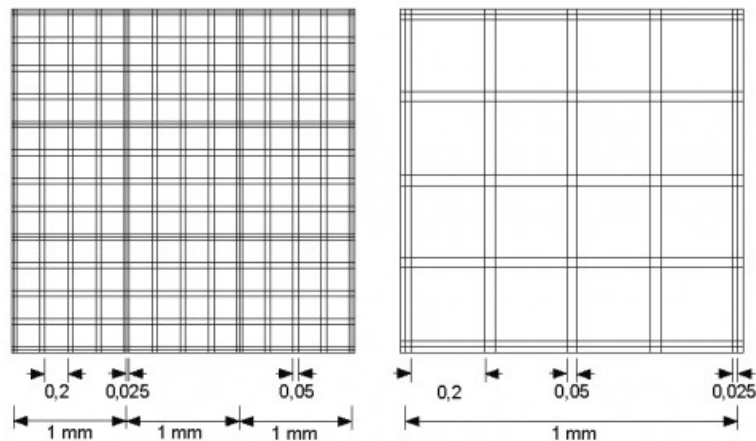


Figura 34. Camera di conta o di Bürker.

All'interno di una eppendorf⁴ da 1,5 ml, si effettua una diluizione intermedia (con un fattore 1:5) delle cellule raccolte nella falcon, in modo che esse non siano in quantità tale da rendere difficoltoso il conteggio.

Da questa diluizione sono stati prelevati 10 µl e inseriti nella camera di conta poi osservata al microscopio invertito Nikon Eclipse TE300.

Per il conteggio vengono considerati i quadrati scelti in maniera casuale e con una distribuzione omogenea delle cellule.

Per calcolare il quantitativo di cellule presenti nella falcon¹⁵ in cui sono state raccolte, si effettuano i seguenti calcoli:

$$\frac{n^{\circ} \text{ medio di cellule} * 90}{10} * 5 = n^{\circ} \text{ di cellule}/\mu\text{l contenute nella falcon}$$

dove:

- n° di cellule: media dei valori derivanti dal conteggio,

⁴ Eppendorf: provetta con fondo a V da 1,5 ml.

- 90: fattore di conversione della camera di conta,
- 10: microlitri (μl) inseriti nella camera di conta,
- 5: fattore di diluizione iniziale.

Il valore ottenuto verrà moltiplicato per 10^3 affinché si possa avere il quantitativo di cellule contenuto in un millilitro (ml) della falcon15.

10.4 Isolamento virale

L'isolamento virale viene eseguito per ogni ceppo di SARS-CoV-2 identificato. Esso avviene in più fasi:

- primo isolamento o isolamento in fiasca piccola,
- passaggio 1 dell'isolamento o isolamento in fiasca grande, dove si possono seguire due strategie, o in sospensione o in adesione.

La prima fase dell'isolamento prevede la raccolta delle cellule Vero E6 in una falcon15 a seguito della diluizione effettuata seguendo il protocollo precedentemente illustrato nei punti 10.2 e 10.3.

Primo isolamento

Ottenuta la quantità di cellule presenti nella falcon15, si effettua una proporzione per calcolare quanto volume si deve prelevare e trasferire in una

nuova falcon15 affinché il numero totale di cellule sia 2×10^6 , equivalente al 70% di confluenza.

Ad esse verranno aggiunti 500 μ l di tampone nasofaringeo filtrato (utilizzando una siringa e un filtro da 0.2 μ m sterili) e del terreno completo fino ad arrivare ad un volume di 2 ml totali. Segue un'incubazione a 37°C, 5% di CO₂ per 1 ora, per permettere l'adsorbimento delle particelle virali sulla superficie delle cellule.

Successivamente il tutto viene trasferito in una fiasca da 25cm² all'interno del quale vengono aggiunti 3 ml di terreno completo. La fiasca viene, infine, incubata in termostato a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità fino all'osservazione dell'effetto citopatico.

Passaggio 1 dell'isolamento

Quando l'80% della fiasca di primo isolamento mostra effetto citopatico, si effettua il passaggio 1 dell'isolamento. Questo viene svolto in due modi: o in sospensione o in adesione.

La strategia in sospensione prevede il calcolo di un volume corrispondente a 8×10^6 cellule che vengono poi inserite in una fiasca da 75 cm². A queste vengono aggiunti 2 ml derivanti dal primo isolamento in fiasca piccola e del terreno completo fino al raggiungimento di un volume totale di 12 ml.

La fiasca viene poi incubata a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità fino all'osservazione dell'effetto citopatico.

La strategia in adesione si svolge in due giorni consecutivi: il primo giorno si calcola un volume di cellule pari a 4×10^6 , le quali vengono fatte crescere all'interno di una fiasca da 75 cm².

Il giorno successivo, le cellule si saranno duplicate, raggiungendo un quantitativo di 8×10^6 equivalente al 70% di confluenza. A queste verranno aggiunti 2 ml del primo isolamento e verranno incubati per 1 ora a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità. Successivamente si aggiunge del terreno completo per arrivare ad un volume totale di 12 ml. La fiasca viene poi incubata a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità fino all'osservazione dell'effetto citopatico.

10.5 Preparazione dello stock virale

Dopo alcuni giorni di incubazione, si potrà osservare l'effetto citopatico nella maggior parte della fiasca. In questa fase si raccoglie, in una falcon 15, l'intero contenuto della fiasca e si esegue una centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti per far sedimentare le cellule e i detriti che formeranno un pellet.

Il sovrantante, contenente il virus, viene filtrato con siringa e filtro da 0.2 µm sterili, aliquotato in provette criogeniche (Clearline microtube) e infine conservato in congelatori a -80°C.

10.6 Titolazione dello stock virale

La titolazione dello stock virale per ogni *lineage* viene ottenuta mediante delle diluizioni seriali dello stock al fine di ottenere il valore della TCID₅₀/ml. La TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*) indica la dose infettante di virus in grado di infettare il 50% di una serie di microcolture cellulari in piastra da 96 pozzetti e mostrare effetto citopatico.

La titolazione si esegue preparando, 24 ore prima dell'infezione, una piastra da 96 pozzetti contenente $2,6 \times 10^4$ cellule Vero E6 in ogni pozzetto in un volume di 100 μ l.

Il giorno dell'infezione viene scongelata un'aliquota per ogni stock virale: uno sar  quello a concentrazione nota utilizzato come controllo e l'altro sar  quello del ceppo da saggiare.

Vengono preparate delle eppendorf per effettuare delle diluizioni seriali, da 10^{-1} a 10^{-7} , per i due ceppi. In ognuna vengono inseriti 450 μ l di terreno completo e, solo nella prima, 50 μ l di stock virale. Successivamente si effettuano delle diluizioni seriali trasferendo 50 μ l dalla diluizione precedente alla successiva.

Vengono inoculati 50 μ l delle diluizioni degli stock in base alla suddivisione illustrata nell'immagine 31. Segue un'incubazione di 2 ore a 37°C e 5% di CO₂ in termostato.

Al termine dell'incubazione, ogni pozzetto viene aspirato e riempito con 150 μ l di terreno completo. Segue un'ulteriore incubazione per 72 ore a 37°C e 5% di CO₂ in termostato (Figura 35).

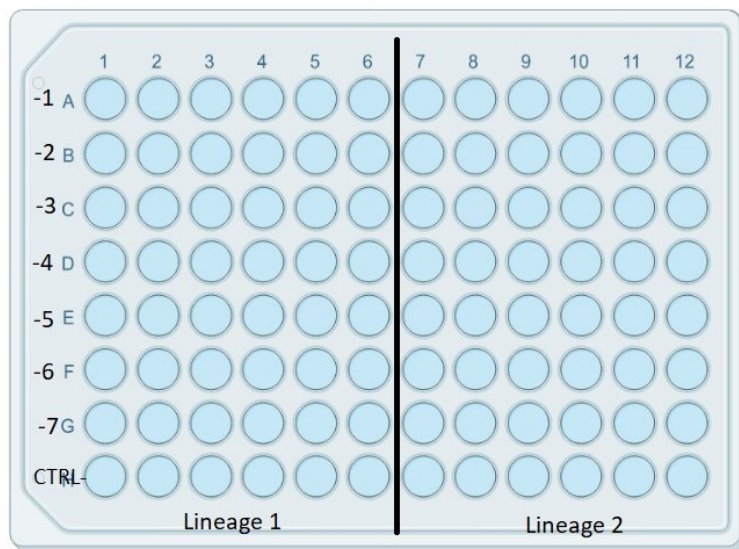


Figura 35. Illustrazione della piastra da 96 pozzetti utilizzata per la titolazione degli stock virali.

Dopo l'incubazione si osserva al microscopio invertito la presenza (+) o l'assenza (-) di effetto citopatico in ogni pozzetto e viene compilata la seguente tabella (Tabella 3):

Diluizione dello stock		1	2	3	4	5	6	N° pozzetti infettati/n° pozzetti inoculati	N° pozzetti infettati	N° pozzetti non infettati	Totale infettati	Totali non infettati	% pozzetti infettati
10 ⁻¹	A	+	+	+	+	+	+	6/6	6	0	13	0	100
10 ⁻²	B	+	+	+	+	+	-	5/6	5	1	7	1	87,5
10 ⁻³	C	-	+	+	-	-	-	2/6	2	4	2	5	28,5714
10 ⁻⁴	D	-	-	-	-	-	-	0/6	0	6	0	11	0
10 ⁻⁵	E	-	-	-	-	-	-	0/6	0	6	0	17	0
10 ⁻⁶	F	-	-	-	-	-	-	0/6	0	6	0	23	0
10 ⁻⁷	G	-	-	-	-	-	-	0/6	0	6	0	29	0
10 ⁻⁸ o CTRL-	H	-	-	-	-	-	-	0/6	0	6	0	35	0

Tabella 3. Esempio di una piastra per il calcolo della TCID₅₀.

dove:

- totale infettati: somma dei pozzetti positivi partendo dalla diluizione di stock più bassa,
- totale non infettati: somma dei pozzetti negativi partendo dalla diluizione di stock più alta,
- % pozzetti infettati: viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\frac{\text{totale pozzetti infettati}}{(\text{totale pozzetti infettati} + \text{totale pozzetti non infettati})} * 100$$

Successivamente è stato individuato il punto finale di infettività 50 per cento, ovvero il range di diluizione dello stock virale all'interno del quale si trova il 50% di pozzetti positivi (“distanza percentuale”).

Nella Tabella 3, il suddetto range è compreso tra le diluizioni 10^{-2} (con una percentuale di pozzetti infettati di 87.5) e 10^{-3} (con una percentuale di pozzetti infettati di 28.5714).

Per i calcoli utilizzati nei nostri esperimenti è stato seguito il libro “Diagnosi virologica – principi e metodi” di J.M. Hoskins (Casa Editrice Ambrosiana, edizione 1975) ed è stata usata la seguente formula:

$$\text{distanza percentuale} = \frac{(\% \text{ valore positivo} > 50\%) - 50\%}{(\% \text{ valore} > 50\%) - (\% \text{ valore positivo} < 50\%)}$$

Con i valori riportati nella tabella 3, la formula diventa la seguente:

$$\frac{(87.5\% - 50\%)}{(87.5\% - 28.5714\%)} = 0.63$$

Segue il calcolo della TCID₅₀ in 50 µl, corrispondente a

$$10 \text{ diluizione } >50\% * 10 \text{ distanza percentuale} = 10^2 * 10^{0.63} = 10^{2.63}$$

Da questa formula si può calcolare la TCID₅₀ in 1 ml:

0.05 ml di virus non diluito contiene $10^{2.63}$ ID₅₀.

1 ml di virus non diluito contiene $(1/0.05 \times 10^{2.63}) \text{ ID}_{50}^5 = (20 \times 10^{2.63}) \text{ ID}_{50}$

$= (20 \times 10^2 \times \text{antilog di } 0,63) \text{ ID}_{50} = (20 \times 10^2 \times 4,33) \text{ ID}_{50} = (86,6 \times 10^2)$

$\text{ID}_{50} = 8,66 * 10^3 \text{ ID}_{50}$.

10.7 Saggio di microneutralizzazione

Lo scopo di questo saggio è determinare il titolo neutralizzante di campioni di siero di soggetti vaccinati o che hanno avuto l'infezione.

Il titolo neutralizzante viene valutato come la più alta diluizione sierica

capace di inibire l'infezione nel 50% di una serie di colture cellulari infettate

con il virus *in vitro*.

⁵ ID₅₀ = dose infettante 50 per cento applicabile a tutti i sistemi.

Il saggio viene svolto in più giorni: nel primo, si prepara un numero di piastre da 96 pozzetti, contenenti cellule Vero E6, in funzione del numero di sieri e di ceppi virali da testare; nel secondo, si effettua la diluizione sierica e l'infezione delle cellule; infine, dopo quattro giorni si effettua il fissaggio e la colorazione delle cellule all'interno delle piastre e la relativa lettura.

La preparazione delle piastre contenenti cellule Vero E6 prevede: l'espansione delle cellule, la loro raccolta e conta, la dispensazione di $2,6 \times 10^4$ cellule Vero E6 in ogni pozzetto della piastra contenute in un volume di 100 μ l. Segue un'incubazione in termostato a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità per 24 ore.

Il giorno successivo vengono preparati:

- 1) i sieri: dopo il prelievo di sangue, ciascun siero viene sottoposto, mediante reazione in chemiluminescenza, alla quantificazione degli anticorpi anti-Spike (IgGII, espressi in BAU/ml⁶) e antinucleocapside (IgM+IgG). Quelli che possiedono un valore anti-Spike maggiore di 1000 BAU/ml subiscono, prima del test di microneutralizzazione, una diluizione con fattore 1:8. Al contrario, quelli che possiedono un valore anti-Spike minore di 1000 BAU/ml non vengono diluiti.

⁶BAU/ml: binding antibody units.

Successivamente, dalla provetta madre contenente il siero, ne viene aliquotato 1 ml in una eppendorf e sottoposto a scomplementazione mediante trattamento termico a 56°C per 30 minuti su una piastra riscaldata.

- 2) gli stock virali: ogni ceppo, in base ai risultati ottenuti dalla titolazione, viene diluito per ottenere una TCID₅₀/ml finale pari a 2×10^3 .
- 3) un numero di piastre con fondo a U pari a quello delle piastre incubate overnight.

In queste ultime viene aliquotato terreno DMEM completo in modo da avere 90 µl di terreno nella prima riga della piastra e 50 µl nelle restanti righe.

A questo punto si marca ogni piastra con i nomi dei ceppi da testare (e.g. varianti B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron (BA.1, BA.2, BA.4, BA.5) in modo da avere un triplicato dello stesso ceppo per ogni siero e si aggiungono 10 µl di siero diluito o indiluito in ogni pozzetto della prima riga, determinando una diluizione 1:10.

Con una pipetta multicanale da 12 puntali si effettuano delle ulteriori diluizioni seriali 1:2, prelevando 50 µl dalla prima riga e trasferendoli nella seconda, mescolando il volume ad ogni passaggio. Ciò viene ripetuto fino ad arrivare alla riga G, dove 50 µl prelevati da questa vengono scartati, al fine di

utilizzare la riga H come controllo positivo e negativo (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

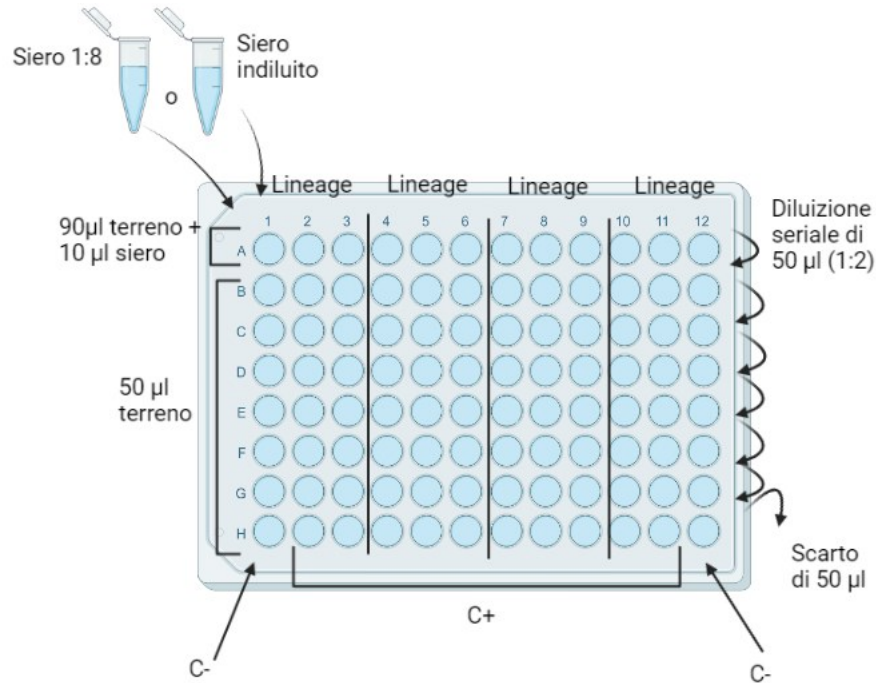


Figura 36. Rappresentazione della piastra utilizzata per il saggio di microneutralizzazione.

Successivamente vengono dispensati 50 µl di ogni stock virale andando da sinistra a destra in modo da avere un triplicato (3 colonne) per ogni ceppo virale (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

Le piastre contenenti il siero e lo stock virale vengono incubate per 1 ora a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità. Questo tempo permetterà agli anticorpi, eventualmente presenti nel siero, di potersi legare al virus dei diversi stock virali.

Al termine dell'incubazione, e dopo l'aspirazione del terreno, viene trasferita la sospensione con il siero e lo stock virale nella piastra contenente le cellule Vero E6. Segue un'incubazione di 72 ore in termostato con le condizioni precedenti.

Come detto in precedenza, i sieri vengono testati dopo una diluizione 1:8 o tal quali in base alla quantità di anticorpi anti-Spike presenti in essi. In questo modo, per quanto riguarda i primi, le diluizioni testate si aggirano in un range da 1:160 a 1:10240; mentre per i secondi, il range va da 1:20 a 1:1280.

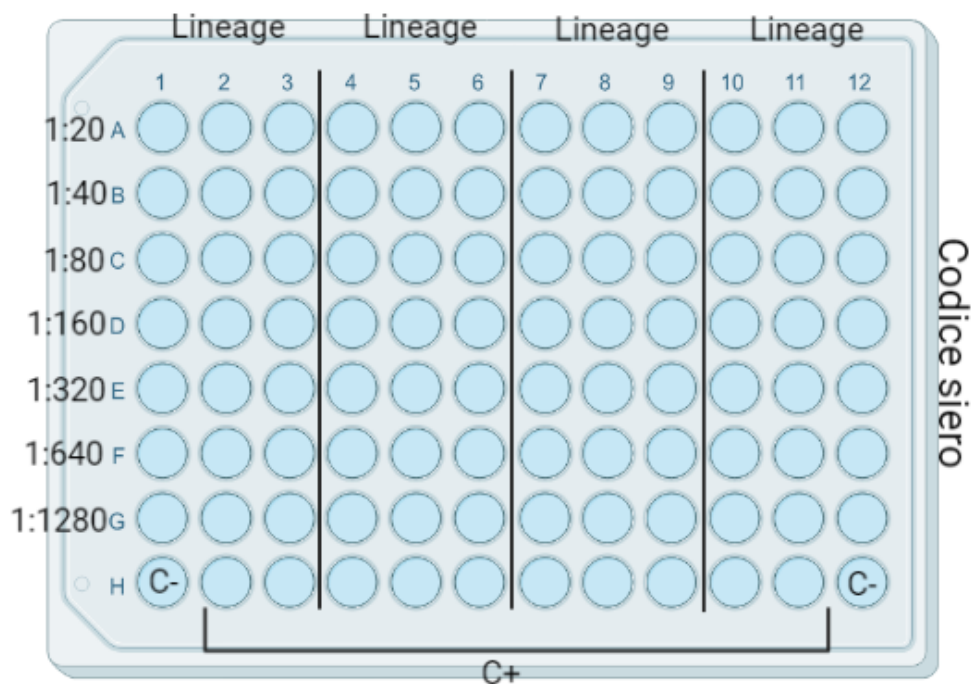


Figura 37. Rappresentazione della piastra contenente cellule Vero E6, diluizioni seriali del siero (da 1:20 a 1:1280) e stock virale dei ceppi di SARS-CoV-2.

10.8 Fissaggio e colorazione delle cellule e lettura delle piastre

Al termine dell'incubazione di 72 ore, il terreno presente in ogni piastra viene aspirato. Le cellule Vero E6 vengono fissate sul fondo del pozzetto tramite l'aggiunta di 50 μ l di una soluzione contenente 20% di acido acetico e 80% di metanolo, a cui segue un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'aspirazione della soluzione, le cellule subiscono una colorazione con 50 μ l di una soluzione di blu di metilene costituita dal 70% di acqua deionizzata, 20% di metanolo e 10% di blu di metilene 0.1M. Questo passaggio conferisce una colorazione blu della parete cellulare.

Segue un'incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente, l'aspirazione del contenuto, un lavaggio con 100 μ l di acqua deionizzata e una ulteriore aspirazione di quest'ultima. Infine, le piastre vengono fatte asciugare a temperatura ambiente.

La lettura dei risultati si basa sulla presenza o meno dell'effetto citopatico (CPE) in ogni pozzetto mediante l'utilizzo di un microscopio a inversione: vengono considerati positivi i pozzetti che mostrano CPE mentre negativi quelli che non lo possiedono (**Errore. L'origine riferimento non è stata**

trovata., Errore. L'origine riferimento non è stata trovata., Errore.

L'origine riferimento non è stata trovata.).

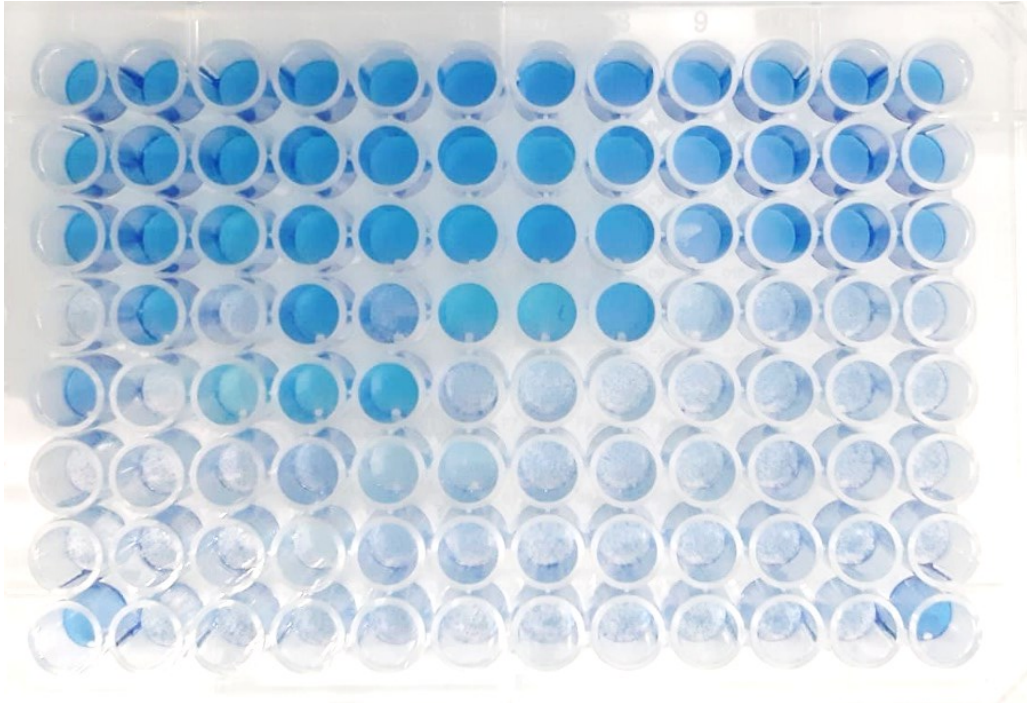


Figura 38. Rappresentazione di una piastra da 96 pozzetti a seguito di fissaggio e colorazione delle cellule Vero E6.

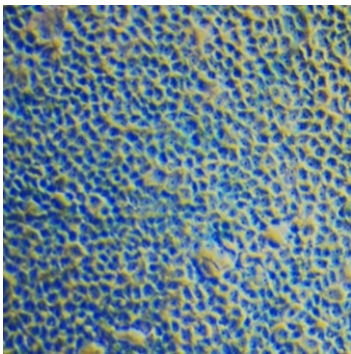


Figura 40. Cellule Vero E6 non infettate.

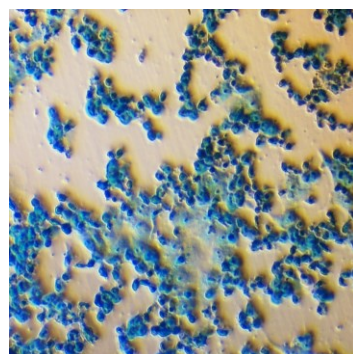


Figura 39. Cellule Vero E6 infettate dal virus SARS-CoV-2.

Per ogni ceppo e ogni diluizione di siero vengono calcolati i pozzetti positivi su un totale di 3. Successivamente, viene calcolato il titolo anticorpale

neutralizzante mediante la seguente curva, che viene estrapolata dai dati sperimentali (Figura 41):

$$y = k * e^{exp*x}$$

dove:

- y indica la diluizione virtuale più alta che può essere eseguita per raggiungere il 50% di neutralizzazione virale, cioè il titolo anticorpale;
- k è un fattore moltiplicativo;
- x è fissato a 0.5 (cioè 50%).

Diluizione 1:	Pozzetti °CPE	Frequenza (=pozzetti con CPE/3)	Coordinata x (frequenza)	Coordinata y (diluizione 1:)
160	0	0	0	160
320	0	0	0	320
640	0	0	0	640
1280	0	0	0	1280
2560	1	0,333333333	0,333333333	2560
5120	2	0,666666667	0,666666667	5120
10240	3	1	1	10240

Tabella 4. Calcolo del titolo anticorpale di un siero diluito 1:8.

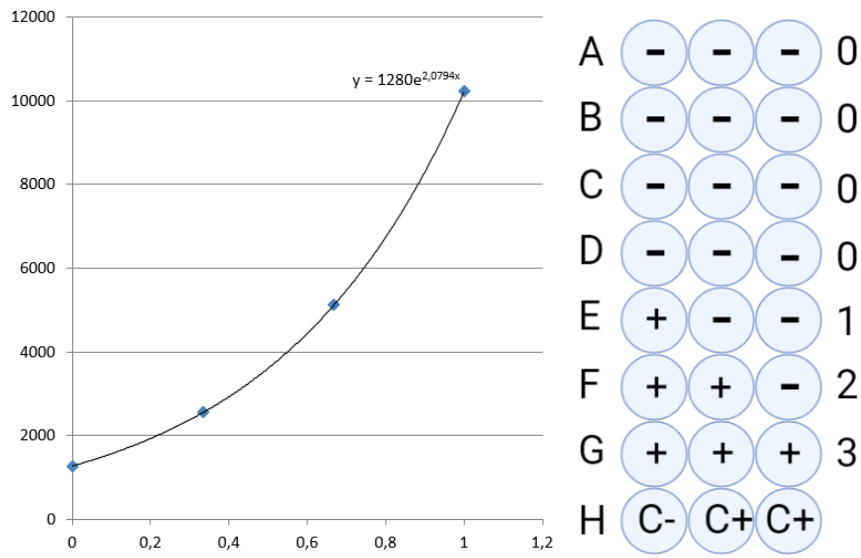


Figura 411-422. In riferimento alla tabella 4, esempio di calcolo del titolo neutralizzante. y = diluizione del siero; x = frequenza dell'effetto citopatico; k = fattore moltiplicativo = 1280; exp = esponente = 2.0794. $y = 1280 * e^{(2.0794)*x} = 3620$. Titolo anticorpale finale = 1: 3620.

10.9 Soggetti dello studio

I soggetti reclutati per questo studio sono individui del personale della Direzione Sanitaria Territoriale (DST) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona e sono stati suddivisi in base al tipo e al numero di stimolazioni immunologiche ricevute. In particolare, essi hanno ricevuto tre dosi di vaccino (di cui l'ultima con BioNTech Comirnaty BNT162b2) o in aggiunta hanno contratto l'infezione naturale con uno dei *sub-lineage* della variante *Omicron*, come BA.1, BA.2, BA.4 e BA.5.

Ciascun partecipante è stato sottoposto a più prelievi ematici in base al tempo trascorso dall'ultima stimolazione immunologica. Quest'ultimo è stato suddiviso in: 20 giorni, 4 mesi e 6 mesi.

Gli individui che hanno aderito allo studio sono suddivisi nel seguente modo

(Tabella 5):

		3° dose	Infettati Omicron BA.1	Infettati Omicron BA.2	Infettati Omicron BA.4/BA.5
20 giorni	N° soggetti	20	14	24	32
	% Maschi	25%	21.43%	37.5%	18.75%
	% Femmine	75%	78.57%	62.5%	81.25%
	Età	24-62	23-56	30-74	25-67
4 mesi	N° soggetti	20	13	22	24
	% Maschi	25%	23.07%	40.91%	16.67%
	% Femmine	75%	76.93%	59.09%	83.33%
	Età	24-62	23-56	30-74	25-67
6 mesi	N° soggetti	20	13	22	22
	% Maschi	25%	23.07%	40.91%	18.18%

	% Femmine	75%	76.93%	59.09%	81.82%
	Età	24-62	23-56	30-74	25-67

Tabella 5. Gruppi di individui considerati nello studio.

10.10 Analisi statistica

L'analisi statistica viene svolta usando GraphPad Prism 8.0.1. Il test non parametrico Wilcoxon matched pair signed rank test e il Mann-Whitney test sono stati applicati in modo appropriato. La significatività statistica viene posta a $p < 0.05$.

11. Scopo dello studio

Il SARS-CoV-2 si è diffuso nella popolazione mondiale a partire dalla fine del 2019, causando la pandemia da COVID-19, che ha provocato miliardi di infezioni nella popolazione umana e oltre 15 milioni di morti. Nel corso di questa pandemia si sono evidenziate alcune caratteristiche peculiari di questo virus che ne condizionano il rapporto con la risposta immunitaria dell'ospite. In particolare, è l'immunità umorale, che con gli anticorpi, in grado di legare antigeni virali, come la proteina Spike, e neutralizzare la loro azione, dovrebbe proteggerci da future infezioni. In realtà, il virus ha dimostrato una grande capacità diffusiva anche nella popolazione già immunizzata, che ha permesso diverse ondate epidemiche successive. Tale caratteristica è

supportata da meccanismi genetici che, introducendo mutazioni, hanno dato origine a nuovi *lineage* virali, in grado di eludere la risposta anticorpale dell'ospite, sia quella generata dalle vaccinazioni che quella generata da precedenti infezioni.

In questo studio è stato valutato il potere neutralizzante degli anticorpi prodotti da soggetti vaccinati contro SARS-CoV-2 e/o che hanno acquisito un'infezione naturale con *sub-lineage* di Omicron, quali Omicron BA.1, Omicron BA.2, Omicron BA.4 e Omicron BA.5, allo scopo di comprendere quali siano i fattori che sono alla base di una risposta più efficace contro varianti multiple e duratura nel tempo. La conoscenza di questi determinanti potrebbe essere utile nella progettazione di strategie vaccinali razionali, da applicare in futuro per limitare la circolazione di SARS-CoV-2, che ancora oggi continua a provocare infezioni, ad evolversi, ed è ancora associato ad una certa mortalità nelle popolazioni fragili, anche già immunizzate.

12. Risultati

Lo studio è stato effettuato su una coorte di persone dipendenti dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche che hanno aderito allo studio su base volontaria e sono stati sottoposti a prelievi ematici eseguiti dopo 20 giorni, 120 giorni e 180 giorni dall'ultima stimolazione immunitaria. Questa poteva essere la somministrazione di una terza dose di vaccino Pfizer BioNTech BTN162b2 contro SARS-CoV-2 oppure l'infezione naturale con i *sub-lineage* di Omicron (BA.1, BA.2, BA.4/5) successiva alla vaccinazione con la terza dose.

È stata quantificata la capacità legante degli anticorpi anti-Spike (espressa in BAU/ml). Inoltre, è stata misurata la capacità neutralizzante degli anticorpi

con saggi di microneutralizzazione su piastra. Per standardizzare gli esperimenti di neutralizzazione ciascun siero è stato saggiato nello stesso esperimento in parallelo contro le 10 differenti varianti virali di SARS-CoV-2 isolate in laboratorio: B.1 (ceppo che per primo ha circolato in Italia), Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Beta (B.1.351), Iota (B.1.526), Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529 BA1, BA.2, BA.4 e BA.5).

12.1 Anticorpi IgG anti-Spike leganti (espressi in BAU/ml) prodotti dopo la terza dose e l'infezione naturale

In questa analisi sono stati confrontati quattro gruppi di soggetti: 26 soggetti vaccinati con 3 dosi di Pfizer/BioNTech BNT162b2 (V3), 14 soggetti che hanno contratto un'infezione naturale con Omicron BA.1 post terza dose (V3IBA.1), 24 soggetti che si sono infettati con Omicron BA.2 post vaccinazione con 3 dosi (V3IBA.2) e 32 soggetti che hanno contratto un'infezione naturale con Omicron BA4/5 post vaccinazione (V3IBA.4/5). I sieri sono stati raccolti dopo 20, 120 e 180 giorni dall'ultima stimolazione immunitaria. Sono stati confrontati i risultati ottenuti dai 4 differenti gruppi per comprendere la variazione della capacità di legame degli anticorpi anti-Spike nel tempo.

I livelli di anticorpi leganti prodotti 20 giorni dopo l'ultima stimolazione non hanno mostrato variazioni significative tra coloro che sono stati infettati con le diverse varianti Omicron dopo la vaccinazione (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.A**). Inoltre, è interessante notare come dopo 20 giorni dall'ultima stimolazione, la mediana del gruppo V3 (3864 BAU/ml) non era statisticamente diversa da quella degli altri 3 gruppi V3IBA.1, V3IBA.2 e V3IBA.4/5 che hanno invece ricevuto un'ulteriore stimolazione del sistema immunitario dovuta all'infezione naturale (5407, 4464, 4405 BAU/ml rispettivamente).

Al contrario, valutando la quantità di anticorpi prodotti dopo 120 e 180 giorni dall'ultima stimolazione immunitaria, si sono osservate differenze statisticamente significative tra il gruppo V3 e i 3 differenti gruppi V3I (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. B-C**).

Complessivamente gli individui infettati post-vaccinazione possedevano livelli più elevati nel tempo rispetto agli individui solamente vaccinati.

Ciò supporta il fatto che un'infezione naturale conduce ad una produzione di anticorpi più stabile della sola vaccinazione, soprattutto se avvenuta a distanza di mesi dall'ultima stimolazione immunitaria.

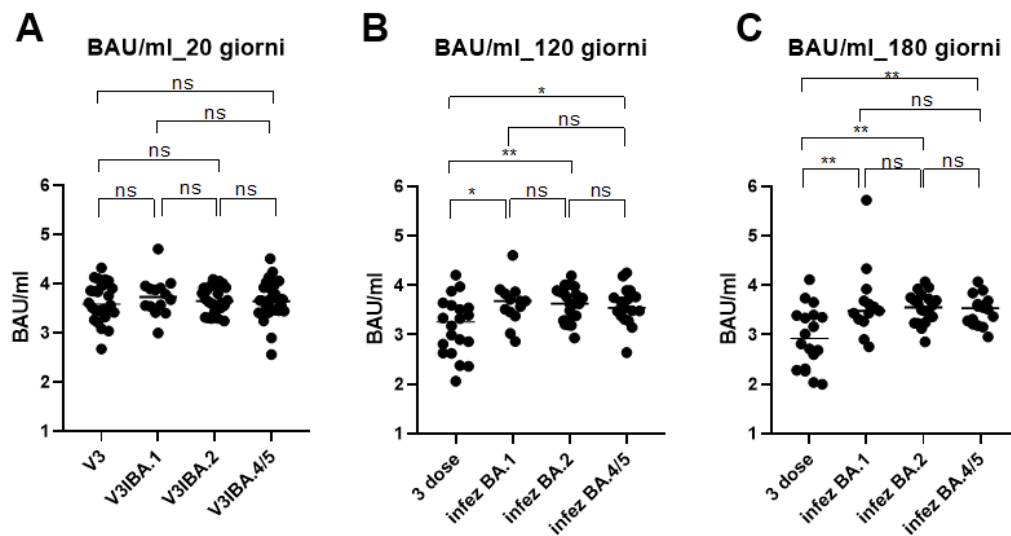


Figura 43. Anticorpi IgGII anti-Spike di SARS-CoV-2 dei 4 gruppi (V3, V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5) dopo 20 (A), 120 (B), 180 giorni (C) dopo l'ultima stimolazione immunitaria. I valori sono espressi in BAU/ml; le linee orizzontali rappresentano la mediana.

Valutando l'andamento della capacità legante degli anticorpi anti-Spike (calcolati con unità di misura in BAU/ml) nel tempo (20, 120 e 180 giorni) i soggetti che hanno ricevuto una tripla vaccinazione (V3) (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) possedevano in generale livelli paragonabili di anticorpi rispetto a quelli prodotti dai soggetti che hanno avuto un'infezione naturale oltre che la vaccinazione.

Tuttavia, in questi soggetti tali anticorpi venivano rapidamente persi (-68% a 120 giorni).

Al contrario, soggetti vaccinati e infettati da sub-lineage di Omicron, i livelli anticorpali si sono mantenuti pressoché costanti nel tempo, almeno fino a 120 giorni dopo l'ultima stimolazione, per calare lievemente in seguito, sottolineando l'importanza delle stimolazioni immunologiche ripetute per sostenere la produzione anticorpale.

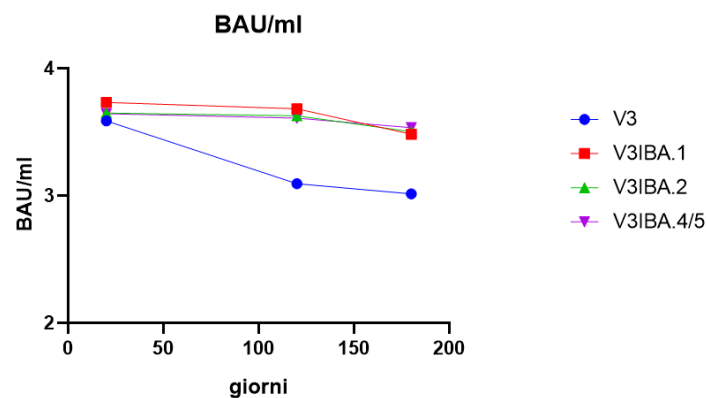


Figura 44. Anticorpi IgGII anti-Spike (misurati in BAU/ml) dei gruppi V3, V3IBA.1, V3IBA.2 e V3IBA.4/5 a distanza di 20, 120 e 180 giorni dalla stimolazione immunitaria.

12.2 Anticorpi neutralizzanti contro le diverse varianti virali dopo la terza dose e l'infezione naturale

Oltre a valutare la capacità di legame degli anticorpi anti-Spike, sono stati eseguiti dei saggi di microneutralizzazione contro le dieci varianti di SARS-CoV-2: B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1, Omicron BA.2, Omicron BA.4 e Omicron BA.5 dopo 20, 120 e 180 giorni dall'ultima stimolazione.

12.3 Capacità neutralizzante 20 giorni dall'ultima stimolazione (massiva produzione anticorpale) contro le diverse varianti

Il *lineage* B.1 veniva neutralizzato con titoli elevati da parte di tutti e 4 i gruppi, senza differenze significative (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. A); tale risultato è probabilmente dovuto alle tre dosi di vaccino Pfizer, basato sulla sequenza della Spike ancestrale (quasi identica a questo ceppo) e ormai obsoleta.

Varianti moderatamente divergenti come Alfa e Gamma (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** B-C) venivano invece neutralizzate con titoli più bassi. Nello specifico, per quanto riguarda la variante Alpha, si sono evidenziate importanti differenze tra il gruppo V3 e gli altri gruppi, infettati con *sub-lineage* di Omicron (V3IBA.1, V3IBA.2 e V3IBA.4/5) con valori di p pari a 0.0211, 0.0085 e 0.0137 rispettivamente.

Tali differenze sono risultate ancora più accentuate per i *lineage* Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1 e Omicron BA.2 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** D-E-F-G-H) che sono più refrattarie alla neutralizzazione e venivano neutralizzate con titoli minori rispetto alle varianti precedenti. Si osserva, inoltre, come sia aumentata la differenza di neutralizzazione tra il gruppo V3 e i gruppi V3I, dato da produrre un valore di $p < 0.0001$.

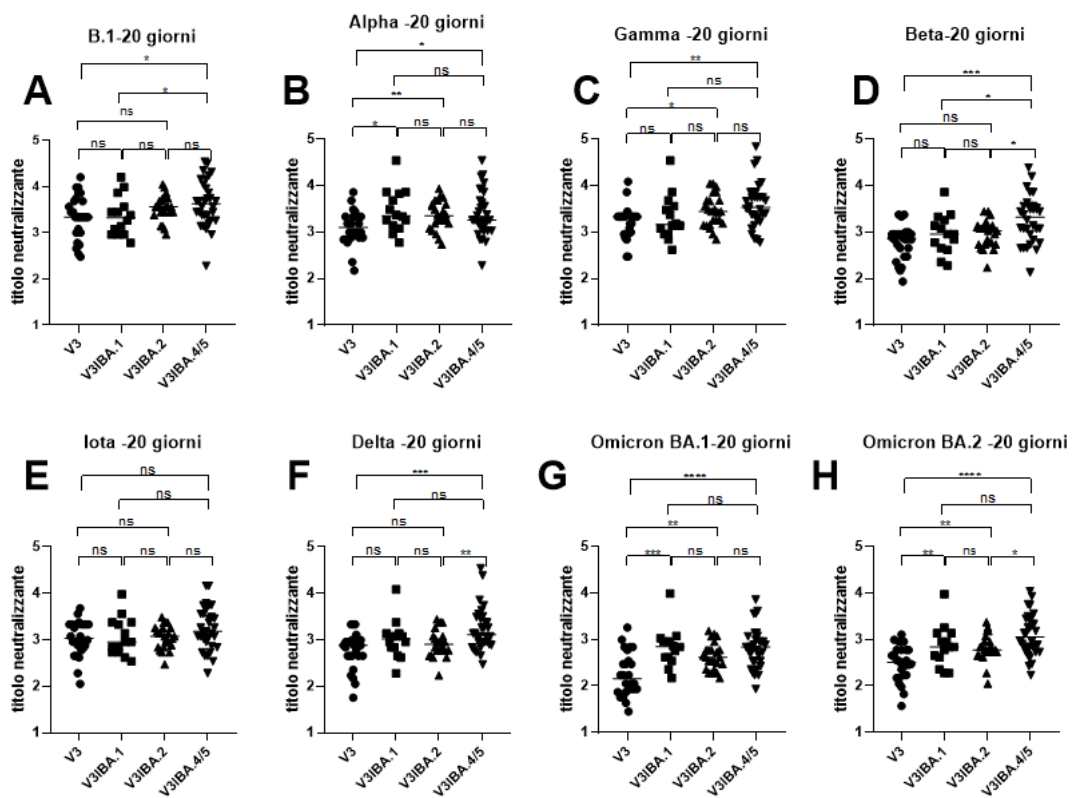


Figura 45. Confronto tra gruppi di individui vaccinati con 3 dosi (V3) e vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5), con prelievi eseguiti 20 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 8 varianti.

Inoltre, confrontando solo la risposta dei gruppi vaccinati e infettati (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**), si è notato come le varianti Omicron BA.4 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.****Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** A) e Omicron BA.5 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.****Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** B), venivano neutralizzate con valori molto più bassi rispetto a quelle del grafico precedente, senza differenze statisticamente significative tra i gruppi. Complessivamente dopo 20 giorni l'ultima stimolazione del sistema immunitario, tutti i gruppi mostravano un potere

cross-neutralizzante nei confronti di tutte le varianti analizzate, che è risultato significativamente maggiore nei gruppi che hanno ricevuto un'ulteriore stimolazione data proprio dall'infezione naturale. Tale stimolazione, inoltre, conferiva una capacità cross-neutralizzante anche contro varianti non correlate.

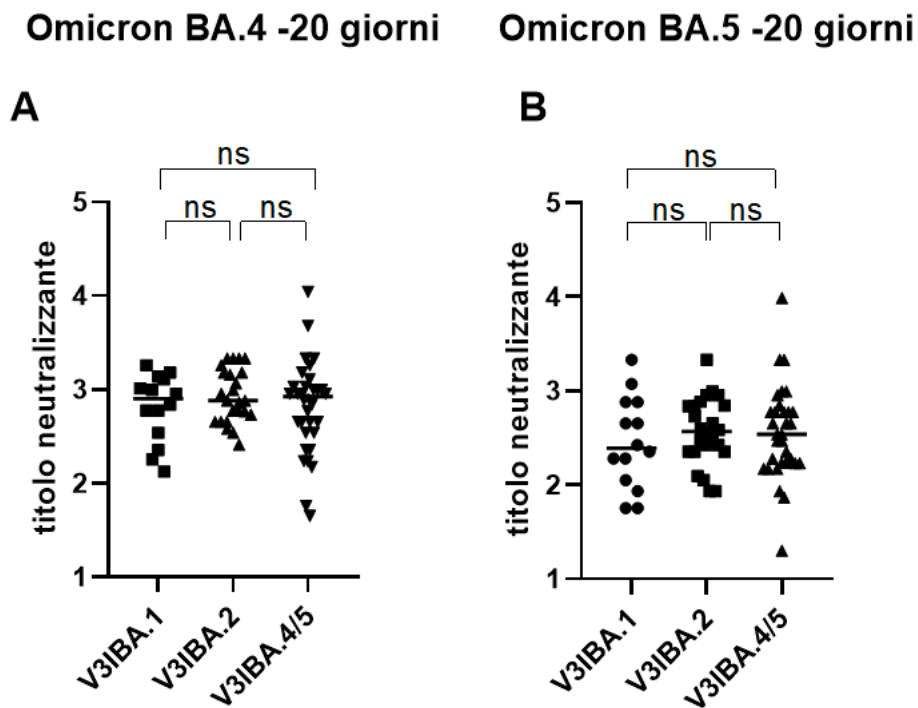


Figura 46. Confronto tra gruppi di individui vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V31BA.1, V31BA.2, V31BA.4/5), con prelievi eseguiti 20 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 2 varianti.

Tali considerazioni sono state ulteriormente rafforzate con il dato dell'attività neutralizzante dopo 120 giorni (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.****Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). Si può osservare come i livelli di neutralizzazione dei gruppi di individui vaccinati e

che hanno avuto un'infezione naturale fossero molto più elevati (circa 10 volte) di quelli degli individui esclusivamente vaccinati con 3 dosi. Ciò era dimostrato dai valori di p inferiori a 0.0001, con l'eccezione dei gruppi V3 e V3IBA.4/5 contro la variante P.1 (Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. C).

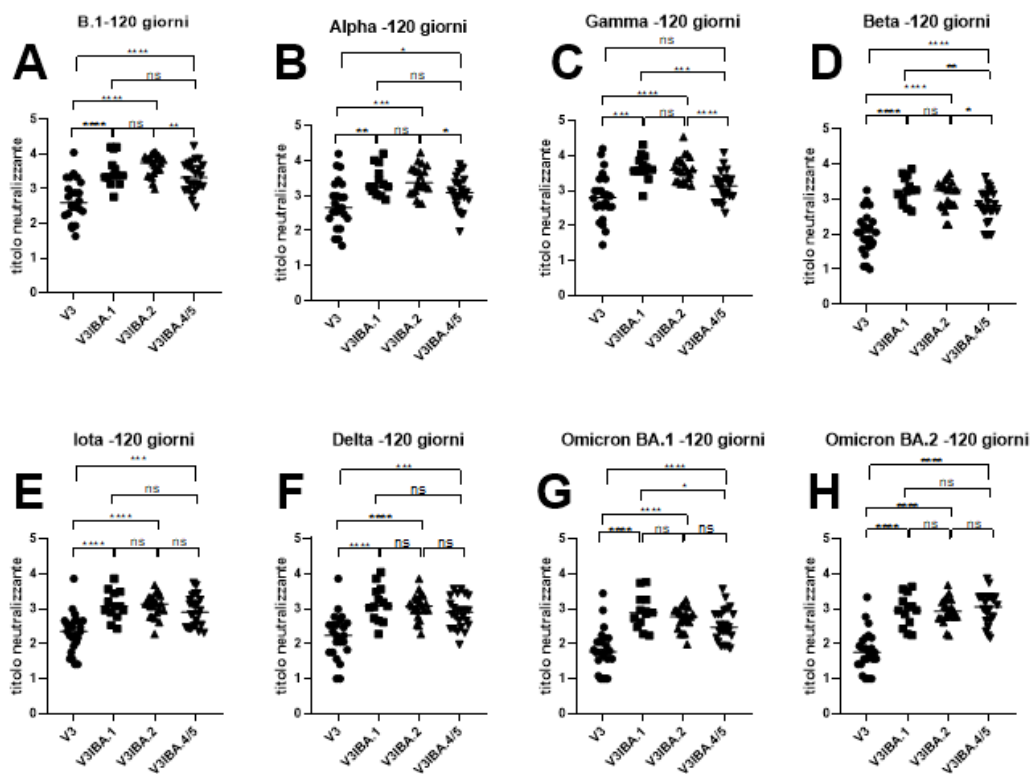


Figura 47. Confronto tra gruppi di individui vaccinati con 3 dosi (V3) e vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5), con prelievi eseguiti 120 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 8 varianti.

Per analizzare la risposta contro le varianti più recenti e che più si sono evolute per contrastare la neutralizzazione da parte dell'immunità contro le varianti omicron precedenti nella popolazione umana, sono stati confrontati i

gruppi (V3IBA.1, V3IBA.2 e V3IBA.4/5) contro le varianti Omicron BA.4 e Omicron BA.5 sui campioni prelevati 120 giorni dall'infezione (Figura 48 **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

In generale, queste due varianti si sono dimostrate più refrattarie alla neutralizzazione. Si può notare come la neutralizzazione della variante BA.4 sia risultata leggermente migliore per il primo e il secondo gruppo: la differenza della mediana tra V3IBA.1 e V3IBA.2 è di 1,3 volte, mentre tra V3IBA.1 e V3IBA.4/5 di 2,4 volte, sebbene la differenza non sia statisticamente significativa. Tali differenze non sono presenti contro la variante Omicron BA.5, contro la quali tutti i gruppi mostrano risultati

paragonabili (Figura 48 **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** B).

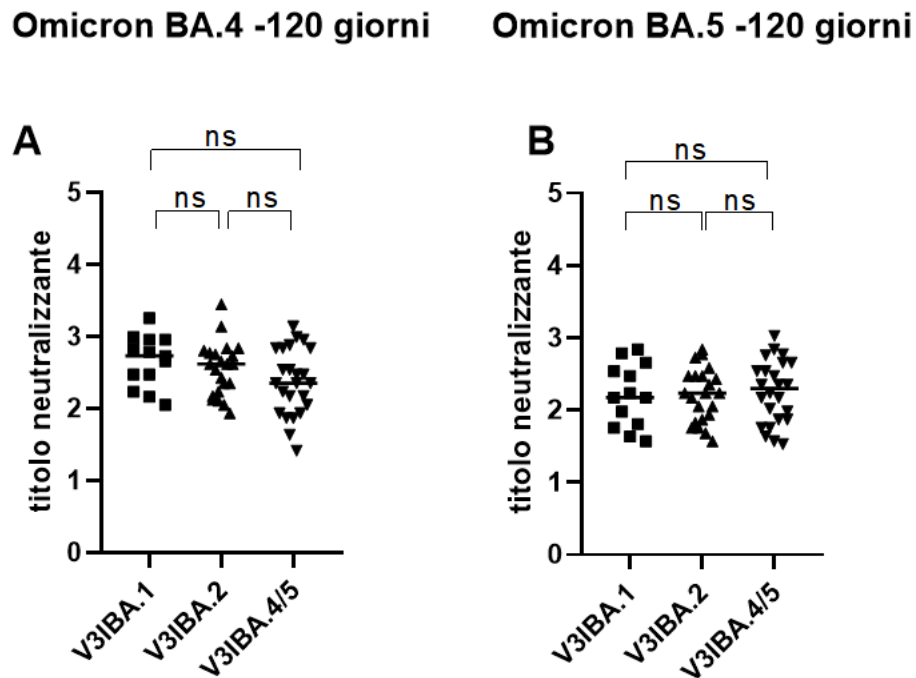


Figura 48. Confronto tra gruppi di individui vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5), con prelievi eseguiti 120 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 2 varianti.

Anche dopo 180 giorni dall'ultima stimolazione (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) si può osservare come nel gruppo V3, i titoli neutralizzanti siano risultati inferiori, a volte con significatività statistica, fino a 50 volte inferiori rispetto ai livelli di neutralizzazione dei gruppi di individui vaccinati e che hanno contratto l'infezione naturale.

Interessante notare come la massima potenza cross-neutralizzante sia stata ottenuta dopo infezione con Omicron BA.1 (**Errore. L'origine riferimento**

non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. G), in grado di ottenere risultati di neutralizzazione buoni anche contro le varianti comparse successivamente.

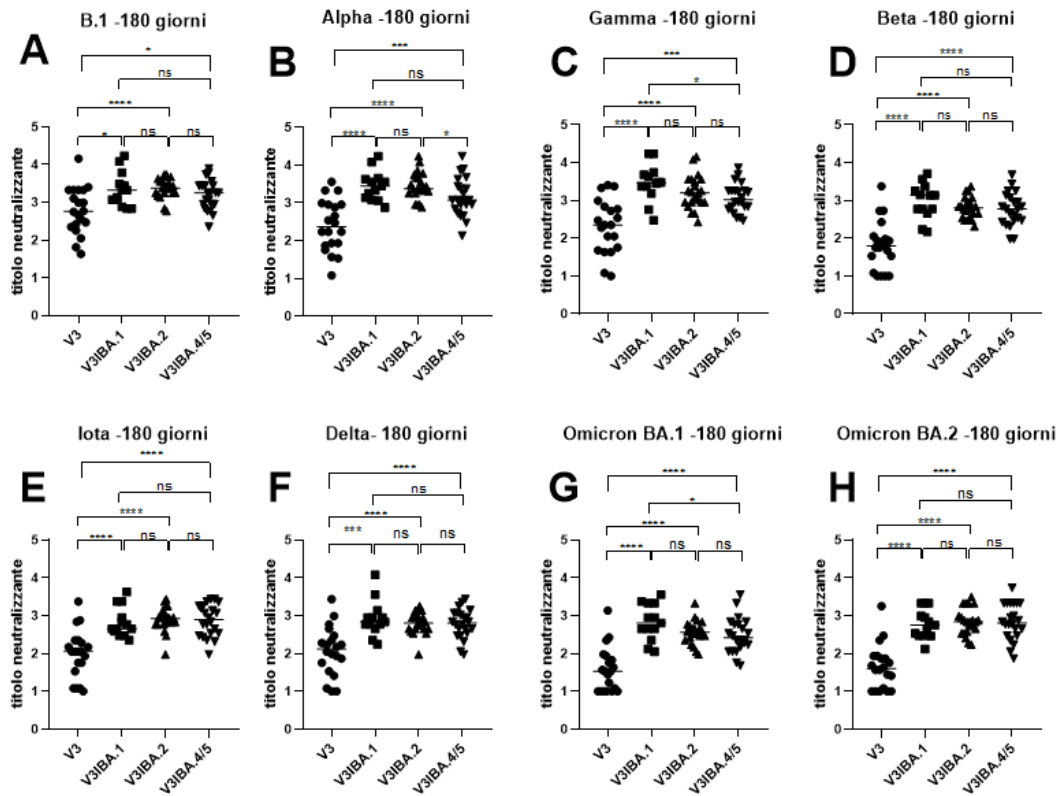


Figura 49. Confronto tra gruppi di individui vaccinati con 3 dosi (V3) e vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5), con prelievi eseguiti 180 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 8 varianti.

Altro fatto da sottolineare è la migliore neutralizzazione da parte dei V3IBA.4/5 nei confronti della stessa variante (Omicron BA.5), che evidenzia una neutralizzazione variante-specifica (Errore. L'origine riferimento non è

stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. B), che si è evidenziata solo dopo 180 giorni.

Complessivamente, però, i titoli contro queste due varianti sono risultati inferiori a quelli per le 8 varianti precedenti, come de dopo 120 giorni, suggerendo che il virus si sia continuato ad evolvere spinto da una pressione selettiva verso l'evasione della risposta umorale.

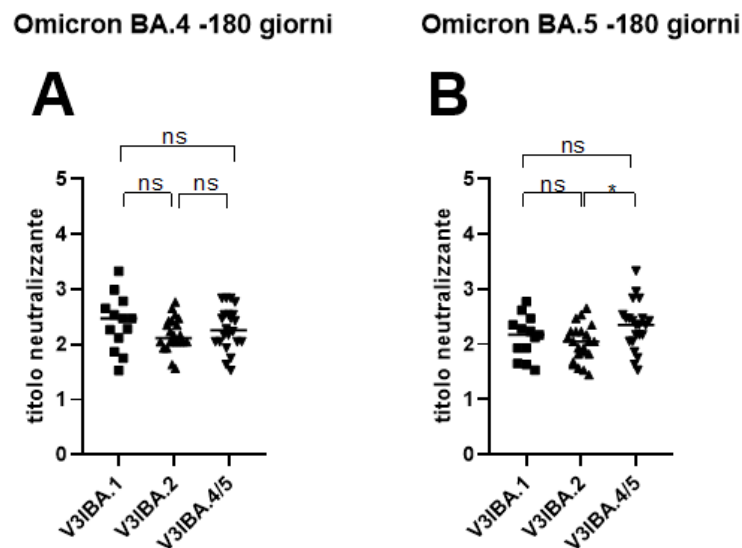


Figura 50. Confronto tra gruppi di individui vaccinati e infettati con sub-lineage di Omicron (V31BA.1, V31BA.2, V31BA.4/5), con prelievi eseguiti 180 giorni dopo la stimolazione immunitaria e testati verso 2 varianti.

12.4 Relazione tra gli intervalli di tempo trascorsi tra le successive immunizzazioni e il potere neutralizzante

Per comprendere meglio quale sia il ruolo dell'intervallo temporale tra le diverse stimolazioni immunologiche e ottenere ulteriori informazioni sulla risposta anamnesticca abbiamo confrontato la capacità di legame e i titoli

neutralizzanti ottenuti da questi soggetti vaccinati con tre dosi e poi infettati raggruppati in base alla distanza temporale tra infezione naturale rispetto alla vaccinazione con la terza dose. Sono stati distinti tre gruppi: 1-4 mesi, 5-7 mesi e 8-11 mesi. Ogni gruppo contiene rispettivamente 23, 18 e 28 soggetti.

Dopo 20 giorni, analizzando i valori degli anticorpi IgG leganti anti-Spike, questi 3 differenti gruppi non hanno prodotto risultati statisticamente diversi e le mediane sono state rispettivamente 4604 BAU/ml per il gruppo 1-4 mesi, 4652 BAU/ml per il gruppo 5-7 mesi e 3990 BAU/ml per il gruppo 8-11 mesi **(Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.)**.

Sono stati paragonati i titoli neutralizzanti dei tre gruppi contro le varianti virali isolate: B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1, Omicron BA.2, Omicron BA.4, Omicron BA.5.

Analizzando i risultati si è osservato un trend in aumento per le varianti obsolete nei soggetti che si sono infettati da 8 a 11 mesi dopo la terza dose rispetto a quelli che si sono infettati da 1 a 4 mesi dopo la terza dose suggerendo che il fattore temporale è importante per la memoria immunologica e la maturazione dell'affinità e per consolidare l'efficacia della risposta. Da sottolineare alcune eccezioni:

- la variante Gamma (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** D) è stata neutralizzata in modo migliore dal gruppo di soggetti che hanno avuto un'infezione naturale dopo 5-7 mesi dalla vaccinazione;
- le varianti Omicron BA.4 e BA.5 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** J e K) sono state neutralizzate meglio dagli anticorpi di coloro che hanno contratto l'infezione a ridosso dell'ultima vaccinazione.

Poiché queste varianti sono proprio quelle responsabili di dette infezioni, si può ipotizzare che lo stimolo ravvicinato sia stato favorevole a potenziare specificamente questa risposta. Nonostante questa specificità, si conferma che le ultime varianti sono in assoluto più refrattarie alla neutralizzazione, dimostrando lo straordinario percorso evolutivo del virus verso una più efficace evasione dell'immunità umorale.

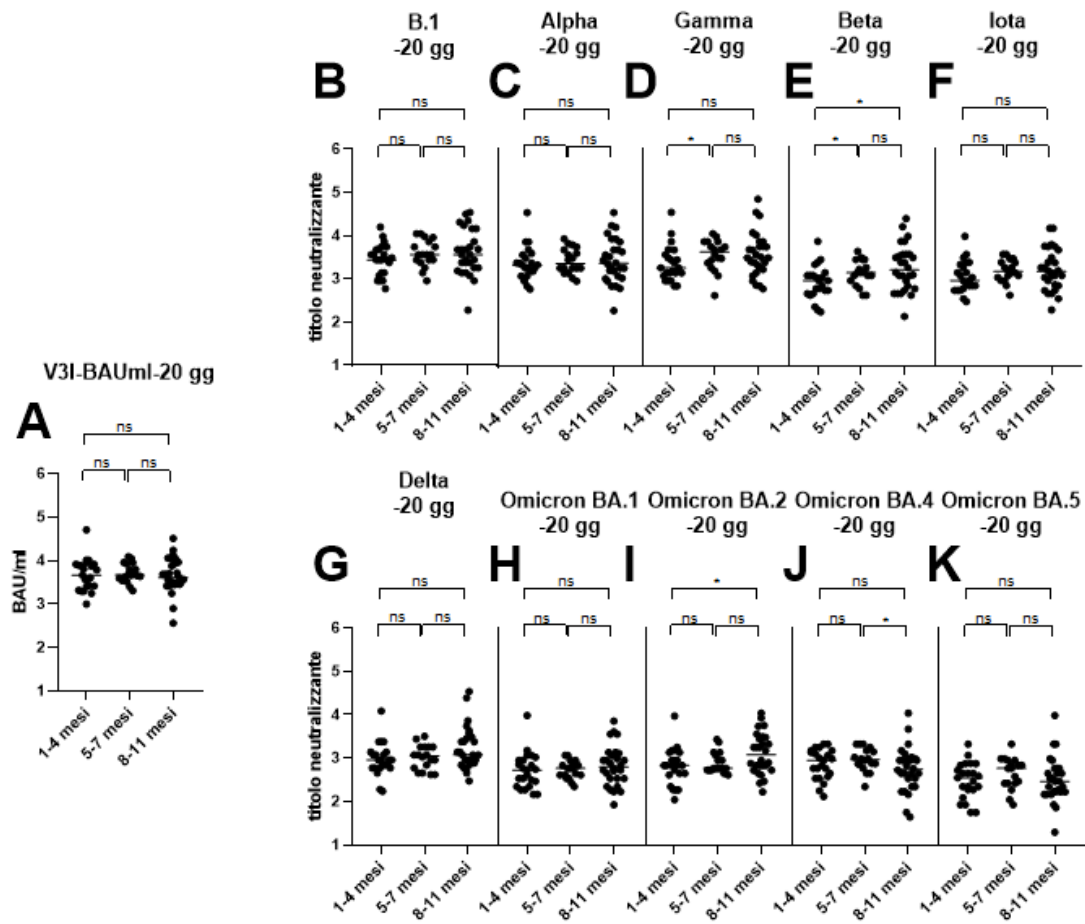


Figura 51. Titoli neutralizzanti (B-K) e anticorpi IgGII anti-Spike (A) dei soggetti vaccinati con 3 dosi e con infezione naturale da Omicron BA.1, BA.2 e BA.4/5 testati contro 10 varianti di SARS-CoV-2, 20 giorni dopo l'infezione naturale suddivisi in base alla distanza intercorsa tra l'infezione naturale e la vaccinazione. Le linee orizzontali rappresentano la mediana.

Dopo 120 giorni (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**Errore.

L'origine riferimento non è stata trovata. A), i risultati degli anticorpi quantitativi anti-spike sono risultati più elevati nel gruppo di soggetti che ha contratto l'infezione 5-7 mesi dopo la vaccinazione. Nello specifico, i valori della mediana erano rispettivamente, 4127, 6787 e 4060 BAU/ml.

Allo stesso modo i titoli neutralizzanti sono risultati più elevati per il gruppo 5-7 mesi rispetto agli altri due gruppi nei confronti della maggior parte delle varianti testate in vitro (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. B-I). Anche in questa analisi si è confermato che i *sub-lineage* Omicron BA.4 e Omicron BA.5, sono più refrattari da parte di tutti e tre i gruppi, se paragonati alle altre varianti (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. J e K).

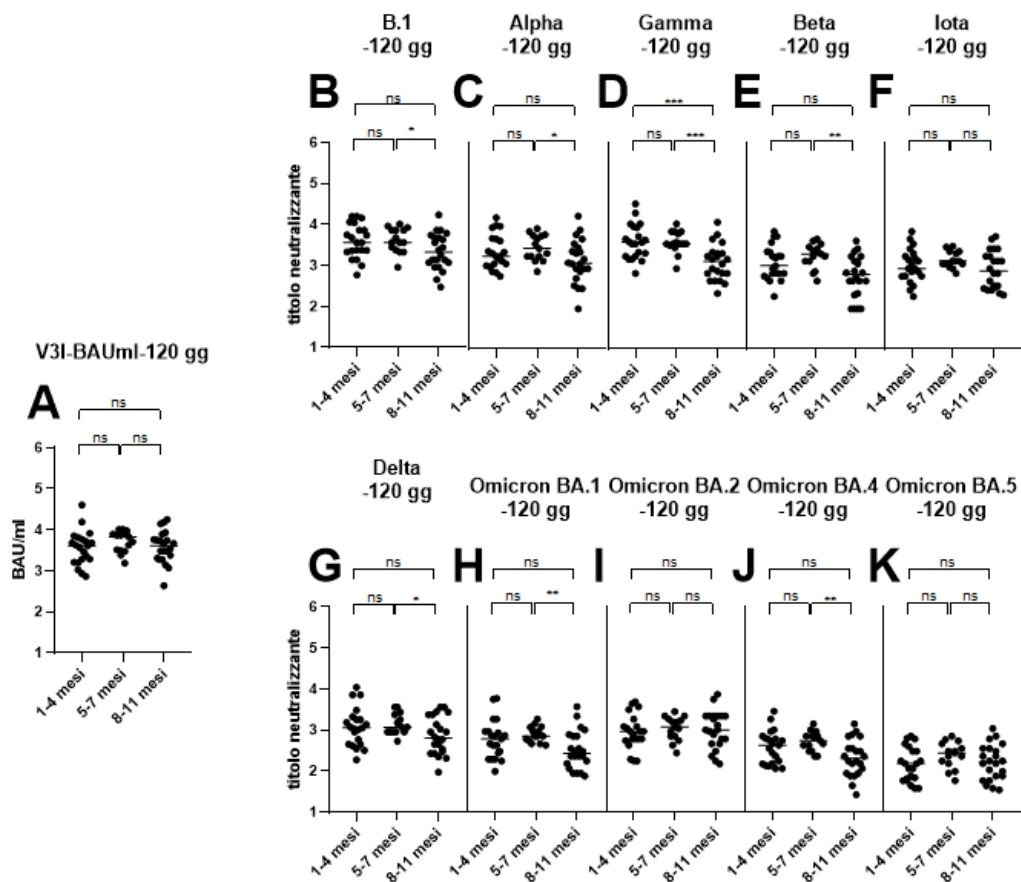


Figura 52. Soggetti vaccinati con 3 dosi e con infezione naturale da Omicron BA.1, BA.2 e BA.4/5 testati contro 10 varianti di SARS-CoV-2, 120 giorni dopo l'ultima stimolazione immunitaria. A sinistra (A), si può osservare il quantitativo di anticorpi IgGII anti-Spike 120 giorni post-stimolazione immunitaria.

Infine la tendenza è stata confermata anche dopo 180 giorni: la capacità legante degli anticorpi anti-Spike è risultata più elevata nel gruppo 5-7 mesi per poi calare di 1,4 volte nel gruppo 8-11 mesi: in particolare, 4836 BAU/ml e 3417 BAU/ml (Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. A). Il risultato è stato analogo

anche per i titoli neutralizzanti, che hanno mostrato un aumento non statisticamente significativo nel gruppo 5-7 mesi.

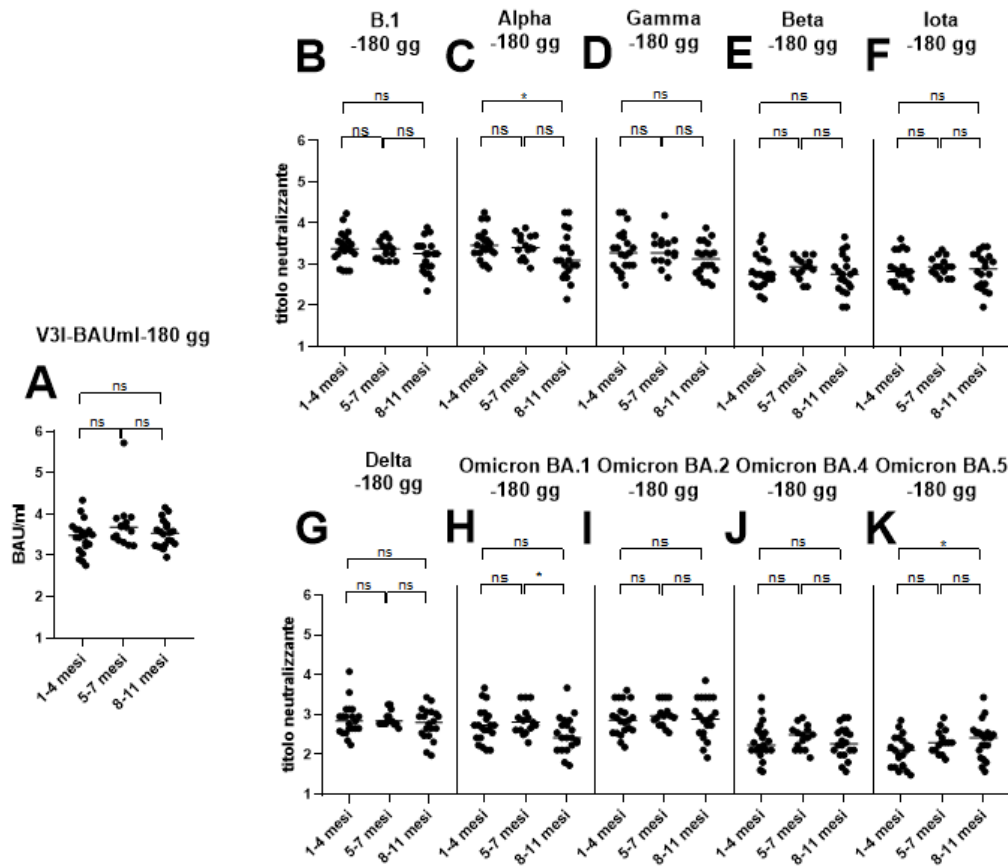


Figura 53. Soggetti vaccinati con 3 dosi e con infezione naturale da Omicron BA.1, BA.2 e BA.4/5 testati contro 10 varianti di SARS-CoV-2, 180 giorni dopo l'ultima stimolazione immunitaria. A sinistra (A), si può osservare il quantitativo di anticorpi IgGII anti-Spike 180 giorni post-stimolazione immunitaria.

12.5 Decadimento dell'attività neutralizzazione e di legame degli anticorpi anti spike SARS-CoV-2

Per valutare la durata della risposta immunitaria è stato studiato il

decadimento nel tempo della risposta neutralizzante complessiva contro le

varianti B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1 e Omicron BA.2 per gli individui sottoposti a vaccinazione e contro le varianti B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1, Omicron BA.2, Omicron BA.4 e Omicron BA.5 per quelli vaccinati con 3 dosi e con un'infezione naturale con *sub-lineage* del *lineage* Omicron.

Per la creazione del grafico sono state utilizzate le mediane di un gruppo di individui, relative al periodo in cui è stato svolto il prelievo e alle varianti considerate.

Per i vaccinati con 3 dosi si può notare come i titoli neutralizzanti abbiano raggiunto i valori massimi 20 giorni dopo la stimolazione vaccinale, indice quindi della maggiore attività del sistema immunitario. Nel tempo i titoli neutralizzanti calavano del 72% dopo 120 giorni, e calavano ulteriormente (47.5%) dopo 180 giorni (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. A).**

Per quanto riguarda i gruppi V3IBA.1 e V3IBA.2, nell'arco dei 20, 120 e 180 giorni, si può osservare che il massimo titolo neutralizzante contro tutte le varianti è stato raggiunto a 120 giorni, con una lieve diminuzione (circa 27%), solo tra 120 e 180 giorni (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. B e C).**

I titoli contro il lineage Omicron BA.5, partivano da valori più bassi, come precedentemente dimostrato e tendevano, sin dai 120 giorni, a decrescere.

Infine, per il gruppo V3IBA.5 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. Errore.**

L'origine riferimento non è stata trovata.D), i livelli di neutralizzazione nei giorni successivi ai 20 giorni dalla stimolazione immunitaria data dall'infezione hanno mostrato un calo sensibile già tra 20 e 120 giorni, dato di difficile interpretazione.

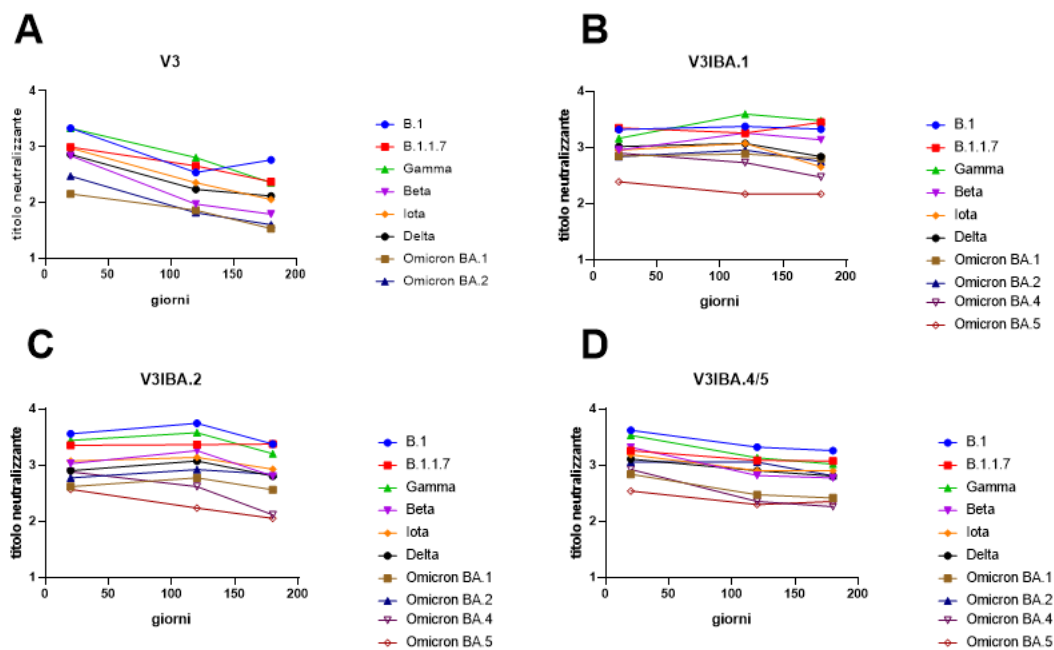


Figura 54. Grafici della risposta neutralizzante contro le singole varianti dei gruppi V3, V3IBA.1, V3IBA.2, V3IBA.4/5 a distanza di 20, 120 e 180 giorni dall'ultima stimolazione immunitaria.

12.6 Efficienza neutralizzante specifica degli anticorpi anti-Spike

Un'ulteriore analisi è stata svolta per valutare l'affinità di legame degli anticorpi e la sua evoluzione nei diversi stati di immunizzazione dei soggetti. A questo scopo, sono stati considerato il rapporto tra il potere neutralizzante contro le varianti di SARS-CoV-2 isolate e gli anticorpi leganti anti-Spike quantificati in BAU/ml nei gruppi di soggetti V2 (vaccinati con 2 dosi di vaccino Pfizer/BioNTech BNT162b2), V3 (vaccinati con 3 dosi di vaccino), V3I1-4 mesi (vaccinati con 3 dosi di vaccino e infettati dopo 1-4 mesi dalla vaccinazione), V3I5-7 mesi (vaccinati con 3 dosi di vaccino e infettati dopo 5-7 mesi dalla vaccinazione) e V3I8-11 mesi (vaccinati con 3 dosi di vaccino e infettati dopo 8-11 mesi dalla vaccinazione). Questo rapporto può essere considerato come un indice dell'efficacia neutralizzante specifica.

Dalla **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, si può osservare come i soggetti a cui sono state somministrate due dosi di vaccino (V2) abbiano mostrato livelli bassi di efficacia di neutralizzazione contro tutte le varianti testate.

A seguito della somministrazione di un'altra dose vaccinale (gruppo V3), il rapporto tra potere neutralizzante e anticorpi leganti, si innalza notevolmente in tutti i casi presi in esame. Tale parametro continua a salire nei soggetti che

hanno acquisito un'infezione naturale in periodi anche distanti dalla vaccinazione: in particolare, si è osservato come soggetti infettati dal virus a distanza di 8-11 mesi dall'ultima dose vaccinale (V3) abbiano sviluppato la massima efficienza neutralizzante specifica.

Questi dati ci indicano come la stimolazione immunitaria ripetuta, e distanziata nel tempo, conferisca una migliore efficacia di neutralizzazione.

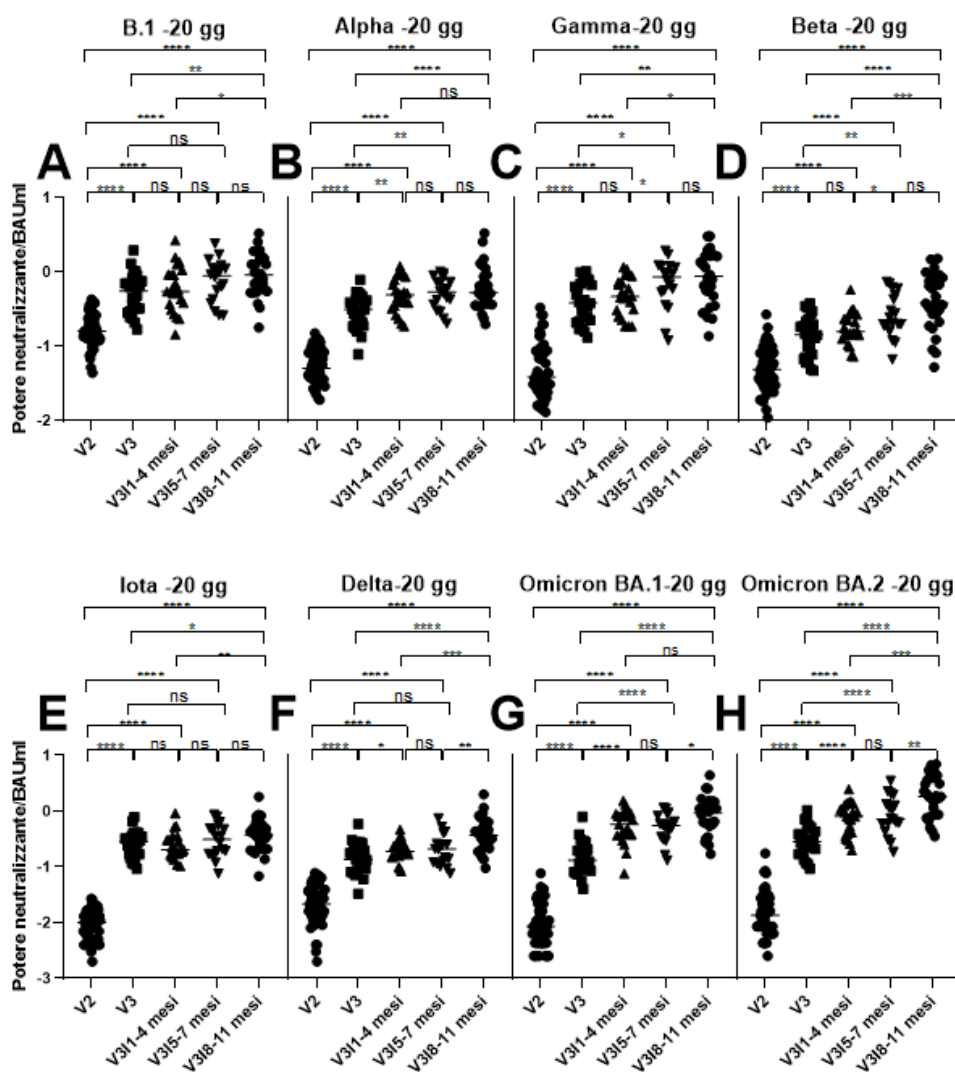


Figura 55. Rappresentazione del rapporto tra potere neutralizzante e BAU/ml nei confronti della variante B.1. La valutazione è stata effettuata per i gruppi di soggetti V3, V31BA.1, V31BA.2, V31BA.4/5 sottoposti a prelievo dopo 20, 120 e 180 giorni dall'ultima stimolazione immunitaria.

13. Discussione e conclusioni

SARS-CoV-2 ha rappresentato un patogeno di enorme rilevanza, poiché ha causato la pandemia da COVID-19 sviluppatasi a partire da dicembre 2019 fino a maggio 2023.

Durante questo arco temporale, il virus ha infettato migliaia di persone in tutto il mondo, le quali hanno manifestato sintomi dai più lievi, come febbre, mialgia, nausea, dolore alle articolazioni, a sindromi vere e proprie che hanno interessato, nella prima fase infettiva, polmoni e apparato gastro-intestinale, e nelle successive altri distretti corporei, quali piccoli e grandi vasi, cuore, fegato e cervello.

Man mano che il virus si diffondeva nella popolazione, esso si è evoluto in diversi *lineage*, mutando il suo genoma grazie a meccanismi genetici come l'intervento di enzimi cellulari, la ricombinazione di due ceppi virali co-infettanti lo stesso ospite e l'elevato indice replicativo virale.

Al fine di contrastare la propagazione e alleviare gli effetti dell'infezione virale, gli scienziati e le principali case farmaceutiche mondiali hanno iniziato a sperimentare la formulazione di vaccini. Sfortunatamente, non tutti i vaccini prodotti hanno superato le prime fasi di approvazione e pochi sono stati poi commercializzati e somministrati alla popolazione: BioNTech/Pfizer, Moderna, Johnson & Johnson, Gamaleya (Sputnik V), Astra Zeneca, Novavax, Sinopharm e SinoVac. Complessivamente, le dosi di vaccino somministrate a livello globale sono state 13 miliardi (aggiornato a luglio 2023) ^[65].

In questo modo, la vaccinazione ha determinato un ruolo fondamentale nel contrastare l'infezione: il sistema immunitario di soggetti vaccinati e infettati è stato stimolato a produrre anticorpi e altre cellule coinvolte in questo meccanismo, diminuendo così la gravità dei sintomi e supportando l'organismo ospite nella guerra al virus.

È interessante notare che la quantità di anticorpi prodotti a seguito della vaccinazione non è pari a quella generata dall'infezione naturale. Infatti, i valori anticorpali, misurati in BAU/ml, sono risultati inferiori in individui vaccinati con tre dosi, di cui l'ultima con il vaccino Pfizer/BioNTech BNT162b2, rispetto ai valori in individui sottoposti a vaccinazione e che hanno avuto una infezione naturale con il *lineage* Omicron. Ciò è stato osservato sia nei giorni immediatamente successivi alla stimolazione immunitaria data dall'infezione (20 giorni), sia a distanza di 4 e 6 mesi.

A supporto di ciò è stato osservato come la risposta delle cellule T indotta dalla somministrazione di una o due dosi di vaccini a mRNA (come Pfizer/BioNTech BNT162b2 e Moderna mRNA-1273) conferisca una protezione a lungo termine, di circa 6-8 mesi, in soggetti con infezione naturale da SARS-CoV-2 ^[41].

Per quanto riguarda il saggio di microneutralizzazione su piastra, sono stati condotti degli studi che prevedevano il prelievo di sangue da varie classi di

soggetti, sia vaccinati con una o più dosi, sia infettati dal virus. A seguito di ciò, si effettuava un'incubazione del siero scomplementato e dello stock virale di *lineage* di SARS-CoV-2 isolati nell'arco della pandemia. Le varianti testate sono state: B.1, Alpha, Gamma, Beta, Iota, Delta, Omicron BA.1, Omicron BA.2, Omicron BA.4 e Omicron BA.5. Questo è stato svolto per valutare il titolo neutralizzante, ovvero la quantità di anticorpi presenti nel siero capace di inibire l'azione infettante del virus.

Studi precedenti hanno dimostrato come sieri di soggetti convalescenti e vaccinati con due dosi neutralizzino efficacemente la variante Alpha, ma è stata osservata una riduzione del titolo anticorpale neutralizzante contro la variante Beta ^[41].

Inoltre, le varianti Beta e Delta sono state neutralizzate in modo significativo da parte di soggetti vaccinati con due dosi, mentre le varianti B.1, Alpha e Gamma reagivano con una risposta pressoché simile dagli stessi individui ^[41].

Mettendo a confronto questi dati con quelli di soggetti vaccinati con tre dosi, si può stabilire come questi neutralizzino con buoni livelli le varianti B.1 e Gamma, con valori leggermente inferiori le varianti Alpha, Beta, Iota e Delta, mentre con scarsi risultati due *sub-lineage* della variante Omicron, 20 giorni dalla stimolazione immunitaria indotta dall'infezione.

Questa affermazione viene parzialmente confermata da un altro studio: neutralizzando sieri di individui vaccinati con due dosi, si è osservato come si abbia un decremento del titolo neutralizzante contro le varianti Alpha, Gamma e Iota e in modo più evidente nella variante Delta ^[46].

Analizzando soggetti vaccinati e che hanno avuto un'infezione naturale con vari *lineage* di SARS-CoV-2, il potere neutralizzante è a volte variante-specifico. In particolare, soggetti infettati dalla variante Alpha hanno livelli di neutralizzazione alti, così come coloro infettati da Omicron BA.5 hanno dimostrato avere potere neutralizzante ottimo contro la stessa variante, anche se i livelli rimangono inferiori a quelli verso le altre varianti.

Infine, è stato osservato come gruppi di individui vaccinati con due dosi e infettati con i *lineage* diffusi tra la popolazione nella prima metà del 2021, come Beta e Gamma, siano cross-reattivi nei confronti degli altri *lineage* ^[46].

Allo stesso modo, soggetti vaccinati con tre dosi e infettati con *sub-lineage* Omicron BA.1, BA.4 e BA.5 siano maggiormente reattivi contro varianti come Alpha, Gamma e Beta. Nel primo caso si è notata una maggiore neutralizzazione contro *lineage* di Omicron comparsi successivamente (come Omicron BA.4 e BA.5).

In questo studio si dimostra che l'infezione naturale, oltre alla tre dosi di vaccino aggiunge ulteriore potere neutralizzante alla risposte anticorpali e

soprattutto migliora questo potere anche nei confronti di varianti non correlate, precedenti o successive a quella responsabile dell'infezione.

Indubbiamente questo miglioramento è dovuto al processo di maturazione della risposta umorale in funzione di stimoli ripetuti. Conferme in questo senso vengono anche da esperimenti mirati ad evidenziare meglio il fenomeno. A questo scopo, è stato introdotto un nuovo parametro derivato per analizzare in dettaglio il potere neutralizzante specifico degli anticorpi. Tale parametro è il rapporto tra la capacità legante degli anticorpi (misurata in BAU/ml), e il titolo neutralizzante e rappresenta l'efficacia specifica di neutralizzazione. Se analizziamo questo parametro dei soggetti vaccinati 2 volte o 3 volte e poi contagiati, si osserva che ad ogni successiva immunizzazione il valore dell'efficacia specifica aumenta, ossia a parità di capacità legante, gli anticorpi aumentano il loro potere neutralizzante.

L'interpretazione di questo fenomeno è indubbiamente da ricercare nel fatto che il numero cumulativo maggiore di stimolazioni stimola il processo di maturazione tramite mutazione somatica dei geni per le porzioni variabili degli anticorpi e perfeziona la selezione clonale dei cloni di cellule B con memoria con la migliore affinità per l'antigene. Altri dati in questo studio confortano questa tesi, ad esempi quelli che riportano una maggiore efficacia neutralizzante in base al tempo trascorso tra l'ultima dose di vaccino e

l'infezione naturale, confrontando i sieri ottenuti da soggetti infettati con *sub-lineage* di Omicron a distanza di 1-4, 5-7 e 8-11 mesi dalla somministrazione della terza dose di vaccino. Il paragone si basa, inoltre, su prelievi ematici effettuati 20, 120 e 180 giorni dalla stimolazione indotta dall'infezione naturale.

Gli anticorpi prodotti a seguito della vaccinazione o dell'infezione naturale hanno sia la capacità di legare la proteina Spike sia di manifestare un'azione neutralizzante nei confronti dell'ingresso del virus all'interno della cellula ospite a seguito del legame. Questa differenza può essere valutata mediante il rapporto tra potere neutralizzante contro *lineage* di SARS-CoV-2 isolati e la quantità di anticorpi anti-Spike misurati in BAU/ml, indotti dalla stimolazione da vaccino o da infezione. Si può notare come l'efficacia neutralizzante a 20 e 120 giorni sia massima quando l'intervallo di tempo intercorso supera i 4 mesi, suggerendo che i processi di mutazione e selezione delle cellule con memoria richiedano un tempo minimo per massimizzare il loro effetto. Infine questo studio ha cercato anche di metter in evidenza il ruolo della risposta anamnestiche nella durata nel tempo dell'attività neutralizzante anticorpale. E' risultato molto evidente, che i soggetti con un maggior numero di stimoli immunologici (vaccinazioni e infezione naturale) abbiano mantenuto più a

lungo un titolo neutralizzante più elevato e che il suo decadimento nel tempo (fino a 180 giorni, periodo massimo del follow-up) sia stato più lento.

In conclusione, la dimostrazione di come la risposta anamnesticca si possa giovare sia di ripetuti stimoli immunitari, sia di intervalli di tempo non ravvicinati per la somministrazione di questi stimoli, ci permette di ipotizzare come le future campagne di vaccinazione contro qualsiasi patogeno si possano avvalere di un numero di dosi superiori a tre e che gli intervalli di tempo tra le diverse dosi debbano superare i 4 mesi. Questo permetterebbe di ottenere titoli neutralizzanti più elevati e parzialmente efficaci anche contro l'eventuale variabilità dei virus, nonché più duraturi nel tempo. Purtroppo SARS-CoV-2 è con ogni probabilità destinato a rimanere per sempre nella popolazione umana, e anche con una circolazione ridotta, a cui assistiamo attualmente grazie alla forte immunità di gregge, riesce comunque a contagiare molte persone ed è associato ad una certa mortalità nelle popolazioni fragili. Alla luce anche ai risultati di questo studio, risulta evidente che in questa popolazione sarebbe importante sostenere la risposta immunitaria, sia cellulare che umorale, tramite ulteriori dosi di vaccino (qualsiasi vaccino), per moderare l'impatto di eventuali future infezioni.

14. Bibliografia

[1] World Health Organization, <https://covid19.who.int/>

[2] Antonelli Guido, Clementi Massimo, Pozzi Gianni, Rossolini Gian Maria, “Principi di Microbiologia Medica”, 4 edizione, casa editrice Ambrosiana, 2023.

- [3] Rachel L Graham, Eric F Donaldson, Ralph S Baric, “A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses”, 2013 Dec;11(12):836-48. doi: 10.1038/nrmicro3143. Epub 2013 Nov 11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24217413/>
- [4] Cody B. Jackson, Michael Farzan, Bing Chen and Hyeryun Choe, “Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells”, 2022 Jan;23(1):3-20. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x. Epub 2021 Oct 5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34611326/>
- [5] Binod Kumar, Grant M Hawkins, Tom Kicmal, Enya Qing, Emily Timm, Tom Gallagher, “Assembly and Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV2): Evaluation Using Virus-Like Particles”, 2021 Apr 9;10(4):853. doi: 10.3390/cells10040853. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33918600/>
- [6] Nikhil Kirtipal, Shiv Bharadwaj, Sang Gu Kang, “From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses”, 2020 Nov;85:104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502. Epub 2020 Aug 13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32798769/>
- [7] Barbara Illi (Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR), c/o Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Charles Darwin”, Sapienza Università di Roma), “Il mondo sorprendente del genoma del SARS-CoV-2”, 23 Agosto 2020. <https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>
- [8] Filippo Scialo, Aurora Daniele, Felice Amato, Lucio Pastore, Maria Gabriella Matera, Mario Cazzola, Giuseppe Castaldo, Andrea Bianco, “ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2”, 2020 Dec;198(6):867-877. doi: 10.1007/s00408-020-00408-4. Epub 2020 Nov 10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33170317/>
- [9] Atala B. Jena, Namrata Kanungo, Vinayak Nayak, G. B. N. Chainy, Jagdishwar Dandapat, “Catechin and curcumin interact with S protein of SARS-CoV2 and ACE2 of human cell membrane: insights from computational studies”, Sci Rep 11, 2043 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81462-7>
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-81462-7#MOESM1>

- [10] Iwata-Yoshikawa, N., Kakizaki, M., Shiwa-Sudo, N. et al. “Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways.” *Nat Commun* 13, 6100 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33911-8>,
<https://www.nature.com/articles/s41467-022-33911-8>
- [11] Kèvin Knoops, Marjolein Kikkert, Sjoerd H. E. van den Worm, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Yvonne van der Meer, Abraham J Koster, A. Mieke Mommaas, Eric J Snijder, “SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum”, Published: September 16, 2008, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>,
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0060226>
- [12] Philip V’kovski, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder, Volker Thiel, “Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2”, *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>,
<https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6>
- [13] Edem Gavor, Yeu Khai Choong, Shi Yin Er, Hariharan Sivaraman, and J. Sivaraman, “Structural Basis of SARS-CoV-2 and SARS-CoV Antibody Interactions”, *Trends Immunol.* 2020 Nov;41(11):1006-1022. doi: 10.1016/j.it.2020.09.004. Epub 2020 Sep 17,
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33041212/>
- [14] Paul S Masters, “The molecular biology of coronaviruses” 2006; 66:193-292. Doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16877062/>
- [15] Maria Romano, Alessia Ruggiero, Flavia Squeglia, Giovanni Maga, Rita Berisio, “A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping”, 2020 May 20;9(5):1267. doi: 10.3390/cells9051267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443810/>
- [16] Ben Hu, Hua Guo, Peng Zhou & Zheng-Li Shi, “Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19”, *Nature Reviews Microbiology* volume 19, pages 141–154 (2021). <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
- [17] Jaakko Saraste and Kristian Prydz, “Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space”; *Cells.* 2021 Mar; 10(3): 503. Published online 2021 Feb

26. doi: 10.3390/cells10030503;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7996754/>

[18] Mart M. Lamers & Bart L. Haagmans, “SARS-CoV-2 pathogenesis”, *Nature Reviews Microbiology* volume 20, pages270–284 (2022); pubblicato il 30 marzo 2022, <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00713-0>

[19] Jun Yong Choi and Davey M. Smith, “SARS-CoV-2 Variants of Concern”, *Yonsei Med J.* 2021 Nov; 62(11): 961–968. Published online 2021 Oct 18. doi: 10.3349/ymj.2021.62.11.961,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8542474/>

[20] Aqeel Ahmad, Mohammed Ali Mullah Fawaz, and Arafeen Aisha, “A comparative overview of SARS-CoV-2 and its variants of concern”, *Infez Med.* 2022; 30(3): 328–343. Published online 2022 Sep 1. doi: 10.53854/liim-3003-2; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9448317/>

[21] Aakriti Gupta, Mahesh V. Madhavan, Kartik Sehgal, Nandini Nair, Shiwani Mahajan, Tejasav S. Sehrawat, Behnood Bikdeli, Neha Ahluwalia, John C. Ausiello, Elaine Y. Wan, Daniel E. Freedberg, Ajay J. Kirtane, Sahil A. Parikh, Mathew S. Maurer, Anna S. Nordvig, Domenico Accili, Joan M. Bathon, Sumit Mohan, Kenneth A. Bauer, Martin B. Leon, Harlan M. Krumholz, Nir Uriel, Mandeep R. Mehra, Mitchell S. V. Elkind, Donald W. Landry, “Extrapulmonary manifestations of COVID-19”, *Nature Medicine* volume 26, pages1017–1032 (2020), published 10 July 2020, <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0968-3>

[22] Joel O. Wertheim, Jade C. Wang, Mindy Leelawong, Darren P. Martin, Jennifer L. Havens, Moinuddin A. Chowdhury, Jonathan E. Pekar, Helly Amin, Anthony Arroyo, Gordon A. Awandare, Hoi Yan Chow, Edimarlyn Gonzalez, Elizabeth Luoma, Collins M. Morang’a, Anton Nekrutenko, Stephen D. Shank, Stefan Silver, Peter K. Quashie, Jennifer L. Rakeman, Victoria Ruiz, Lucia V. Torian, Tetyana I. Vasylyeva, Sergei L. Kosakovsky Pond & Scott Hughes, “Detection of SARS-CoV-2 intra-host recombination during superinfection with Alpha and Epsilon variants in New York City”, *Nature Communications* volume 13, Article number: 3645 (2022), published 25 June 2022; <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31247-x>

[23] Peter V. Markov, Mahan Ghafari, Martin Beer, Katrina Lythgoe, Peter Simmonds, Nikolaos I. Stilianakis & Aris Katzourakis, “The evolution of SARS-CoV-2”, *Nature Reviews Microbiology* volume 21, pages361–379

(2023), published 05 April 2023; <https://www.nature.com/articles/s41579-023-00878-2>

[24] Le Bert, N., Tan, A.T., Kunasegaran, K. et al., “SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls”, *Nature* 584, 457–462 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>; published 15 July 2020; <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2550-z>

[25] Kaiming Tao, Philip L. Tzou, Janin Nouhin, Ravindra K. Gupta, Tulio de Oliveira, Sergei L. Kosakovsky Pond, Daniela Fera, Robert W. Shafer, “The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants”, *Nature Reviews Genetics* volume 22, pages757–773 (2021), published 17 September 2021, <https://www.nature.com/articles/s41576-021-00408-x>

[26] Medini K. Annavajhala, Hiroshi Mohri, Pengfei Wang, Manoj Nair, Jason E. Zucker, Zizhang Sheng, Angela Gomez-Simmonds, Anne L. Kelley, Maya Tagliavia, Yaoxing Huang, Trevor Bedford, David D. Ho, Anne-Catrin Uhlemann, “Emergence and expansion of SARS-CoV-2 B.1.526 after identification in New York”, *Nature* volume 597, pages703–708 (2021), published 24 August 2021, <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03908-2>

[27] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, “Cellular and molecular immunology”, sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders.

[28] Li Yang, Shasha Liu, Jinyan Liu, Zhixin Zhang, Xiaochun Wan, Bo Huang, Youhai Chen, Yi Zhang, “COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics”, *Signal Transduction and Targeted Therapy* volume 5, Article number: 128 (2020), *Nature*, published 25 July 2020; <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00243-2>

[29] Judith M. Minkoff, Benjamin tenOever, “Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2”, *Nature Reviews Microbiology* volume 21, pages178–194 (2023), published 11 January 2023, <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00839-1>

[30] You-Me Kim, Eui-Cheol Shin, “Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection”, *Experimental & Molecular Medicine* volume 53, pages750–760 (2021), published 06 May 2021, <https://www.nature.com/articles/s12276-021-00592-0>

- [31] Michael S. Diamond, Thirumala-Devi Kanneganti, “Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2”, *Nature Immunology* volume 23, pages 165–176 (2022), published 01 February 2022, <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01091-0>
- [32] Dong S, et al. *J Med Virol.* 2020; Gottipati K, et al. *Virology.* 2020. 544:31-41. <https://www.acrobiosystems.com/L-1040-NSP1.html>
- [33] Laurie Barclay, “MERS-CoV Hospital Outbreak Causes Significant Morbidity”, June 21, 2013 <https://www.medscape.com/viewarticle/806760>
- [34] Xiaona Wang,a,* Xinyuan Qiao,a,b,* Ling Sui,a Haiyuan Zhao,c Fengsai Li,a Yan-Dong Tang,d Wen Shi,e Yuyao Guo,a Yanping Jiang,a Li Wang,a Han Zhou,a Lijie Tang,a,b Yigang Xu,a,b and Yijing Li, “Establishment of stable Vero cell lines expressing TMPRSS2 and MSPL: A useful tool for propagating porcine epidemic diarrhea virus in the absence of exogenous trypsin”, published May 29 2020; 11(1): 669–685. doi: 10.1080/21505594.2020.1770491; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7550007/>
- [35] Nandini Sethuraman, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Akihide Ryo, “Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2”, May 6, 2020, *JAMA.* 2020;323(22):2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259, <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2765837>
- [36] Inderbir S. Padda; Mayur Parmar, “COVID (SARS-COV-2) Vaccine”, Last Update: February 25, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567793/>
- [37] Lea Krutzke, Reinhild Rösler, Ellen Allmendinger, Tatjana Engler, Sebastian Wiese, and Stefan Kochanek, “Process- and product-related impurities in the ChAdOx1 nCov-19 vaccine”, Published online 2022 Jul 4. doi: 10.7554/eLife.78513, PMID: 35781137; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9313527/>
- [38] Stephan Michalik, Florian Siegerist, Raghavendra Palankar, Kati Franzke, Maximilian Schindler, Alexander Reder, Ulrike Seifert, Clemens Cammann, Jan Wesche, Leif Steil, Christian Hentschker, Manuela Gesell-Salazar, Emil Reisinger, Martin Beer, Nicole Endlich, Andreas Greinacher, Uwe Völker, “Comparative analysis of ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COV2.S SARS-CoV-2 vector vaccines”, Published online 2022 Jan 20.

doi: 10.3324/haematol.2021.280154, PMCID: PMC8968905, PMID: 35045692, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8968905/>

[39] Sima S. Toussi, Jennifer L. Hammond, Brian S. Gerstenberger, Annaliesa S. Anderson, “Therapeutics for COVID-19”, published on line 4 May 2023, <https://www.nature.com/articles/s41564-023-01356-4>

[40] https://outbreak.info/situation-reports/alpha?xmin=2022-12-22&xmax=2023-06-22&loc=GBR&loc=USA&loc=USA_US-CA&loc=Worldwide&selected=GBR

[41] Irene Cassaniti, Federica Bergami, Elena Percivalle, Elisa Gabanti, Jose Camilla Sammartino, Alessandro Ferrari, Kodjo Messan Guy Adzasehoun, Federica Zavaglio, Paola Zelini, Giuditta Comolli, Antonella Sarasini, Antonio Piralla, Alessandra Ricciardi, Valentina Zuccaro, Fabrizio Maggi, Federica Novazzi, Luca Simonelli, Luca Varani, Daniele Lilleri, Fausto Baldanti, “Humoral and cell-mediated response against SARS-CoV-2 variants elicited by mRNA vaccine BNT162b2 in healthcare workers: a longitudinal observational study”, Available online 25 September 2021, Editor: L. Kaiser, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34582981/>

[42] Aaron Kofman, Rami Kantor, Eli Y. Adashi, “Potential COVID-19 Endgame Scenarios Eradication, Elimination, Cohabitation, or Conflagration?”, published 8 July 2021, <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2781945>

[43] Charles D. Murin, Ian A. Wilson, Andrew B. Ward, “Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses”, *Nat Microbiol.* 2019 May ; 4(5): 734–747. doi:10.1038/s41564-019-0392-y, <https://www.nature.com/articles/s41564-019-0392-y>

[44] Panke Qu, John P. Evans, Julia Faraone, Yi-Min Zheng, Claire Carlin, Mirela Anghelina, Patrick Stevens, Soledad Fernandez, Daniel Jones, Gerard Lozanski, Ashish Panchal, Linda J. Saif, Eugene M. Oltz, Kai Xu, Richard J. Gumina, and Shan-Lu Liu, “Distinct Neutralizing Antibody Escape of SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7 and BA.2.75.2”, Version 1. bioRxiv. Preprint. 2022 Oct 20., doi: 10.1101/2022.10.19.512891, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9603827/>

[45] Irene Cassaniti, Elena Percivalle, Federica Bergami, Antonio Piralla, Giuditta Comolli, Raffaele Bruno, Marco Vecchia, Margherita Sambo, Marta

Colaneri, Valentina Zuccaro, Marco Benazzo, Carlo Robotti, Anna Calastri, Eugenia Maiorano, Alessandro Ferrari, Giuseppe Cambié, Fausto Baldanti, “SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay”, *Clin Microbiol Infect*, 2021 Jul;27(7):1029-1034. doi: 10.1016/j.cmi.2021.03.010. Epub 2021 Apr 2., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33813122/>

[46] Sara Caucci, Benedetta Corvaro, Sofia Maria Luigia Tiano, Anna Valenza, Roberta Longo, Katia Marinelli, Monica Lucia Ferreri, Patrik Spiridigliozzi, Giovanna Salvoni, Patrizia Bagnarelli and Stefano Menzo, “Weak Cross-Lineage Neutralization by Anti SARS-CoV-2 Spike Antibodies after Natural Infection or Vaccination Is Rescued by Repeated Immunological Stimulation”, Published: 2 October 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34696232/>

[47] Josè Camilla Sammartino, Irene Cassaniti, Alessandro Ferrari, Federica Giardina, Guglielmo Ferrari, Federica Zavaglio, Stefania Paolucci, Daniele Lilleri, Antonio Piralla, Fausto Baldanti, Elena Percivalle, “Evaluation of the Neutralizing Antibodies Response against 14 SARS-CoV-2 Variants in BNT162b2 Vaccinated Naïve and COVID-19 Positive Healthcare Workers from a Northern Italian Hospital”, Published: 29 April 2022, *Vaccines* 2022, 10, 703. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050703>, <https://www.mdpi.com/2076-393X/10/5/703>

[48] Paul Bastard e Al., “Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths”, *Sci. Immunol.* 2021; 6 : eabl4340 19 August 2021, <https://www.science.org>

[49] Dragan Primorac, Kristijan Vrdoljak, Petar Brlek, Eduard Pavelić, Vilim Molnar, Vid Matišić, Ivana Erceg Ivkošić, Marijo Parčina, “Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2”, *Front. Immunol.*, 04 May 2022, *Sec. Viral Immunology Volume 13 – 2022*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848582>, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.848582/full>

[50] Bin Gao, Shunyi Zhu, “Mutation-driven parallel evolution in emergence of ACE2-utilizing sarbecoviruses”, *Front. Microbiol.*, 23 February 2023, *Sec. Virology Volume 14 – 2023*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1118025>, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1118025/full>

[51] Muhammad Hanifa, Muhammad Salman, Muqaddas Fatima, Naila Mukhtar, Fahad N. Almajhdi, Nasib Zaman, Muhammad Suleman, Syed Shujait Ali, Yasir Waheed, Abbas Khan, “Mutational analysis of the spike protein of SARS-COV-2 isolates revealed atomistic features responsible for higher binding and infectivity”, *Front. Cell Dev. Biol.*, 17 January 2023, Sec. Epigenomics and Epigenetics Volume 10 – 2022, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.940863>, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.940863/full>

[52] Elisabetta Cameroni, John E. Bowen, Laura E. Rosen, Christian Saliba, Samantha K. Zepeda, Katja Culap, Dora Pinto, Laura A. VanBlargan, Anna De Marco, Julia di Iulio, Fabrizia Zatta, Hannah Kaiser, Julia Noack, Nisar Farhat, Nadine Czudnochowski, Colin Havenar-Daughton, Kaitlin R. Sprouse, Josh R. Dillen, Abigail E. Powell, Alex Chen, Cyrus Maher, Li Yin, David Sun, Leah Soriaga, Jessica Bassi, Chiara Silacci-Fregni, Claes Gustafsson, Nicholas M. Franko, Jenni Logue, Najeeha Talat Iqbal, Ignacio Mazzitelli, Jorge Geffner, Renata Grifantini, Helen Chu, Andrea Gori, Agostino Riva, Olivier Giannini, Alessandro Ceschi, Paolo Ferrari, Pietro E. Cippà, Alessandra Franzetti-Pellanda, Christian Garzoni, Peter J. Halfmann, Yoshihiro Kawaoka, Christy Hebner, Lisa A. Purcell, Luca Piccoli, Matteo Samuele Pizzuto, Alexandra C. Walls, Michael S. Diamond, Amalio Telenti, Herbert W. Virgin, Antonio Lanzavecchia, Gyorgy Snell, David Veessler, Davide Corti, “Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift”, published 23 December 2021, *Nature* volume 602, pages 664–670 (2022), doi: 10.1038/s41586-021-04386-2., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35016195/>

[53] Szu-Wei Huang, Sheng-Fan Wang, “SARS-CoV-2 Entry Related Viral and Host Genetic Variations: Implications on COVID-19 Severity, Immune Escape, and Infectivity”, *Review Int J Mol Sci.* 2021 Mar 17;22(6):3060. doi: 10.3390/ijms22063060, PMID: 33802729 PMCID: PMC8002537 DOI: 10.3390/ijms22063060, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802729/>

[54] Helen Piontkivska, Benjamin Wales-McGrath, Michael Miyamoto, Marta L. Wayne, “ADAR Editing in Viruses: An Evolutionary Force to Reckon with”, Accepted: 21 October 2021, Downloaded from <https://academic.oup.com/gbe/article/13/11/evab240/6409863> by guest on 26 June 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8586724/>

- [55] Kristina M Okonski, Charles E Samuel, “Stress granule formation induced by measles virus is protein kinase PKR dependent and impaired by RNA adenosine deaminase ADAR1”, *J Virol.* 2013 Jan;87(2):756-66. doi: 10.1128/JVI.02270-12. Epub 2012 Oct 31., PMID: 23115276 PMCID: PMC3554044 DOI: 10.1128/JVI.02270-12, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23115276/>
- [56] Mart M. Lamers, Bernadette G. van den Hoogen and Bart L. Haagmans, “ADAR1: “Editor-in-Chief” of Cytoplasmic Innate Immunity”, *Front. Immunol.*, 25 July 2019, Sec. Molecular Innate Immunity Volume 10 - 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01763>, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01763/full>
- [57] Brit Long, Brandon M Carius, Summer Chavez, Stephen Y Liang, William J Brady, Alex Koyfman, Michael Gottlieb, “Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation”, *Am J Emerg Med.* 2022 Apr;54:46-57. doi: 10.1016/j.ajem.2022.01.028. Epub 2022 Jan 21., PMID: 35121478 PMCID: PMC8779861 DOI: 10.1016/j.ajem.2022.01.028, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35121478/>
- [58] <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
- [59] <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/438271>
- [60] <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-us/3000168/complications>
- [61] Alessia Guarnera, Elena Santini, Pierfrancesco Podda, “Idiopathic Interstitial Pneumonias and COVID-19 Pneumonia: Review of the Main Radiological Features and Differential Diagnosis”, *Tomography.* 2021 Aug 31;7(3):397-411. doi: 10.3390/tomography7030035, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34564297/>
- [62] Karl W. Boehme and Teresa Compton, “Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors”, *J Virol.* 2004 Aug; 78(15): 7867–7873., doi: 10.1128/JVI.78.15.7867-7873.2004, PMCID: PMC446107
- [63] PMID: 15254159, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC446107/>
- [64] <https://www.who.int/campaigns/vaccine-equity>

- [65] <https://covid19.who.int/>
- [66] William D Tolbert, Yaozong Chen, Lulu Sun, Mehdi Benlarbi, Shilei Ding, Rohini Manickam, Emily Pangaro, Dung N Nguyen, Suneetha Gottumukkala, Marceline Côté, Frank J Gonzalez, Andrés Finzi, Zahra R Tehrani, Mohammad M Sajadi, Marzena Pazgier, “The molecular basis of the neutralization breadth of the RBD-specific antibody CoV11”, PMID: 37334379 PMCID: PMC10272436 DOI: 10.3389/fimmu.2023.1178355, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37334379/>
- [67] <https://viralzone.expasy.org/9078>; <https://viralzone.expasy.org/9096>
- [68] https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species
- [69] <https://viralzone.expasy.org/9076>
- [70] <https://viralzone.expasy.org/9556>
- [71] <https://viralzone.expasy.org/9077>
- [72] <https://viralzone.expasy.org/9116>
- [73]
https://www.covid19dataportal.it/images/highlights/highlightOmicron_December2021.png
- [74] <https://www.nature.com/articles/s41576-021-00408-x>
- [75] <https://www.microbiologiaitalia.it/immunologia/generare-diversita-come-le-nostre-cellule-producono-anticorpi/>
- [76] <https://www.britannica.com/science/immune-system/Classes-of-immunoglobulins>
- [77] François Simon, 27 octobre 2020, DOI: 10.1056/NEJMp2025631, <https://www.imea.fr/article/sars-cov-2/le-point-virologique-sur-les-test-de-detection-des-antigenes-du-sars-cov-2>
- [78] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, “Cellular and molecular immunology”, sesta edizione aggiornata, casa editrice Elsevier Inc., 2010, by Saunders.