



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
C.d.L. Scienze Biologiche

Test sierologici nella diagnosi del disturbo da nuovo Coronavirus (COVID-19)

**Humoral response against SARS-CoV-2: response to Diagnose Novel
Coronavirus Disease (COVID-19)**

Tesi di laurea
Renato Kurti

Docente referente
Dott.ssa Benedetti Maura

Sessione estiva
2019/2020

ABSTRACT

La diffusione dell'epidemia del nuovo Coronavirus dal tardo Dicembre del 2019 rappresenta ancora una grande sfida per la comunità scientifica. Si sta compiendo uno sforzo enorme per raccogliere il maggior numero di informazioni nel minor tempo possibile.

Il SARS-CoV-2 è il virus alla base dell'attuale pandemia, fino a pochi mesi fa un totale sconosciuto, mentre ora, grazie al fatto che una grande parte della ricerca mondiale è stata incentrata sullo studio di questo virus e sui temi a esso collegati si stanno scoprendo rapidamente molte informazioni. E' un virus respiratorio appartenente alla grande famiglia dei coronavirus, che possono rendersi responsabili di diverse patologie: dal comune raffreddore a sindromi respiratorie più serie. Nel dicembre 2019 a Wuhan, in Cina, è stato isolato il nuovo virus.

Non esistono vaccini disponibili e ci sono poche evidenze a supporto dell'efficacia di potenziali agenti terapeutici. Nella situazione attuale, la ricerca sulla maggior parte delle popolazioni colpite o sui gruppi di rischio è fondamentale per migliorare la gestione dei casi e per la prevenzione delle patologie gravi e fatali.

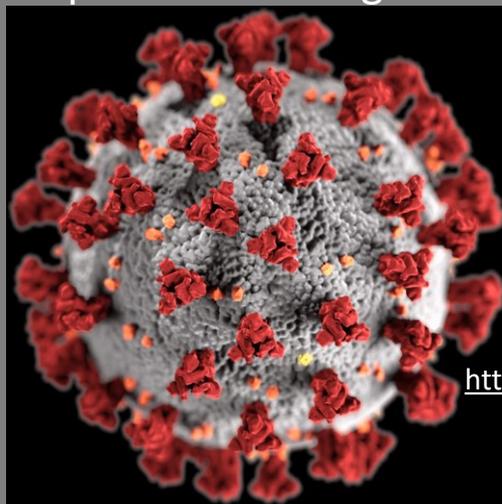
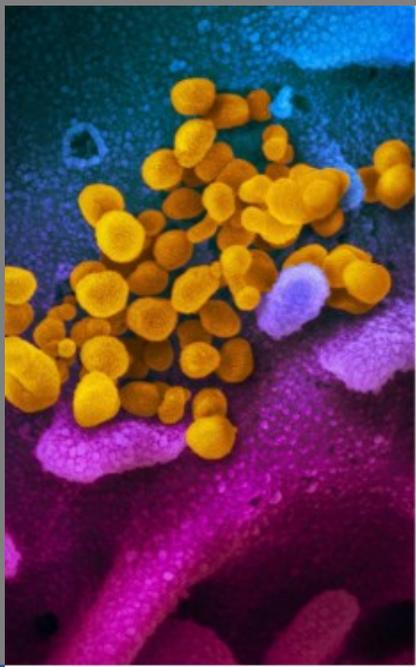
Al momento la prevenzione sembra essere l'unica arma efficace contro il diffondersi della pandemia e che si effettua principalmente con l'utilizzo di tamponi orofaringei e test sierologici sensibili e affidabili, che sono attualmente in fase di sviluppo.

(1)

Breve storia sui Coronavirus

Orthocoronavirinae è una sottofamiglia di virus, noti anche come coronavirus, della famiglia Coronaviridae. Ad oggi sono conosciuti 7 ceppi in grado di infettare gli umani:

- 1) Coronavlrus umano 229E
- 2) Coronavirus umano OC43
- 3) Coronavirus umano NL63
- 4) Coronavirus umano HKU1
- 5) Coronavirus da sindrome respiratoria acuta grave
- 6) Novel Coronavirus 2012
- 7) Coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave



<http://envejecimientoenred.es/articulos/>

(immagine di microscopio a scansione elettronica del virus mentre esce dalla cellula infetta)

<https://edition.cnn.com/videos/spanish/2020/03/10/coronavirus-enfermedad-contagio-prevencion-cuidado-sanjay-gupta-pkg-digital-original-cnnee.cnn>

COVID-19

O Malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2, è una malattia infettiva respiratoria causato dal nuovo Coronavirus.

La diagnosi di CoVid-19 può essere formulata con il test diagnostico per SARS-CoV-2 oppure testando gli anticorpi.

Con diversi studi si è giunti alla conclusione che l'invecchiamento e l'obesità potrebbero aumentare la suscettibilità all'infezione da SARS-CoV-2 ed agli effetti dell'iper-attivazione del sistema immunitario innato indotta dal virus. (6)

Diversi studi hanno messo in correlazione l'obesità con una sintomatologia più severa ed un più alto tasso di mortalità causati da Covid-19, in accordo con quanto osservato nel caso di precedenti epidemie influenzali (7)

Struttura e genoma

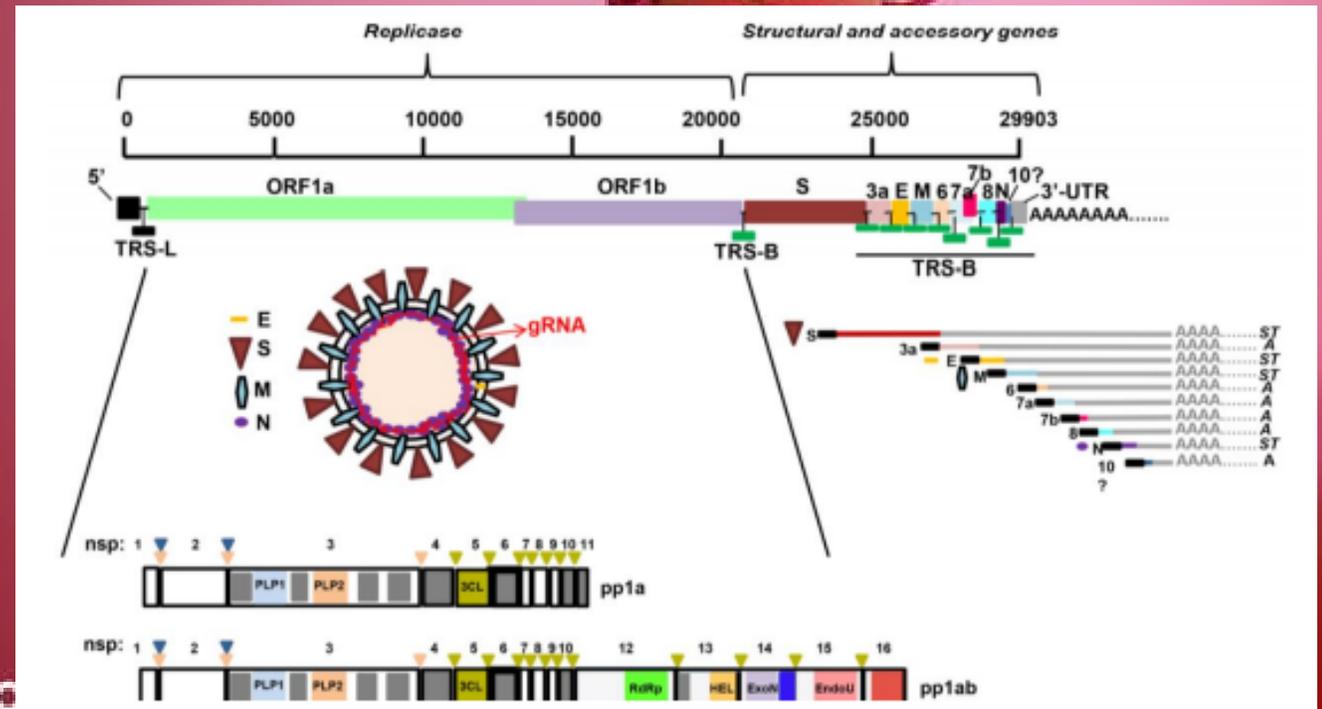
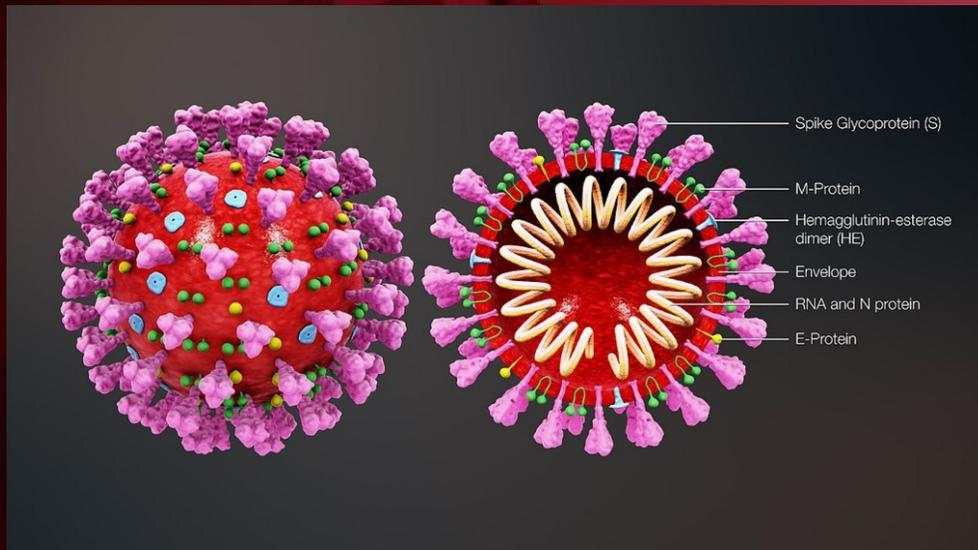
Come già scritto nell'introduzione SARS-CoV-2 è per il 76% identico al virus della SARS 2002. Inoltre condividono anche molte altre caratteristiche biologiche. Nonostante le tante somiglianze l'ultimo virus ha manifestazioni cliniche ed epidemiologiche molto diverse e questo è dovuto al meccanismo di replicazione e trascrizione.

La morfologia dei coronavirus è rotondeggiante, e partendo dall'interno verso l'esterno si possono riconoscere varie componenti del virus:

- L'ACIDO NUCLEICO
- L'ENVELOPE
- PROTEINA E
- DIMERO (HE) EMAGGLUTININA-ESTERASI
- PROTEINA M
- GLICOPROTEINA S ("spike")

I Coronavirus posseggono il genoma più grande - circa 30 KB – di tutti i virus a RNA. Una volta che il Coronavirus è entrato nella cellula, il suo RNA viene immediatamente tradotto in una poliproteina, detta pp1ab, codificata dal gene Replicasi, a partire da due siti chiamati "Open Reading Frames, ORFs".

(2) (3) (4) (5)



ISOLAMENTO

Isolare un virus significa separarlo dall'organismo da cui proviene con l'obiettivo di ottenerne grandi quantità in coltura per poi studiarlo.

L'isolamento del virus può essere più o meno facile e veloce a seconda della capacità infettiva del virus stesso, infatti il fatto che siamo riusciti ad isolare in modo così veloce il SARS-CoV-2 ci indica ulteriormente quanto questo virus si trasmetta in modo efficiente.

La procedura consiste in diverse fasi:

- 1) Trattamento del campione per limitare l'inattivazione del virus
- 2) Semina del campione.
- 3) Rilevazione della replicazione virale

L'isolamento del virus è solamente il primo passaggio per ottenere i campioni di virus che risultano fondamentali per:

- L'osservazione al microscopio
- Testare nuovi farmaci antivirali
- Effettuare studi sullo sviluppo di un vaccino efficace
- Riuscire a capire il percorso evolutivo

SEQUENZIAMENTO

Una volta isolato e amplificato il virus è stato ottenuto l'RNA virale che successivamente è stato sequenziato per intero (30.000 nucleotidi circa). Avere la sequenza completa dell'RNA virale ci permette di confrontare le sequenze ottenute con quelle depositate da altri laboratori di altri paesi.

Nel 1975 Frederick Sanger mette a punto un metodo per il sequenziamento del DNA (il metodo enzimatico) mentre due anni più tardi Maxam e Gilbert sviluppano un altro metodo per il sequenziamento del DNA (il metodo chimico).



Il metodo chimico, o di Maxam-Gilbert

Con questo metodo il campione viene preso e marcato all'estremità 5' con P32. I frammenti vengono divisi in 4 aliquote ciascuna destinata ad un taglio di nucleotidi specifici. Le aliquote vengono poste sul gel di poliacrilamide e fatte correre. L'operatore imprime il risultato in una lastra autoradiografica e legge il risultato. Alla fine ricostruisco la sequenza originaria andando a ricostruire la sequenza leggendo la lastra dal basso verso l'alto.

Il metodo enzimatico o di Sanger

Questo metodo si basa sull'attività polimerica 5'-3' della DNA polimerasi. Prima di tutto denaturò il DNA, ci affianco il primer che garantisce l'innescò alla DNA polimerasi. Nella provetta venivano messi quindi il frammento, un primer, la DNA polimerasi i dNTP e i ddNTP. La metodica si basa sull'utilizzo di due tipi di nucleotidi, i normali deossiribonucleotidi precursori della DNA polimerasi (dNTP), e dei nucleotidi terminatori, ossia i dideossinucleotidi o dideossinucleosidi trifosfato (ddNTP), questi nucleotidi quando vengono casualmente incorporati bloccano l'attività della DNA polimerasi.

L'avvento della PCR ha portato a diverse tecniche di sequenziamento automatico che ha permesso un grande accorciamento di tempi.

1. reazione di polimerizzazione in provetta;
2. nel sequenziatore, corsa sul gel e analisi)

Introduzione al sistema immunitario

Per sistema immunitario si intende l'insieme di elementi cellulari con il ruolo di riconoscimento ed eliminazione delle sostanze estranee (non-self) all'organismo

Linfociti.

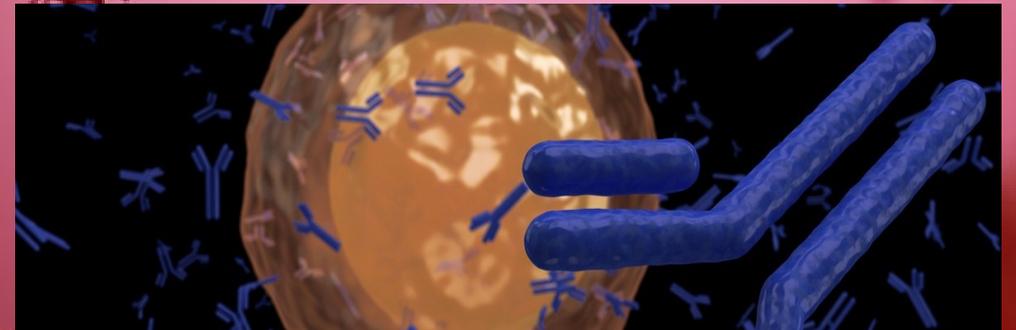
Sono le cellule fondamentali e circolano costantemente nel sangue, nella linfa e negli organi linfatici. L'azione di difesa complessiva dei linfociti è chiamata risposta immunitaria. Essa consiste in tre fasi fondamentali:

- il **riconoscimento** da parte dei linfociti dell'agente invasore, l'**antigene**
- la **risposta**, ovvero l'attacco
- la **memorizzazione** dell'invasore per impedire futuri attacchi.

Gli anticorpi riconoscono solo una piccola porzione dell'antigene che prende il nome di epitopo o determinante antigenico.

In realtà non tutti gli antigeni provocano una risposta immunitaria poichè alcuni antigeni, spesso ormoni steroidei, non riescono a provocare una risposta immunitaria: questi antigeni incompleti sono detti, apteni e possono provocare una risposta immunitaria solo in seguito ad un legame con proteine carrier.

(9)



Tecniche Diagnostiche

La prima fase dell'epidemia di coronavirus ci ha fatto capire quanto sia importante riuscire a fare tempestivamente diagnosi di Covid-19, anche nelle persone che non presentano sintomi.

La diagnosi di infezione da SARS CoV-2 quindi è fondamentale per:

1) confermare che un soggetto (precedentemente sospetto) sia effettivamente infettato col virus

2) Individuare coloro che sono portatori del virus anche (e soprattutto) se asintomatici.

Quindi la diagnosi ha una rilevante importanza sia per la singola persona che per la collettività

Il metodo più usato per confermare l'infezione da SARS-CoV-2 è il **tampone faringeo o nasale**.

Il saggio di real-time RT-PCR, che consiste in un'amplificazione del genoma è il metodo più affidabile per rilevare anche concentrazioni molto basse di RNA virale

Test qualitativi (o rapidi):

questi tipi di test si basano sulla tecnica di immunocromatografia e danno una risposta in tempi molto brevi di positività o negatività. Stabiliscono quindi se una persona è entrata o meno in contatto con il virus

Test quantitativi:

Questa tipologia invece permette di conoscere la quantità di anticorpi prodotta da un individuo, con questa metodica quindi è possibile seguire anche la variazione della produzione anticorpale effettuando prelievi nel tempo. Attualmente le metodiche validate per la ricerca quantitativa degli anticorpi diretti verso SARS-CoV-2 sono la chemiluminescenza (CLIA) e la metodica ELISA. (10)

Test sierologici

I **test sierologici** servono per andare a ricercare nel sangue del paziente gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario.

I test sierologici ci devono assicurare per quanto riguarda :

1) la sensibilità

2) la specificità

Sono, ad oggi, disponibili diversi tipi di test che utilizzano, per la rilevazione di anticorpi anti-SARS CoV-2:

•Gli anticorpi IgM

•Gli anticorpi IgA

•Gli anticorpi IgG (8)

ELISA

Il **test ELISA** si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica che enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'aggiunta del substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con lo spettrofotometro.

ELISA diretto o a "sandwich"

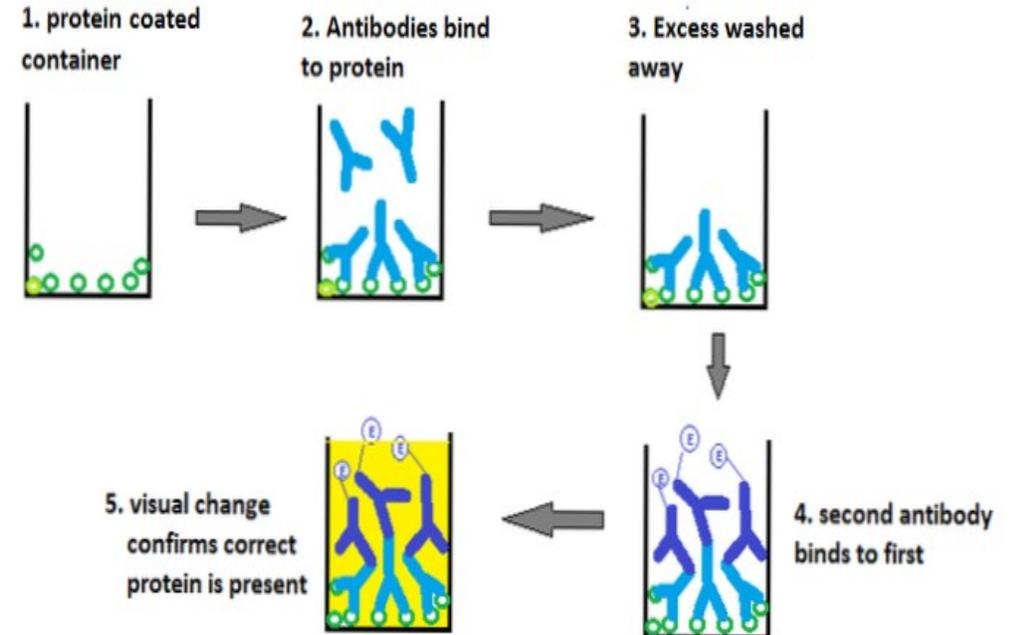
- ❑ Fissaggio al substrato dell'**anticorpo primario** specifico per l'antigene da ricercare;
- ❑ Lavaggio per eliminare l'eccesso di anticorpo;
- ❑ Aggiunta del campione da saggiare per la presenza o meno dell'**antigene**;
- ❑ Lavaggio per togliere antigeni in eccesso;
- ❑ Aggiunta di un **anticorpo secondario specifico** per l'antigene **coniugato a un enzima specifico** (perossidasi o fosfatasi alcalina). Se l'antigene è presente l'anticorpo si legherà selettivamente al complesso anticorpo-antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test;
- ❑ Lavaggio con soluzione tampone dell'eccesso;
- ❑ Aggiunta del substrato per l'enzima coniugato all'anticorpo che porterà alla formazione di un prodotto colorato;

In linea generale, lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e **l'intensità della colorazione è semi-quantitativa** e misurabile attraverso l'uso dello spettrofotometro.

ELISA indiretto

- Fissaggio al substrato dell'**antigene** specifico per l'anticorpo che vogliamo misurare;
- Lavaggio per eliminare l'eccesso di antigene;
- Aggiunta del siero (campione) che si vuole saggiare per ricercare la presenza di **anticorpi**;
- Lavaggio per eliminare l'eccesso di anticorpi che non hanno legato l'antigene;
- Aggiunta di un **anti-anticorpo**, cioè un **anticorpo secondario marcato con un enzima** che leggerà, se presenti, gli anticorpi nel campione;
- Lavaggio per eliminare eventuali anticorpi non legati al complesso;
- Aggiunta del **substrato** dell'enzima con cui è stato marcato l'anti-anticorpo: un cambiamento di colore indica la presenza degli anticorpi nel siero (campione), visto che l'enzima usato agisce sul substrato modificandolo, in maniera che assorba la luce e risulti colorato;

Indirect ELISA

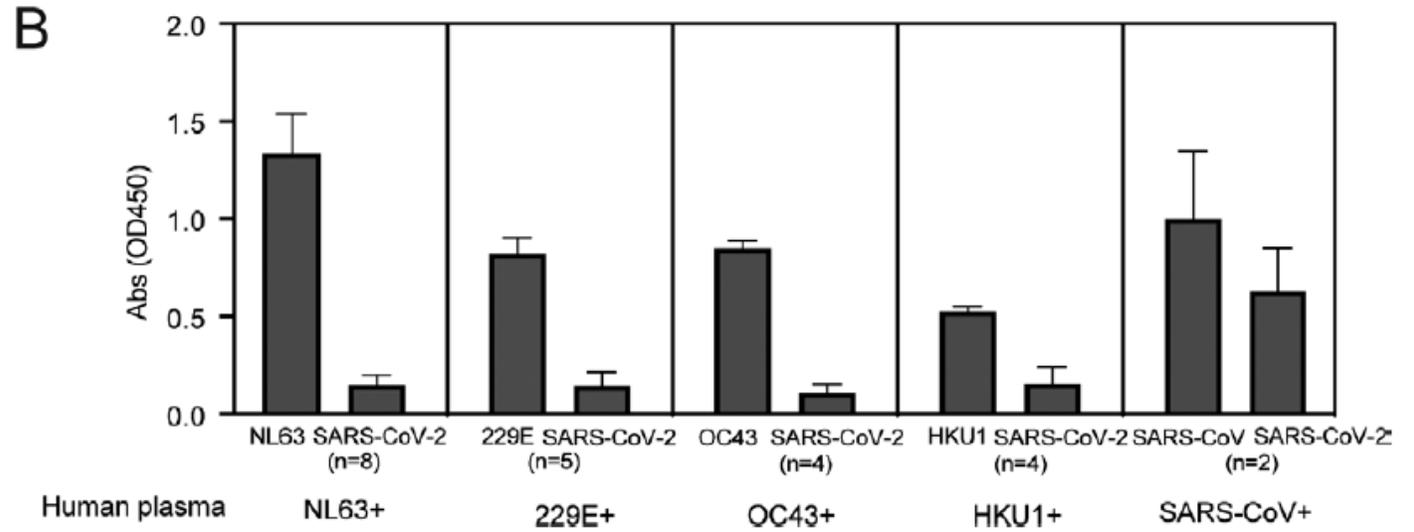


<http://inmunoanalisi.blogspot.com/2016/03/radioinmunoanalisi.html>

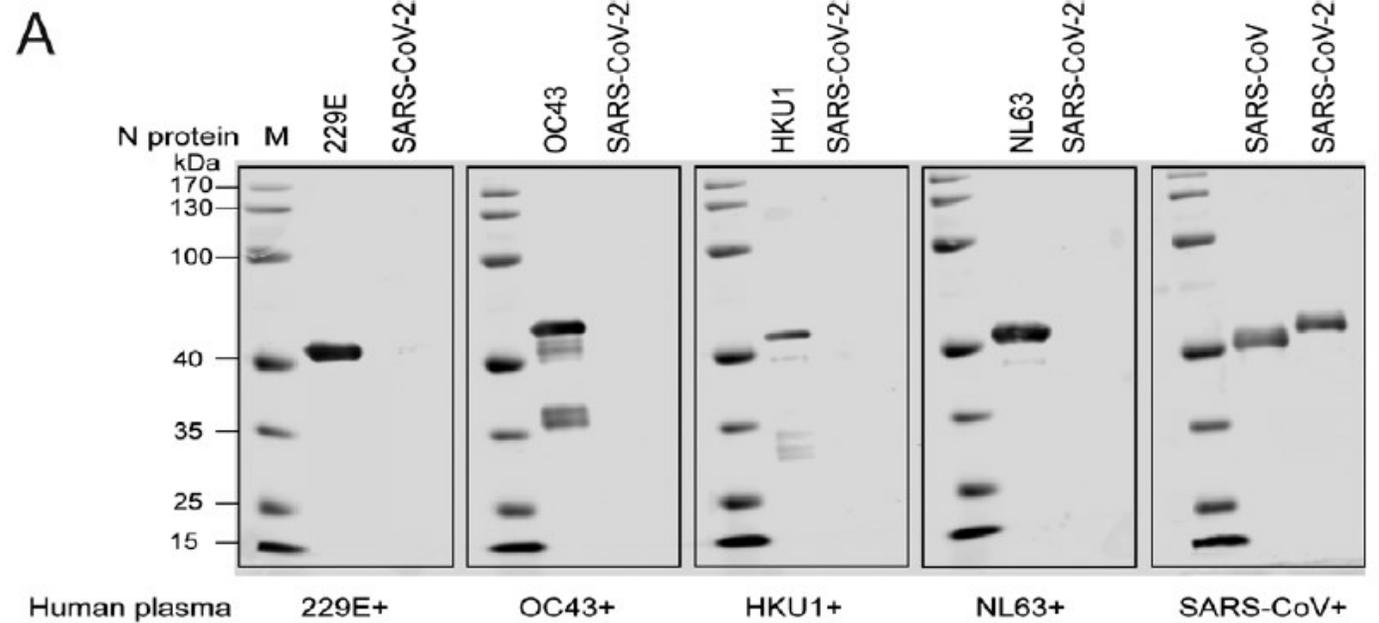
RISULTATI:

Reazioni crociate

Per valutare possibili reazioni crociate della proteina N del SARS-CoV-2 ed altri coronavirus umani è stata esaminata la reattività della proteina N del SARS CoV-2 e sangue umano con anticorpi contro NL63, 229E, OC43, HKU1 e SARS CoV usando le tecniche di Western blot ed ELISA. Le analisi tramite Western Blot hanno mostrato la non presenza di reazioni crociate del SARS CoV-2 con plasma umano positivo per anticorpi IgG contro NL63, 229E, OC43 e HKU1. Mentre è stata dimostrata una forte reazione crociata, anche grazie all'utilizzo di ELISA, tra gli anticorpi per le proteine N tra SARS CoV-2 e SARS CoV. (11)(12)



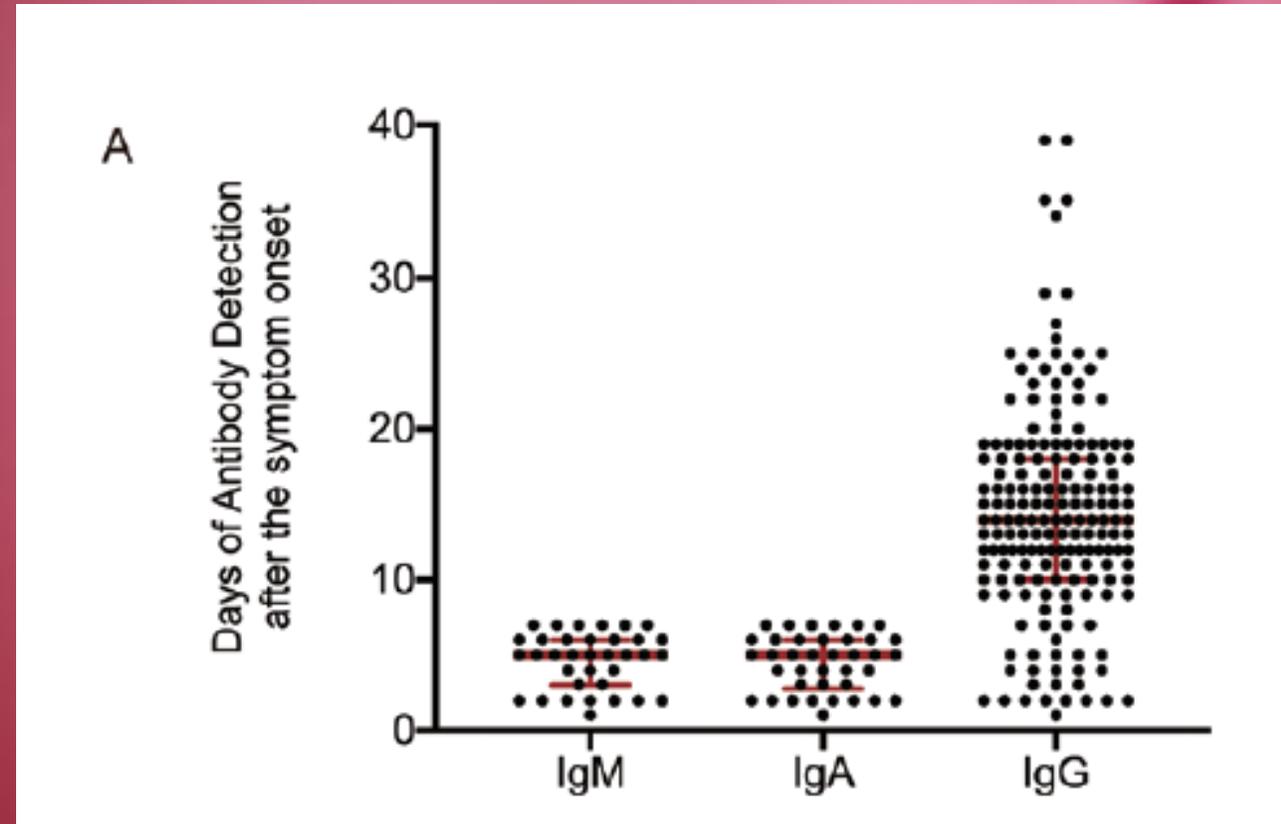
<file:///C:/Users/Utente/Downloads/Sars%20Cov%202.pdf>



Le analisi hanno dimostrato che il gene del nucleocapside del SARS-CoV-2 ha un'omologia della sequenza amminoacidica del 46.1%, 27.6%, 26.5%, 20.0%, e 19.1% con MERS-CoV, HKU1, OC43, NL63, e 229E, rispettivamente. Mentre è stata dimostrata un'omologia del 90.5 % con il SARS-CoV e ciò potrebbe anche spiegare le reazioni crociate. Comunque risulta altamente improbabile che le reazioni crociate vadano ad interferire con i risultati, visto che misurando l'attività degli IgM risulta altamente improbabile che duri così a lungo nel tempo (poiché l'epidemia di SARS CoV c'è stata nel 2002). In secondo luogo, il numero di infezioni di SARS CoV è stato limitato a 8096 casi in tutto il mondo.

L'aggiunta del test per le IgM ci fornisce, sicuramente, una migliore sensibilità rispetto ad un'analisi solitaria di PCR. È importante ricordare che circa il 22% dei pazienti.

La durata media del rilevamento di anticorpi IgM e IgA è stata di 5 giorni (con una oscillazione tra (3/6) mentre le IgG sono state rilevate 14 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. (11)(12)



Limiti, conoscenze e futuro

Diversi laboratori ufficiali di riferimento dell'OMS si sono specializzati nella ricerca e nello sviluppo di protocolli standard per diversi obiettivi genetici, come ad esempio:

- Ospedale universitario della Charité: E, N;
- CDC cinese: ORF1 e nucleoproteina (N)
- CDC americano: tre bersagli nel gene N
- Istituto nazionale di malattie infettive giapponese: Proteina Spike

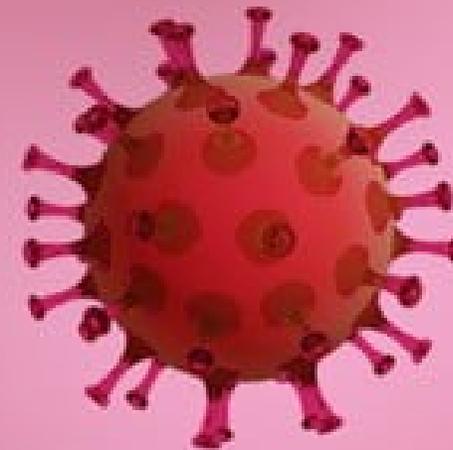
La ricerca continua anche perchè il futuro di questo virus è molto incerto, dato che ancora non è stata valutata del tutto la velocità e la frequenza di mutazioni che potrebbero riguardare il SARS-CoV-2. Il limite principale per quanto riguarda la diagnosi rimane nell'organizzazione del sistema sanitario nazionale di diversi paesi. In Germania infatti fino al 20 marzo 2020 erano stati effettuati più di 160.000 test a settimana, mentre nella vicina Francia meno di 4.000. Ciò sta ad indicare i diversi investimenti che i singoli stati si possono permettere di effettuare nella sanità. (13) (14)

Bibliografia

Lavori scientifici a supporto

- 1. "Rapid risk assessment: Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update"
- 2. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The nonstructural proteins directing Coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv Virus Res.* 2016
- 3. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses *Annu Rev Virol.* 2015
- 4. Masters PS. The molecular biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006
- 5. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARSCoV-2 transcriptome.
- 6. Giamarellos-Bourboulis et al., "Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure" *Cell Host & Microbe*, 2020.
- 7. Jia, X. et al., "Two Things about COVID-19 Might Need Attention", Preprints 2020
- 8. Come si diagnostica il Covid-19: tampone o test sierologico? Dott. Giovanni Caso
- 9. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.
- 10. Patel R., Babady E., Theel E.S., Storch G.A., Pinsky B.A., St. George K., Smith T.C., Bertuzzi S. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio* Mar 2020, 11 (2) e00722-20.
- 11. Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* Peter J. Stopa, Michael A. Bartos
- 12. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19) Li Guo, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, a De Chang,, a Fan Yang, Charles S. Dela Cruz, Yingying Wang, Chao Wu, Yan Xiao, Lulu Zhang, Lianlian Han, Shengyuan Dang, Yan Xu, 7 Qi-Wen Yang, Sheng-Yong Xu, 8 Hua-Dong Zhu, Ying-Chun Xu, Qi Jin, Lokesh Sharma, Linghang Wang,, b and Jianwei Wang
- 13. [Coronavirus: la France pratique-t-elle assez de tests?](#), su *Le Monde.fr*, 20 marzo 2020. URL consultato il 24 marzo 2020.
- 14. [Laboratory guidance, OMS](#). URL consultato il 4 marzo 2020.

pngtree.com



Immagini tratte da:

FREEPIK.COM

PNGTREE.COM

WIKIPEDIA

L'arrivo dell'epidemia del nuovo Coronavirus (nominato prima "novel Coronavirus 2019 o 2019-nCoV, ora SARS-CoV-2, da Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) nel tardo Dicembre del 2019 rappresenta ancora una grande sfida per la comunità scientifica. Si sta compiendo uno sforzo enorme per raccogliere il maggior numero di informazioni nel minor tempo possibile ed, infatti, da Gennaio 2020 ad oggi, sono stati pubblicati circa 10000 articoli scientifici sull'argomento.

Il SARS-CoV-2 è il virus alla base dell'attuale pandemia, fino a pochi mesi fa un totale sconosciuto, mentre ora, grazie al fatto che una grande parte della ricerca mondiale è stata volta sul virus e sui temi a esso collegati. E' un virus respiratorio appartenente alla grande famiglia dei coronavirus, che possono rendersi responsabili di diverse patologie: dal comune raffreddore a sindromi respiratorie più serie. Nel dicembre 2019 a Wuhan, in Cina, è stato isolato il nuovo virus e la sequenza virale di questo nuovo Coronavirus ha un'omologia di circa il 76% rispetto al virus che causò la pandemia di SARS nel 2002/2003.

Non esistono vaccini disponibili e ci sono poche evidenze a supporto dell'efficacia di potenziali agenti terapeutici. Inoltre, presumibilmente, la popolazione non possiede alcuna immunità pregressa contro il nuovo coronavirus, quindi tutti sono considerati suscettibili. Il range di sintomi con cui si presenta l'infezione da COVID-19 va da nessun sintomo (asintomatico) a polmonite grave; la presentazione con malattia grave può portare a morte. Sebbene la maggior parte dei casi (80%) includa infezioni respiratorie lievi e polmoniti, le forme di malattia più gravi sono più comuni tra gli anziani con altre patologie croniche concomitanti. Ad oggi, questi gruppi a rischio rappresentano la maggior parte dei casi di malattia grave e decesso.

Nella situazione attuale dell'epidemia la ricerca sulla maggior parte delle popolazioni colpite o sui gruppi di rischio è fondamentale per migliorare la gestione dei casi per la prevenzione di esiti gravi e fatali. È importante comprendere l'efficienza delle diverse modalità di trasmissione (ad esempio droplets VS particelle aerotrasportate, superfici o oro-fecali).

Gli studi molecolari potrebbero far luce sulla dinamica della malattia e sull'evoluzione e la diffusione del COVID-19. Le misure di prevenzione e controllo comprendono lo sviluppo di vaccini e opzioni di trattamento antivirale, che hanno anche un'implicazione sulla gestione dei casi e delle misure cliniche. Attualmente sono in corso diversi studi clinici per testare diversi prodotti e sostanze farmaceutiche. I studi che si effettuano per studiare e cercare di controllare la situazione a livello globale richiedono test sierologici sensibili e affidabili, che sono attualmente in fase di sviluppo.

(1)

SARS CoV-2

Breve storia sui Coronavirus

Orthocoronavirinae è una sottofamiglia di virus, noti anche come coronavirus, della famiglia Coronaviridae. Sono suddivisi in diversi generi e comprendono gruppi filogeneticamente compatti di RNA avvolto, a senso positivo, a singolo filamento e con un nucleocapside di simmetria elicoidale. Il nome Coronavirus deriva dal greco, dove il termine corona si riferisce al fatto che se osservati al microscopio elettronico, si possono notare delle glicoproteine superficiali che si dispongono in una forma che ricorda una corona.

La scoperta dei primi Coronavirus ad interesse umano risale agli anni sessanta in pazienti con comune raffreddore. Negli anni a venire sono stati isolati altri virus che successivamente sono stati inclusi nella famiglia Coronavirus.

Non esistono vaccini o farmaci virali considerati validi dalla comunità scientifica per attuare una prevenzione nei confronti di questi virus. I coronavirus sono comuni in molte specie animali (come i pipistrelli e i cammelli) ma in alcuni casi, anche se raramente, possono evolversi e infettare l'uomo e causare epidemie.

Ad oggi sono conosciuti 7 ceppi in grado di infettare gli umani:

- 1) Coronavirrus umano 229E
- 2) Coronavirus umano OC43
- 3) Coronavirus umano NL63
- 4) Coronavirus umano HKU1
- 5) Coronavirus da sindrome respiratoria acuta grave
- 6) Novel Coronavirus 2012
- 7) Coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave

Negli esseri umani la trasmissione avviene principalmente attraverso le goccioline respiratorie. Sebbene i virus respiratori siano trasmissibili solitamente quando il soggetto malato presenta anche i sintomi, il coronavirus SARS-CoV-2 può diffondersi anche in caso di contatto ravvicinato con un paziente infetto ma asintomatico.

Struttura e genoma

Come già scritto nell'introduzione SARS-CoV-2 è per il 76% identico al virus della SARS 2002. Inoltre condividono anche molte altre caratteristiche biologiche (come il meccanismo e le proteine usate per entrare nella cellula ospite). Nonostante le tante somiglianze l'ultimo virus ha manifestazioni cliniche ed epidemiologiche molto diverse e questo è dovuto al meccanismo di replicazione e trascrizione.

La morfologia dei coronavirus è rotondeggiante, e partendo dall'interno verso l'esterno si possono riconoscere varie componenti del virus:

- L'ACIDO NUCLEICO: l'intero genoma è rappresentato da un singolo filamento di RNA a elica positiva. L'RNA codifica per 7 proteine virali ed è associato ad alcune proteine (proteine N) che aumentano la stabilità dell'acido nucleico
- L'ENVELOPE : è la membrana del virus che viene acquisita al momento della fuoriuscita dalla cellula ospite, dove è avvenuta la replicazione.
- PROTEINA E: è una proteina espressa dal genoma virale e va ad aiutare il virus nella fase di attacco alla cellula bersaglio
- DIMERO (HE) EMAGGLUTININA-ESTERASI: è una proteina che fa parte del rivestimento ed aiuta il virus nel momento di rilascio all'interno della cellula bersaglio
- PROTEINA M: è una proteina di membrana che interagisce con il complesso RNA-proteine
- GLICOPROTEINA S ("spike"): queste glicoproteine unite ad unità di 3 formano un trimero, e i trimeri formano delle strutture che assomigliano a una corona. La differenza principale tra questo nuovo Coronavirus e il virus della SARS sembrano essere dovute proprio a queste proteine spike. Infatti questa glicoproteina è quella che determina la specificità del virus per le cellule del tratto respiratorio (infatti è in grado di legare il recettore ACE-2 espresso dalle cellule dei capillari dei polmoni)

I Coronavirus posseggono il genoma più grande - circa 30 KB – di tutti i virus a RNA. Una volta che il Coronavirus è entrato nella cellula, il suo RNA viene immediatamente tradotto in una poliproteina gigante, detta pp1ab, codificata dal gene Replicasi, a partire da due siti chiamati "Open Reading Frames, ORFs".

Pp1ab è tagliato in 16 proteine più piccole non strutturali (nps). Rilevante è il fatto che 2 delle proteine prodotte precocemente dall'RNA virale – nps3 e 5 – servono al taglio di pp1ab. Tutte e 16 le nps servono alla replicazione dell'RNA genomico (gRNA) e alla produzione dei differenti RNA messaggeri (mRNA) sub-genomici virali (sgRNA). A valle del gene replicasi, è contenuta l'informazione per la produzione delle proteine strutturali – Spike, Envelope, M, N , che "impacchettano" il genoma virale e sono necessarie alla produzione di nuovi virioni - e di 6 proteine accessorie (3a, 6, 7a, 7b, 8, 10) il cui ruolo non è ancora ben noto.

Perciò è un filamento singolo "positivo", ossia segue una direzione cosiddetta "5'→3'". La replicazione dell'RNA, ossia la produzione di più copie del genoma virale, è un processo continuo. Il nuovo gRNA viene prodotto grazie alla sintesi di un filamento intermedio "negativo", che serve da stampo per il nuovo gRNA positivo.

La sintesi dell'RNA di CoV2 è, sostanzialmente, identica a quella degli altri CoV umani.

Tuttavia, Le caratteristiche di alcuni dei suoi sgRNA suggeriscono meccanismi di sintesi alternativi. L'intero pannello degli mRNA di CoV-2 è espresso più del patrimonio degli mRNA della cellula ospite, come se, in qualche modo, l'espressione dei geni cellulari venisse spenta.

Modificazioni dell'RNA

In realtà le cose sono un po più complicate viste le modifiche epigenetiche

Le modificazioni epigenetiche sono modifiche chimiche che possono essere apportate ai genomi e anche alle proteine. I complessi multiproteici, definiti “macchine epigenetiche” sono i responsabili di queste modifiche e vengono attivati dagli stimoli intracellulari, ambientali, meccanici ecc.

Queste modificazioni cambiano le caratteristiche di un genoma, ad esempio dando istruzioni su quali geni devono essere accesi o spenti, in modo che la cellula possa rapidamente rispondere a segnali interni o esterni. Tra le modificazioni più note conosciamo quelle a carico del DNA e degli istoni associati, che nell'insieme formano la cromatina, quindi, i cromosomi, all'interno della cellula. Anche l'RNA può essere modificato.

Queste possono essere rappresentate dall' aggiunta di gruppi metilici, dalla perdita di gruppi amminici dalle basi, o aggiunta di nucleotidi. Sono state identificate modificazioni dell'RNA in SARS-CoV-2, ma la loro natura non è stata ancora identificata, né tantomeno il loro ruolo. Tuttavia, si pensa possano avere un ruolo nel controllo della stabilità dei vari sgRNA o potrebbero contribuire ad eludere il sistema immunitario dell'ospite.

Tante caratteristiche biologiche di SARS-CoV-2 sono sovrapponibili a quelle degli altri CoV. Nonostante ciò, il meccanismo di sintesi del suo RNA è molto complesso e, in alcuni casi, sfugge ai meccanismi canonici. Specificamente, l'alta frequenza di fusioni insolite potrebbe produrre varianti virali, un punto che merita particolare attenzione se pensiamo ai meccanismi di farmaco-resistenza ed elusione del sistema immunitario che CoV-2 potrebbe adottare per sopravvivere e propagarsi.

Le modificazioni dell'RNA potrebbero, anch'esse, svolgere un ruolo in questi ambiti. Queste caratteristiche andrebbero studiate in tessuti animali, dove è attiva una risposta immunitaria. Inoltre, sarebbe interessante valutare se simili modificazioni dell'RNA si riscontrassero in altri CoV, per comprendere meglio le proprietà di SARS-CoV-2.

COVID-19

La Malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2, è una malattia infettiva respiratoria causata dal nuovo Coronavirus.

Le modalità di trasmissione non sono ancora del tutto chiare ma è stato confermato che il virus è in grado di passare da uomo a uomo attraverso uno stretto contatto, in particolare starnutendo o tossendo su qualcuno nel raggio di 1-2 metri. Infatti si ritiene che nella maggior parte dei casi la diffusione avvenga attraverso le goccioline respiratorie. È possibile infettarsi anche dopo aver toccato superfici o oggetti dove è presente il virus, portando poi le mani verso la bocca, il naso o gli occhi.

La diagnosi di CoVid-19 può essere formulata con il test diagnostico per SARS-CoV-2 (che consiste in una real-time PCR su campioni biologici prelevati dal paziente) oppure testando gli anticorpi (utilizzando un campione di siero sanguigno)

L'11 marzo 2020 l'OMS ha dichiarato la pandemia da SARS-CoV-2 e alla data in cui scrivo si contano più di 8.800.000 casi anche se il numero effettivo potrebbe essere più grande dato che una componente consistente della popolazione non presenta sintomi rilevanti. Inoltre il tasso apparente di letalità è del 5,3%.

Con diversi studi si è giunti alla conclusione che l'invecchiamento e l'obesità potrebbero aumentare la suscettibilità all'infezione da SARS-CoV-2 ed agli effetti dell'iper-attivazione del sistema immunitario innato indotta dal virus, in quanto la risposta infiammatoria indotta dai primi potrebbe sovrapporsi ed aumentare quella indotta dall'infezione virale

Oltre il 95% dei decessi si è verificato in persone di età superiore ai 60 anni e più del 50% di tutti i decessi riguardano persone di età pari o superiore a 80 anni. La mortalità è stata associata anche ad altre comorbidità considerate malattie legate all'invecchiamento [3]. Durante l'invecchiamento vi è un'attivazione cronica, lieve ed aspecifica della risposta infiammatoria (inflammaging), determinata dall'attivazione continua del sistema immunitario innato che non distingue più tra estraneo e proprio

(6)

Diversi studi hanno messo in correlazione l'obesità con una sintomatologia più severa ed un più alto tasso di mortalità causati da Covid-19, in accordo con quanto osservato nel caso di precedenti epidemie influenzali

Come nelle persone anziane, le persone obese presentano uno squilibrio della risposta immunitaria innata e adattativa ed uno stato d'infiammazione cronica sterile e di basso grado che sfocia nella sindrome metabolica, una disfunzione caratterizzata da ipertensione arteriosa, diabete mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari, spesso riscontrate in soggetti obesi e nel 60% dei pazienti deceduti in Italia con Covid-19. , il tessuto adiposo è a tutti gli effetti un organo endocrino che, se in eccesso, produce citochine, innescando la risposta infiammatoria.

(7)

ISOLAMENTO

Isolare un virus significa separarlo dall'organismo da cui proviene con l'obbiettivo di ottenerne grandi quantità in coltura per poi studiarlo.

Ovviamente per poterlo isolare bisogna prelevare, da un paziente infetto, un campione di sangue o saliva.

Diversi enti di ricerca in tutto il mondo hanno usato le proprie risorse per isolare e sequenziare il virus, in modo da riuscire a comprendere la complessità della risposta cellulare al virus e riuscire ad individuare i punti deboli di quest'ultimo.

La procedura di isolamento è complessa e delicata, visto che dal campione si dovrà eliminare il materiale inutile, come eventuali batteri o le cellule del paziente (poichè andrebbero ad interferire con il genoma virale)

L'isolamento del virus può essere più o meno facile e veloce a seconda della capacità infettiva del virus stesso, infatti il fatto che siamo riusciti ad isolare in modo così veloce il SARS-CoV-2 ci indica ulteriormente quanto questo virus si trasmetta in modo efficiente.

La procedura consiste in diverse fasi:

1) Trattamento del campione per limitare l'inattivazione del virus (come ad esempio la neutralizzazione del pH nel caso in cui il campione siano le urine)

2) Semina del campione (Il virus, per essere coltivato, ha bisogno di cellule, visto che il genoma non è provvisto di strutture adatte alla traduzione del

decontaminazione batterica di campioni contaminati o la

per riprodursi

osserva la formazione di placche di lisi o distruzione

cellulare e la comparsa di CPE, ossia effetti citopatici caratteristici del virus)

La coltura va mantenuta in condizioni ideali per far sì che al virus non manchi nulla

3) Rilevazione della replicazione virale (Per capire se il virus si sia replicato o meno si osserva la formazione di placche di lisi o distruzione cellulare e la comparsa di CPE, ossia effetti citopatici caratteristici del virus)

L'isolamento del virus è solamente il primo passaggio per ottenere i campioni di virus che risultano fondamentali per

•L'osservazione al microscopio (osservando le cellule al microscopio si riescono a capire alcune caratteristiche del virus)

•Testare nuovi farmaci antivirali

•Effettuare studi sullo sviluppo di un vaccino efficace

•Riuscire a capire il percorso evolutivo del virus grazie anche alle moderne tecniche di sequenziamento

SEQUENZIAMENTO

Una volta isolato e amplificato il virus è stato ottenuto l'RNA virale che successivamente è stato sequenziato per intero (30.000 nucleotidi circa). Avere la sequenza completa dell'RNA virale ci permette di confrontare le sequenze ottenute con quelle depositate da altri laboratori di altri paesi, e da una prima analisi le sequenze mostrano alcune differenze dovute alle mutazioni che avvengono nel corso dell'epidemia.

La sequenza completa e il confronto con altre sequenze dello stesso ceppo virale ci permette di studiare l'evoluzione del virus nel corso della pandemia e tracciare l'origine del virus. Il risultato ottenuto è necessario anche per la sperimentazione del vaccino.

Sequenziare significa andare a determinare la sequenza nucleotidica che compongono l'acido nucleico. Nel 1975 Frederick Sanger mette a punto un metodo per il sequenziamento del DNA (il metodo enzimatico) mentre due anni più tardi Maxam e Gilbert sviluppano un altro metodo per il sequenziamento del DNA (il metodo chimico). Queste tecniche si basano sul marcamento dei filamenti di acido nucleico, che venivano poi modificati e fatti correre su un gel di poliacrilamide, per essere poi messi a contatto con una lastra autoradiografica, l'analisi della quale dava la possibilità di andare a ricostruire la sequenza del genoma. Dopo un iniziale successo del metodo chimico, si affermò successivamente il metodo di Sanger, tanto che tutti i sequenziatori automatici rappresentano un'evoluzione del metodo di Sanger.

Il metodo chimico, o di Maxam-Gilbert

Con questo metodo il campione viene preso e marcato all'estremità 5' con P32, ossia il fosforo radioattivo. I frammenti vengono divisi in 4 aliquote ciascuna destinata ad un taglio di nucleotidi specifici. Le aliquote vengono poste sul gel di poliacrilamide e fatte correre. L'operatore imprime il risultato in una lastra autoradiografica e legge il risultato. Alla fine ricostruisco la sequenza originaria andando a ricostruire la sequenza leggendo la lastra dal basso verso l'alto. (La lastra non viene letta dall'alto verso il basso ma dal basso verso l'alto, in questa maniera si ottiene la sequenza completa del frammento in direzione 5'-3', Questa procedura è definita lettura diretta)

Il metodo enzimatico o di Sanger

Questo metodo si basa sull'attività polimerica 5'-3' della DNA polimerasi, ed è stata sviluppata alla fine degli anni 70', quando non era ancora stata creata la PCR, l'enzima era stato studiato ma non c'era un utilizzo massivo nelle tecniche di laboratorio.

La DNA polimerasi lavora andando ad estendere un primer e questo primer viene utilizzato come corto tratto di nucleotidi che si va ad attaccare al filamento singolo che deve essere sequenziato.

Prima di tutto denaturò il DNA, ci affianco il primer che garantisce l'innescò alla DNA polimerasi. Nella provetta venivano messi quindi il frammento, un primer, la DNA polimerasi i dNTP e i ddNTP.

La metodica si basa sull'utilizzo di due tipi di nucleotidi, i normali deossiribonucleotidi precursori della DNA polimerasi (dNTP), e dei nucleotidi terminatori, ossia i dideoxinucleotidi o dideoxinucleosidi trifosfato (ddNTP), questi nucleotidi quando vengono casualmente incorporati bloccano l'attività della DNA polimerasi.

Con l'avvento della PCR il metodo di sequenziamento enzimatico è diventato quello di maggiore utilizzo.

L'avvento della PCR ha portato a diverse tecniche di sequenziamento automatico che ha permesso un grande accorciamento di tempi.

(1. reazione di polimerizzazione in provetta;

2. nel sequenziatore, corsa sul gel e analisi)

Tecniche Diagnostiche

La prima fase dell'epidemia di coronavirus ci ha fatto capire quanto sia importante riuscire a fare tempestivamente diagnosi di Covid-19, anche nelle persone che non presentano sintomi.

La diagnosi di infezione da SARS CoV-2 quindi è fondamentale per:

- 1) confermare che un soggetto (precedentemente sospetto) sia effettivamente infettato col virus
- 2) Individuare coloro che sono portatori del virus anche (e soprattutto) se asintomatici.

Quindi la diagnosi ha una rilevante importanza sia per la singola persona che per la collettività

Il metodo più usato per confermare l'infezione da SARS-CoV-2 è il **tampone faringeo o nasale**. Di solito risulta positivo già 2-3 giorni dal momento dell'infezione ma va ricordato che non è un meccanismo del tutto infallibile infatti la sua capacità di individuare la presenza del virus in un paziente si aggira tra il 70% e l'80% (per questo motivo il tampone viene ripetuto più di una sola volta, anche a distanza di giorni)

Il saggio di real-time RT-PCR, che consiste in un'amplificazione del genoma è il metodo più affidabile per rilevare anche concentrazioni molto basse di RNA virale

I **test sierologici** servono per andare a ricercare nel sangue del paziente gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario.

La risposta sierologica (umorale) è caratterizzata da una fase precoce e limitata nel tempo (IgM) e da una fase più tardiva e stabile nel tempo (IgG). È ancora incerto invece il ruolo di anticorpi di classe IgA. In ogni caso i test sierologici ci devono assicurare per quanto riguarda :

- 1) la sensibilità
-ossia ridurre la capacità di determinare dei falsi positivi
- 2) la specificità
-evitare cross-reaction con altri coronavirus, tali da determinare dei falsi positivi

Sono, ad oggi, disponibili diversi tipi di test che utilizzano, per la rilevazione di anticorpi anti-SARS CoV-2.

- Gli anticorpi IgM rimangono individuabili per circa due settimane
- Gli anticorpi IgA (il cui ruolo non è stato ancora ben studiato) sembrano rimanere individuabili anche loro per circa 2/3 settimane
- Gli anticorpi IgG sono gli unici anticorpi che persistono nel tempo, e possono rimanere individuabili in circolo anche per mesi

Tutti questi periodi sono da calcolare dalla seconda settimana, dato che nella prima settimana/10 giorni il paziente non ha ancora anticorpi individuabili con gli attuali test.

In ogni caso i test sierologici non consentono, da soli, di fare una diagnosi certa ma devono essere associati ad un tampone faringeo-nasale. Comunque sono di fondamentale importanza per effettuare screening sulla popolazione o indagini sull'andamento dell'epidemia in certe zone.

Breve introduzione al sistema immunitario

Per sistema immunitario si intende l'insieme di elementi cellulari con il ruolo di riconoscimento ed eliminazione delle sostanze estranee (non-self) all'organismo

Linfociti.

Sono le cellule fondamentali e circolano costantemente nel sangue, nella linfa e negli organi linfatici. I linfociti si attivano nel caso in cui l'agente estraneo riesce a superare oltre alle barriere chimico-fisiche (pelle/mucose/saliva/lacrime/peli/ciglia) anche le barriere interne non specifiche (mastociti/fagociti).

L'azione di difesa complessiva dei linfociti è chiamata risposta immunitaria. Essa consiste in tre fasi fondamentali:

- il **riconoscimento** da parte dei linfociti dell'agente invasore, l'**antigene**;

I linfociti riconoscono l'antigene e, attivati dalla sua presenza, si differenziano in linfociti B e linfociti T

- la **risposta**, ovvero l'attacco;

I **linfociti B** proliferano in gran quantità e iniziano a produrre gli **anticorpi** che liberano in tutto il circolo sanguigno e linfatico. Gli anticorpi sono specifici, cioè diretti a neutralizzare il particolare tipo di antigene riconosciuto e, incastrandosi perfettamente con l'antigene, creano un complesso antigene-anticorpo che è facilmente aggredito e fagocitato.

I **linfociti T**, attivati a loro volta, si differenziano in **linfociti T killer** (distruzione immediata di eventuali cellule tumorali e delle cellule del corpo infettate); **linfociti T helper** (direttori delle operazioni di difesa in aiuto dei linfociti B e T killer); **linfociti T soppressori** (intervengono quando tutti gli agenti patogeni sono stati neutralizzati e bloccano l'attività del sistema immunitario).

L'azione dei linfociti B e T killer neutralizza l'invasione e i resti di questa lotta saranno fagocitati ed eliminati

- la **memorizzazione** dell'invasore per impedire futuri attacchi.

Durante l'invasione, alcuni linfociti T e B si trasformano rispettivamente in **linfociti B memoria** e **linfociti T memoria**. Essi restano per un tempo più o meno lungo nel sangue, pronti a riconoscere immediatamente l'antigene per cui sono stati attivati e a scatenare la produzione degli anticorpi specifici. La malattia quindi verrà riconosciuta e distrutta immediatamente. Si dice allora che l'organismo ha acquisito l'**immunità** verso quella specifica malattia. (L'immunocompetenza è la capacità dell'individuo a manifestare una risposta immune ossia la produzione di anticorpi, quando le cellule del sistema immunitario sono esposte ad antigeni)

. Gli anticorpi riconoscono solo una piccola porzione dell'antigene che prende il nome di epitopo o determinante antigenico.

In realtà non tutti gli antigeni provocano una risposta immunitaria poiché alcuni antigeni, spesso ormoni steroidei, non riescono a provocare una risposta immunitaria: questi antigeni incompleti sono detti, apteni e possono provocare una risposta immunitaria solo in seguito ad un legame con proteine carrier.

(9)

Test sierologici

Come già abbiamo detto i test sierologici permettono di valutare la presenza, e quindi lo sviluppo da parte del nostro sistema immunitario, di anticorpi in risposta all'infezione da SARS-CoV-2. Questi test si possono sostanzialmente suddividere in due grandi categorie:

Test qualitativi (o rapidi): questi tipi di test si basano sulla tecnica di immunocromatografia e danno una risposta in tempi molto brevi di positività o negatività. Stabiliscono quindi se una persona è entrata o meno in contatto con il virus

Test quantitativi: Questa tipologia invece permette di conoscere la quantità di anticorpi prodotta da un individuo, con questa metodica quindi è possibile seguire anche la variazione della produzione anticorpale effettuando prelievi nel tempo. Attualmente le metodiche validate per la ricerca quantitativa degli anticorpi diretti verso SARS-CoV-2 sono la chemiluminescenza (CLIA) e la metodica ELISA. Questi test dosano in maniera specifica la quantità di anticorpi prodotti. (Sono metodi automatizzabili e permettono quindi di effettuare moltissimi test con tempi di risposta abbastanza brevi: al massimo 1 o 2 giorni)

Sia i test qualitativi che quelli quantitativi ricercano gli anticorpi (immunoglobuline) IgM e IgG.

Per i test qualitativi non siamo in grado di definire il livello di accuratezza poiché hanno grandi limitazioni in base al cut-off definito (ossia la soglia che stabilisce il limite tra positività e negatività) mentre i test quantitativi hanno un elevato grado di affidabilità e accuratezza.

(10)

ELISA

Il test non rapido con metodica ELISA ha una specificità di oltre il 95% e ci permette di riconoscere la quantità e il tipo di anticorpo prodotto da un individuo e di seguirne l'evoluzione nel tempo. Il test con metodica ELISA è automatizzato ed è molto più preciso rispetto al test qualitativo.

La presenza di anticorpi IgM indica un'infezione molto recente o addirittura attuale

La presenza di anticorpi IgG invece indica un'infezione passata e quindi un avvenuto contatto con il virus.

ELISA sta per enzyme-linked immunosorbent assay (ossia saggio immuno-assorbente legato ad un enzima). È un test immunenzimatico in cui l'analita (sostanza da analizzare) si lega ad un'altra. Lo scopo finale del test è quello rilevare (sia qualitativamente che quantitativamente) la presenza di una sostanza specifica all'interno di un campione.

L'**immunochimica** è una disciplina immunologica che si prefigge di studiare gli **antigeni**, gli **anticorpi** e l'**interazione antigene-anticorpo**.

L'antigene è quella sostanza che, in opportune condizioni, è in grado di indurre la formazione di uno o più anticorpi, reagendo specificatamente con questi. D'altra parte, gli anticorpi sono sostanze di natura glicoproteica definiti anche come immunoglobuline o gamma globuline. La produzione di anticorpi si ottiene per differenziazione delle plasmacellule a seguito dell'azione della risposta immunitaria.

L'interazione che si instaura tra antigene e corrispondente anticorpo porta alla formazione di quello che viene definito come **immunocomplesso** (la natura del legame è di tipo non covalente e reversibile). L'analita o gli anticorpi, sono marcati con una sostanza definita **tracciante** che permette il rilevamento e può essere un **radioisotopo**, un **composto fluorescente** o un **enzima**.

La specificità delle reazioni antigene-anticorpo e la sensibilità dei "marcatori" possono essere combinate insieme per compiere un "**dosaggio immunologico**", ossia quantificare con precisione una sostanza antigenica. La tecnica più usata è il **dosaggio radioimmunologico (RIA)**, in cui il tracciante è costituito da un isotopo. Quando, invece, il tracciante è costituito da un enzima, si parla di **dosaggi immunoenzimatici (EIA)**.

Saggio ELISA

Il **test ELISA** si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica che enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'aggiunta del substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con lo spettrofotometro.

ELISA diretto o a "sandwich"

Nel test ELISA diretto, l'antigene è adeso alla base del supporto solido e la sua presenza può essere rilevata attraverso l'utilizzo di un anticorpo marcato con un enzima che, se fatto reagire con un opportuno substrato, permette l'osservazione di un complesso (prima incolore) che adesso produrrà una colorazione apprezzabile.

Analizzando più da vicino il metodo diretto a sandwich, per determinare la presenza di un determinato antigene in un campione biologico, è necessario seguire delle fasi consequenziali:

- Fissaggio al substrato dell'**anticorpo primario** specifico per l'antigene da ricercare;
- Lavaggio per eliminare l'eccesso di anticorpo;
- Aggiunta del campione da saggiare per la presenza o meno dell'**antigene**;
- Lavaggio per togliere antigeni in eccesso;
- Aggiunta di un **anticorpo secondario specifico** per l'antigene **coniugato a un enzima specifico** (perossidasi o fosfatasi alcalina). Se l'antigene è presente l'anticorpo si legherà selettivamente al complesso anticorpo-antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test;
- Lavaggio con soluzione tampone dell'eccesso;
- Aggiunta del substrato per l'enzima coniugato all'anticorpo che porterà alla formazione di un prodotto colorato;

In linea generale, lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e **l'intensità della colorazione è semi-quantitativa e misurabile** attraverso l'uso dello spettrofotometro.

ELISA indiretto

La procedura implica l'uso di un anticorpo secondario marcato che sia in grado di riconoscere la regione costante dell'anticorpo primario, precedentemente incubato in fase solida. In questa metodica, a differenza delle precedenti descritte, è importante determinare la presenza di un determinato anticorpo.

I passaggi sono i seguenti:

- Fissaggio al substrato dell'**antigene** specifico per l'anticorpo che vogliamo misurare;
- Lavaggio per eliminare l'eccesso di antigene;
- Aggiunta del siero (campione) che si vuole saggiare per ricercare la presenza di **anticorpi**;
- Lavaggio per eliminare l'eccesso di anticorpi che non hanno legato l'antigene;
- Aggiunta di un **anti-anticorpo**, cioè un **anticorpo secondario marcato con un enzima** che legherà, se presenti, gli anticorpi nel campione;
- Lavaggio per eliminare eventuali anticorpi non legati al complesso;
- Aggiunta del **substrato** dell'enzima con cui è stato marcato l'anti-anticorpo: un cambiamento di colore indica la presenza degli anticorpi nel siero (campione), visto che l'enzima usato agisce sul substrato modificandolo, in maniera che assorba la luce e risulti colorato;

Risultati

Per valutare possibili reazioni crociate (Le reazioni crociate avvengono quando gli anticorpi di uno specifico antigene riconoscono e inducono reazioni immunitarie di tipo allergico a fronte di un allergene proveniente da un'altra specie) della proteina N del SARS-CoV-2 ed altri coronavirus umani è stata esaminata la reattività della proteina N del SARS CoV-2 e sangue umano con anticorpi contro NL63, 229E, OC43, HKU1 e SARS CoV usando le tecniche di Western blot ed ELISA. Le analisi tramite Western Blot hanno mostrato la non presenza di reazioni crociate del SARS CoV-2 con plasma umano positivo per anticorpi IgG contro NL63, 229E, OC43 e HKU1. Mentre è stata dimostrata una forte reazione crociata, anche grazie all'utilizzo di ELISA, tra gli anticorpi per le proteine N tra SARS CoV-2 e SARS CoV.

Inoltre, le analisi hanno dimostrato che il gene del nucleocapside del SARS-CoV-2 ha un omologia della sequenza amminoacidica del 46.1%, 27.6%, 26.5%, 20.0%, e 19.1% con MERS-CoV, HKU1, OC43, NL63, e 229E, rispettivamente. Mentre è stata dimostrata un'omologia del 90.5 % con il SARS-CoV e ciò potrebbe anche spiegare le reazioni crociate. Comunque risulta altamente improbabile che le reazioni crociate vadano ad interferire con i risultati, visto che misurando l'attività degli IgM risulta altamente improbabile che duri così a lungo nel tempo (poichè l'epidemia di SARS CoV c'è stata nel 2002). In secondo luogo, il numero di infezioni di SARS CoV è stato limitato a 8096 casi in tutto il mondo.

L'aggiunta del test per le IgM ci fornisce, sicuramente, una migliore sensibilità rispetto ad un'analisi solitaria di PCR. È importante ricordare che circa il 22% dei pazienti.

La durata media del rilevamento di anticorpi IgM e IgA è stata di 5 giorni (con una oscillazione tra (3/6) mentre le IgG sono state rilevate 14 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi.

(11)(12)

Limiti, conoscenze e futuro delle tecniche di laboratorio

Diversi laboratori ufficiali di riferimento dell'OMS si sono specializzati nella ricerca e nello sviluppo di protocolli standard per diversi obiettivi genetici, come ad esempio:

- Ospedale universitario della Charitè: E, N;
- CDC cinese: ORF1 e nucleoproteina (N)
- CDC americano: tre bersagli nel gene N
- Istituto nazionale di malattie infettive giapponese: Proteina Spike

La ricerca continua anche perchè il futuro di questo virus è molto incerto, dato che ancora non è stata valutata del tutto la velocità e la frequenza di mutazioni che potrebbero riguardare il SARS-CoV-2. Il limite principale per quanto riguarda la diagnosi rimane nell'organizzazione del sistema sanitario nazionale di diversi paesi. In Germania infatti fino al 20 marzo 2020 erano stati effettuati più di 160.000 test a settimana, mentre nella vicina Francia meno di 4.000. Ciò sta ad indicare i diversi investimenti che i singoli stati si possono permettere di effettuare nella sanità.

(13) (14)