Dipartimento di
Medicina clinica,
sanità pubblica,
scienze della vita e dell'ambiente

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITA' PUBBLICA, SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Dottorato di Ricerca in SCIENZE DELLA SALUTE E DELL'AMBIENTE

XXXIV ciclo

Titolo della tesi

"Studio della risposta anticorpale alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 in una popolazione di operatori sanitari di una ASL del Centro Italia"

SSD MED 44

Dottoranda

Dott.ssa Claudia Cipollone

Coordinatrice del Corso

Prof.ssa Maria Grazia Cifone

Tutor

Prof.ssa Leila Fabiani

Prof.ssa Serena Bianchi

a.a. 2020/2021

A Matteo

sei tutti i colori che vedo

A Cinzia e Stefano

le mie persone nel mondo

A mamma e papà

vi amo immensamente

1. Introduzione	***pag.1***
1.1 Inquadramento storico: SARS, MERS, SARS-CoV-2	***pag.1***
1.2 Meccanismi di trasmissione e patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2	***pag.4***
1.2.1 Le caratteristiche di SARS-CoV2	***pag.4***
1.2.2 Meccanismi di trasmissione	***pag.6***
1.2.3 Patogenesi: la tempesta citochinica	***pag.9***
1.3 La diagnosi	***pag.13***
1.3.1 Test di amplificazione degli acidi nucleici	***pag.13***
1.3.1.1 Test basati sull'utilizzo della PCR:	***pag.14***
RT PCR	***pag.14***
ddPCR (Droplet Digital PCR)	***pag.19***
n PCR (Nested PCR)	***pag.20***
1.3.1.2 "Isothermal Nucleic Acid Amplification-Based Tests"	***pag.20***
1.3.1.3 CRISPR/Cas-Based Tests	***pag.20***
1.3.1.4 DNA-Microarray Based Tests	***pag.21***
1.3.1.5 Test basati sul sequenziamento	***pag.22***
1.3.2 Tecnologie "Protein-based": sierologia e test antigenici	***pag.22***
1.3.2.1 NIIA (Non-Isotopic Immunoassay)	***pag. 25***
CLIA (Chemiluminescence Immunoassays)	***pag.25***
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	***pag.27***
1.3.2.2 FIA (Fluorescence Immunoassay)	***pag.28***
1.3.2.3 Test sierologici rapidi "lateral flow"	***pag.28***
1.3.2.4 Protein microarray	***pag.30***
1.3.2.5 I test antigenici rapidi	***pag.31***
1.4 La vaccinazione	***pag.33***
1.5 Le varianti emergenti	***pag.38***
1.6 I nuovi farmaci antivirali	***pag.43***
1.7 Verso il controllo della pandemia	***pag.49***
2. Contributo personale	***pag.53***
2.1 Scopo della tesi	***pag.53***
2.2 Materiali e metodi	***pag.55***
2.3 Risultati	***pag.57***

	2.4 Discussione	***pag.61***
	2.5 Conclusioni	***pag.68***
Bibliografia		***pag.69***

SINTESI DELLA TESI IN LINGUA ITALIANA E IN LINGUA INGLESE

Introduzione

La diffusione, nel dicembre 2019, di un nuovo coronavirus (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2), ha avuto conseguenze disastrose a livello globale. La proteina "spike" di SARS-CoV2, ed in particolar modo il suo sito di legame per il recettore (*receptor binding domain*, RBD) è risultata essere, sin dall'inizio, il target più importante contro cui venivano prodotti gli anticorpi dei soggetti che avevano contratto l'infezione (173). Per questo motivo, diverse tipologie di vaccino hanno mirato ad indurre la produzione di anticorpi diretti contro il dominio RBD.

BNT162b2 Pfizer/BioNTech è stato il vaccino di scelta per la somministrazione agli operatori sanitari in Italia; il primo schema vaccinale prevedeva la somministrazione di due dosi, a distanza di 21 giorni l'una dall'altra.

L'obiettivo primario del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare la risposta immunitaria umorale in una popolazione di operatori sanitari che ha ricevuto due dosi della vaccinazione anti SARS-CoV-2 BNT162b2 Pfizer/BioNTech; successivamente è stata valutata l'influenza di alcuna variabili, quali età e sesso, sullo sviluppo del suddetto titolo anticorpale.

Materiali e Metodi

Nel presente studio, monocentrico ed osservazionale, sono stati utilizzati 2845 campioni di siero, prelevati da 1306 operatori sanitari (449 maschi e 857 femmine, età media 47.9 ± 12.7 anni), impiegati presso la ASL 1 Abruzzo. Gli operatori si sono sottoposti a prelievo di sangue venoso a 21, 28 e 50 giorni dalla somministrazione della prima dose di vaccino anti COVID-19 BNT162b2 Pfizer Biontech. Un totale di: 1306 campioni sono stati raccolti dopo 21 giorni dalla prima dose, 871 campioni sono stati raccolti dopo 28 giorni dalla prima dose e 668 campioni dopo 50 giorni dalla prima dose.

Un siero è stato considerato come "negativo" o "positivo" per la ricerca di IgG anti SARS-CoV-2 applicando i criteri di interpretazione dei test laboratoristici forniti dal produttore.

Le elaborazioni statistiche sono state eseguite con il software STATA 15.

Risultati

La proporzione di campioni con anticorpi positivi per SARS-CoV-2 è aumentata nel tempo: in particolare, è aumentata significativamente dal 91,7% al 99,1% tra il primo ed il secondo campionamento (ovvero 21 e 28 giorni dopo la prima dose) ($p<0,0001$). Non ci sono state

differenze statisticamente significative nella proporzione di campioni positivi per anticorpi anti SARS-CoV-2 tra la seconda e la terza raccolta (ovvero tra il campionamento a 28 e quello a 50 giorni dalla prima dose) (aumento dal 99.1% al 99.7%, p=0,134). Sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel titolo anticorpale normalizzato nei prelievi a tempi diversi (p<0,0001). Non ci sono state differenze di genere nella proporzione di campioni positivi per anticorpi anti-SARS-CoV-2 in nessuno dei dosaggi. Tuttavia, è stato riscontrato che il titolo anticorpale medio era più alto nelle femmine rispetto ai maschi in ciascuno dei dosaggi eseguiti.

È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'età media tra coloro che avevano un titolo anticorpale positivo e quelli che non lo avevano: i lavoratori con titolo anticorpale protettivo erano, in media, di età inferiore, sia per quanto riguarda i maschi che per quanto riguarda le femmine. La correlazione per ranghi di Spearman ha mostrato una moderata correlazione inversa tra i valori del titolo normalizzato e l'età, al momento del primo dosaggio. Tale correlazione viene mantenuta anche nei dosaggi successivi, sebbene con valori inferiori.

Infine, il modello di regressione lineare ha mostrato come "sesso", "età" e "tempo" fossero statisticamente associati al titolo anticorpale normalizzato (R-quadrato: 0,5411; p<0,0001). In particolare, il sesso femminile e l'età più giovane erano associati a un titolo anticorpale più elevato.

Discussione

La quasi totalità dei soggetti ha sviluppato un titolo anticorpale protettivo (al di sopra del "cut-off" delle rispettive metodiche di laboratorio), ma il titolo anticorpale era significativamente maggiore nelle persone di età più giovane e nelle persone di sesso femminile. Il dato è concorde con numerosi studi di letteratura.

All'analisi di regressione lineare, le variabili più importanti nel determinare la risposta anticorpale erano il sesso, l'età ed anche l'aver eseguito la seconda dose della vaccinazione. Quest'ultimo dato è molto importante: differenti strategie vaccinali sono state adottate in diversi Paesi, e lo stesso tipo di vaccino è stato somministrato con diverse periodicità.

Conclusioni

Il presente lavoro evidenzia che la quasi totalità degli operatori sanitari arruolati nello studio ha sviluppato una brillante risposta alla vaccinazione, e tale dato conferma ed incoraggia l'utilizzo del vaccino su larga scala.

Per quanto riguarda l'impatto di alcune variabili, quali età e sesso, sull'efficacia del vaccino, i dati finora disponibili sono contraddittori.

Dall'analisi dei risultati del presente lavoro di tesi, il titolo anticorpale medio risulta essere più alto nelle femmine rispetto ai maschi in ciascuno dei dosaggi eseguiti; emerge una differenza statisticamente significativa nell'età media tra coloro che avevano un titolo anticorpale protettivo ed i soggetti che avevano un titolo anticorpale inferiore: gli operatori sanitari con titolo anticorpale protettivo sono, in media, di età inferiore, sia per quanto riguarda i maschi che per quanto riguarda le femmine.

L'approfondimento di tali informazioni identificherebbe eventuali gruppi specifici di popolazione con una risposta potenzialmente differente al vaccino. Tale aspetto risulta cruciale per la pianificazione di metodiche di stratificazione del rischio in sanità pubblica.

Introduction

The emergence in December 2019 of a novel coronavirus, the *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), has had disastrous consequences globally. SARS-CoV-2 spike protein, and in particular its receptor binding domain (RBD), was found to be the most important target for the induction of antibodies in infected subjects (173). Therefore, different types of vaccines have aimed to elicit antibody responses against RBD.

The first stage of the vaccination campaign in Italy initially targeted healthcare workers, who were administered with BNT162b2, BioNTech/Pfizer vaccine; recommended administration was two doses 21 days apart.

The main focus oh this thesis was to investigate antibody responses in a population of healthcare workers, who received two doses of the BNT162b2 Pfizer / BioNTech vaccine; the influence of some variables, such as age and sex, on the development of the antibody titer was subsequently assessed.

Materials and methods

We used 2,845 sera of 1,306 different health-care workers (449 man, 857 women; mean age 47.9 ± 12.7 years) in the St. Salvatore General Hospital in L'Aquila, Italy. The sera were collected after the start of the vaccination campaign: 1,306 were collected after 21 days from the first dose, 871 after 28 days, and 668 after 50 days.

A serum was regarded as SARS-CoV-2 IgG "positive" or "negative" by applying the manufacturer's interpretation criteria of the laboratory method.

All analysis were carried out with the STATA 15 software, setting alpha to 0.05.

Results

The proportion of positive SARS-CoV-2 antibody samples increased over time: particularly, it significantly increased from 91.7% to 99.1% after seven days (and the second dose of vaccine) ($p<0.0001$). There were no statistically differences in SARS-CoV-2 antibody positive proportion between second and third collection ($p= 0.134$). We found statistically significant differences in the normalized antibody titre between different times ($p<0.0001$). There were no gender differences in SARS-CoV-2 antibody positive proportion in none of the assays. However, we found that the average antibody titre was higher in females than in males in each of the assays performed.

We found a statistically significant difference in average age between those who had a positive antibody titer and those who did not: positive antibody workers were on average of a lower age, both male and female.

We then explored the relationship between age and antibody titer by Spearman correlation: this showed a moderate inverse correlation between the normalized titer values and the age at the time of the first assay. This correlation is also maintained in subsequent assays, although with lower values.

Finally, the linear regression model showed how gender, age and time were statistically associated with the normalized antibody titre (R-squared: 0. 5411; $p<0.0001$). In particular, female and younger age were associated with a higher antibody titer.

Discussion

Almost all of subjects developed a positive antibody titer, but the antibody titer was higher in younger people and in women.

In linear regression analysis, the most important variables in determining antibody response were sex, age and also having administered with the second dose of vaccination. These results are very important: different vaccination strategies have been adopted in different countries, and the same type of vaccine has been administered at different intervals.

Conclusions

Almost all healthcare workers enrolled in the study developed a brilliant response to vaccination, and these results encourages the use of the vaccine on a large scale.

As regards the impact of some variables, such as age and sex, on the efficacy of the vaccine, the data available are contradictory.

From the analysis of the results of this thesis, the average antibody titer appears to be higher in females than in males in each of the assays performed; a statistically significant difference in the mean age emerges between those who had a protective antibody titer and those who had a lower antibody titer: health workers with a protective antibody titer were, on average, younger, both for males and females.

A closer look at this information would identify any specific population groups with a potentially different response to the vaccine. This aspect is crucial in order to plan risk stratification in public health.

1. Introduzione

1.1 Inquadramento storico: SARS, MERS, SARS-CoV-2

La COVID-19 (*coronavirus disease* – year 2019) si è manifestata per la prima volta nella storia nella provincia cinese di Hubei, e precisamente nella città di Wuhan, negli ultimi mesi del 2019. Il 31 Dicembre 2019 la Cina ne ha notificato la presenza all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS; WHO).

L'agente causale era un nuovo Coronavirus, strutturalmente correlato al virus che causa la sindrome respiratoria acuta grave (*severe acute respiratory syndrome*, SARS) e pertanto in seguito denominato SARS-CoV-2. (1)

I Coronavirus umani includono 4 specie infettive per l'uomo (HCoV 229E, NL63, OC43 e HKU1), endemiche e responsabili del 10-30% delle infezioni virali respiratorie dell'uomo. Il *reservoir* naturale dell'infezione sembrerebbe essere rappresentato dal pipistrello, ma altri mammiferi peridomestici possono fungere da ospiti intermedi in cui, a seguito di mutazioni e ricombinazioni, si generano varianti genetiche responsabili del "salto di specie" all'uomo.

Due grandi epidemie, cosiddette SARS e MERS, hanno preceduto l'attuale stato pandemico, ed hanno avuto una diffusione prevalente in Cina ed Arabia Saudita rispettivamente. (2)

Nel 2002 alcuni casi di polmonite atipica severa nella provincia cinese di Guangdong danno origine all'epidemia di SARS, che si diffonde rapidamente ad una ventina di paesi tramite i viaggi internazionali. Per la SARS è stata ipotizzata una trasmissione zoonotica, a partire dal pipistrello, con l'intervento di un ospite intermedio (il furetto). E' stato identificato come agente causale un beta-coronavirus, denominato SARS-CoV. La glicoproteina di superficie *spike* rappresenta l'elemento patogenetico responsabile dell'attacco ai recettori della cellula ospite, identificati in ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*). Le manifestazioni cliniche sono rappresentate da febbre, tosse, difficoltà respiratoria ed occasionalmente sindrome gastroenterica; la necessità del ricorso a manovre di ventilazione invasiva oscilla tra il 30 ed il 40% dei casi e la letalità si aggira intorno al 10%, eventualmente gravata da fattori di rischio noti quali l'età avanzata ed eventuali comorbidità. Lo *shedding* virale tardivo, a 7 giorni, è imputabile alla localizzazione di ACE2 nel tratto inferiore dell'albero bronchiale.

La via di trasmissione principale per SARS-CoV è quella aerogena (*droplets* e/o aerosol), ma sono possibili anche altre vie, quali il contatto con superfici infette. Prima che l'epidemia

potesse essere bloccata, 8098 soggetti risultano essere stati contagiati, con 774 decessi (indice di letalità 9,6%). Il costo economico globale è stato valutato fra 30 e 100 miliardi di dollari.

Nel 2012 un altro betacoronavirus, denominato MERS-CoV, ha provocato un'epidemia con un comportamento diverso da quella sostenuta da SARS CoV, in quanto è rimasta limitata ad un'area ristretta, il Medio Oriente, dove continua a manifestarsi con casi sporadici, responsabili di limitati *cluster* comunitari e nosocomiali. Il serbatoio è stato ancora una volta identificato nel pipistrello, con un ospite intermedio rappresentato da un camelide, il dromedario.

A novembre 2019, il numero di casi totali era di 2494, con 858 decessi ed un indice di letalità del 36%, interessante anche pazienti relativamente giovani. Anche sotto il profilo clinico, MERS differisce da SARS, in quanto accanto a quadri tipicamente respiratori, può portare ad una grave sindrome gastrointestinale ed insufficienza renale acuta, legandosi a recettori DPP4 (dipeptidil peptidasi 4) presenti nel tratto respiratorio inferiore ma anche nel tratto intestinale e nel rene.

Un focolaio di polmonite atipica grave, nella città di Wuhan, segnala l'emergenza di un terzo coronavirus, del quale a Gennaio 2020 viene sequenziato l'intero genoma. L'omologia con SARS CoV e l'affinità per i recettori ACE 2 hanno consentito la denominazione di SARS-CoV-2 e la previsione di una potenziale diffusione pandemica. L'allarme internazionale è stato da subito molto elevato per la dimostrazione di una rapida diffusione mondiale, con un numero crescente di casi in Medio Oriente e presto in Europa, tanto che l'11 Marzo 2020 l'OMS ha dichiarato lo stato di pandemia, essendo stati registrati casi in tutti i continenti.

COVID-19 presenta un indice di trasmissibilità R_0 (in assenza di livelli di contenimento) medio di 2,5, un periodo di incubazione di 4-12 giorni, un quoziente elevato di casi di malattia grave necessitanti di ricovero in terapia intensiva ed un'incidenza relativamente bassa di letalità nei bambini e nei soggetti con età inferiore a 65 anni.

Caratteristiche	SARS, 2002	MERS, 2012	COVID-19, 2019
Indice di riproduzione R0	2,9	3,0	2,4-2,7
Periodo di incubazione (gg)	2-7	2-10	4-12
Periodo di infettività	Sintomatici	Sintomatici	Pre-sintomatici, asintomatici, sintomatici
Mediana età dei casi (anni)	65	50	~50
Maschi/Femmine	M	M	M/F

Distribuzione pandemica	26 Paesi	27 Paesi	220 Paesi
Totale dei casi	8.096	2.519 (gennaio 2020)	180,5 milioni (giugno 2021)
Totale dei decessi	774	866	4 milioni (giugno 2021)
Proporzione malattia lieve	Bassa	Bassa	Alta
Proporzione dei ricoverati	> 70%	> 80%	~20%
Proporzione in Terapia Intensiva	40%	80%	1/20.000
Proporzione di deceduti <65 anni	Non nota	Non nota	5%
Fattori di rischio per malattia grave o decesso	Età, comorbosità	Età, comorbosità	Età (> 70 anni) comorbosità

Tabella 1 - *SARS, MERS, COVID-19 a confronto* (1)

COVID-19 rappresenta un pericolo a livello mondiale che, per quanto l'avvento di una pandemia fosse prevedibile, ha sorpreso per la rapida diffusione del contagio e per la gravità della malattia condizionata da diversi moventi patogenetici ("tempesta citochinica", turbe della coagulazione).

COVID-19 coinvolge non solo i polmoni ma una molteplicità di organi e lascia come reliquati la possibilità di sequele invalidanti, "in primis" neurologici, polmonari, cardiovascolari e renali.

Inoltre, comporta gravi riflessi sociali poiché le popolazioni più vulnerabili non possono evitare di esporsi al rischio di contagio e più spesso presentano comorbosità (diabete, obesità, broncopneumopatia cronica ostruttiva). Ciò senza contare i riflessi economici, documentati da una caduta del prodotto interno lordo (PIL) nel mondo, superiore non solo alla crisi bancaria del 2008 ma anche alla grande depressione del 1929.

1.2 Meccanismi di trasmissione e patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2

1.2.1 Le caratteristiche di SARS-CoV-2

I membri della famiglia *Coronaviridae* sono virus a RNA a singolo filamento con polarità positiva provvisti di *envelope*. Tutti i coronavirus altamente patogeni, incluso SARS-CoV-2, appartengono al genere Betacoronavirus, gruppo 2 (3). La sequenza del genoma SARS-CoV-2 è condivisa con SARS-CoV (80% circa) e con MERS-CoV (50% circa). (4,5)

Il genoma virale è costituito da 29.900 nucleotidi organizzati in 14 cornici di lettura aperte (ORF, *Open Reading Frames*), che codificano per 31 proteine. Seguendo un tipico ordine 5'-3', le proteine di SARS-CoV-2 comprendono due grandi poliproteine: ORF1a e ORF1b che sono scisse da una proteasi virale a formare 16 proteine non strutturali (nsp1-16), coinvolte nella replicazione del genoma e nella regolazione precoce della trascrizione; quattro proteine strutturali: *spike* (S), *envelope* (E), *membrana* (M) e *nucleocapside* (N), comuni a tutti i coronavirus e considerate i principali target per lo sviluppo di terapie antivirali; e undici proteine accessorie: ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c and ORF10.

Le proteine accessorie sembrano giocare un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione: ORF3A ha un ruolo nella generazione della tempesta citochinica e induce apoptosi e danno lisosomiale, ORF3B, ORF6, ORF7A e ORF8 sono potenti antagonisti dell'interferone, ORF 3C interagisce con i segnali di membrana cellulare, ORF3D insieme ad N ed ORF8 indurrebbe una potente risposta anticorpale, ORF7B è alla base dello sviluppo di alcuni sintomi legati a COVID19 (ad esempio artimie cardiache), ORF 9B sopprime l'immunità innata dell'ospite (compromettendo la sintesi di interferone), ORF 9C agisce compromettendo la risposta antivirale (interferendo anche con il processamento e la presentazione dell'antigene), ORF10 non è stata ancora ben caratterizzata e non sembra essere essenziale nello sviluppo dell'infezione da SARS-CoV-2 nell'uomo. (6)

Il gene S di SARS-CoV-2 è piuttosto variabile rispetto a SARS-CoV, condividendo con quest'ultimo un'omologia nucleotidica di meno del 75%.

La proteina spike possiede un dominio di legame del recettore (RBD) che media il contatto diretto con un recettore cellulare, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e un sito di scissione polibasico S1/S2 che viene scisso proteoliticamente dalla catepsina cellulare L e dalla proteasi transmembrana serina 2 (TMPRSS2). TMPRSS2 facilita l'ingresso del virus

sulla superficie della membrana plasmatica, mentre la catepsina L attiva le spike di SARS-CoV-2 in endosomi e compensa l'ingresso in cellule prive di TMPRSS2 (7,8).

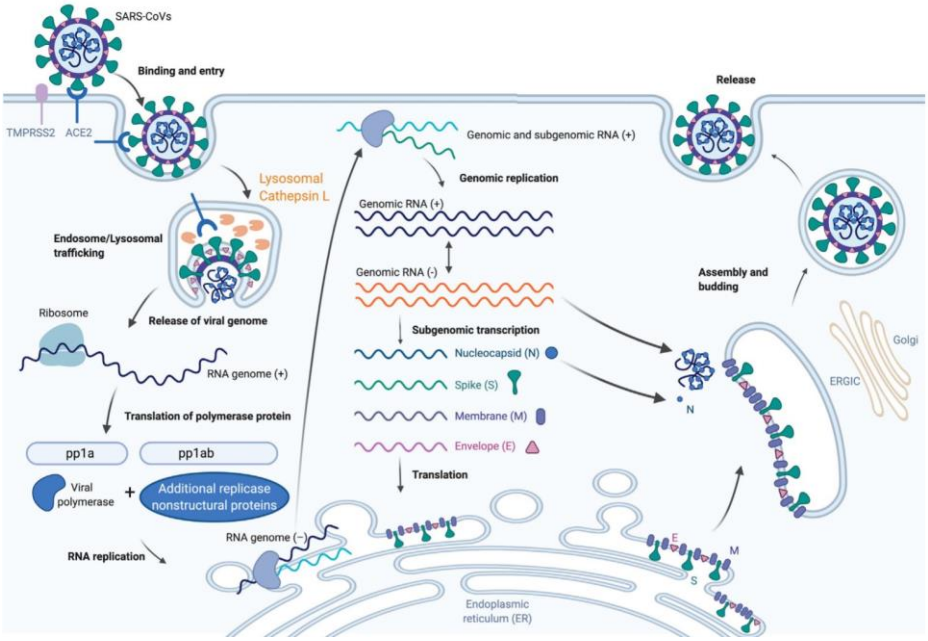


Figura 1 – *Il ciclo vitale di SARS-CoV-2* (9)

Una volta che il genoma viene rilasciato nel citosol della cellula ospite, ORF1a e ORF1b vengono tradotti in proteine replicasi virali, che vengono scisse in singole proteine non strutturali; queste formano la RNA polimerasi RNA-dipendente (nsp12 derivata da ORF1b). A questo punto, le replicasi riorganizzano il reticolo endoplasmatico (ER) in vescicole a doppia membrana (DMV) che facilitano la replicazione virale degli RNA genomici e subgenomici (sgRNA); questi ultimi sono tradotti in proteine strutturali virali e accessorie che facilitano la formazione di particelle virali (10,11).

Una volta che i SARS-CoV entrano nell'ospite attraverso il tratto respiratorio, le vie aeree e le cellule epiteliali alveolari, le cellule endoteliali vascolari e i macrofagi alveolari rappresentano i loro primi bersagli di ingresso. Queste cellule sono probabilmente un “ground-zero” per l'infezione precoce e la successiva replicazione a causa della loro espressione di ACE2 (12).

Una delle differenze tra SARS-CoV e SARS-CoV-2 è la capacità di quest'ultimo di infettare efficacemente il tratto respiratorio superiore, comprendente i tessuti nasofaringei e/o orofaringei, forse a causa della sua maggiore affinità per ACE2, che è espresso nei tessuti nasali e orali umani (13).

I titoli facilmente rilevabili di SARS-CoV-2 nel muco del tratto respiratorio superiore dei pazienti con COVID-19 durante il periodo prodromico potrebbe aiutare a spiegare la trasmissibilità più rapida ed efficace di SARS-CoV-2 rispetto a SARS-CoV (14).

I coronavirus umani sono spesso causa di quadri ad espressione gastroenterologica, con diversi gradi di gravità. Numerosi studi evidenziano che ACE2 e TMPRSS2 sono abbondantemente espressi nel tratto intestinale dell'uomo e di altri mammiferi, in particolare a livello del bordino a spazzola degli enterociti (15).

Nel 20% dei pazienti circa affetti da COVID-19, è stato possibile rilevare l'RNA virale nelle feci, anche dopo l'attenuazione dei sintomi respiratori, suggerendo il virus possa essere liberato per molto tempo dal tratto intestinale (16). Tali dati suggeriscono la possibilità che SAR-CoV-2 possa essere trasmesso anche per via oro-fecale.

1.2.2 Meccanismi di trasmissione

I coronavirus umani vengono trasmessi principalmente attraverso le goccioline respiratorie (*droplets*), ma nel corso dell'attuale pandemia da SARS-CoV-2 sono state segnalate anche altre modalità di trasmissione quali l'aerosol, la via oro-fecale ed il contatto con superfici infette (17, 18).

Le prime segnalazioni di pazienti con tosse, opacità polmonari a vetro smerigliato e rapida progressione dei sintomi verso forme di polmonite grave, hanno suggerito la trasmissibilità di SARS-CoV-2 per via respiratoria.

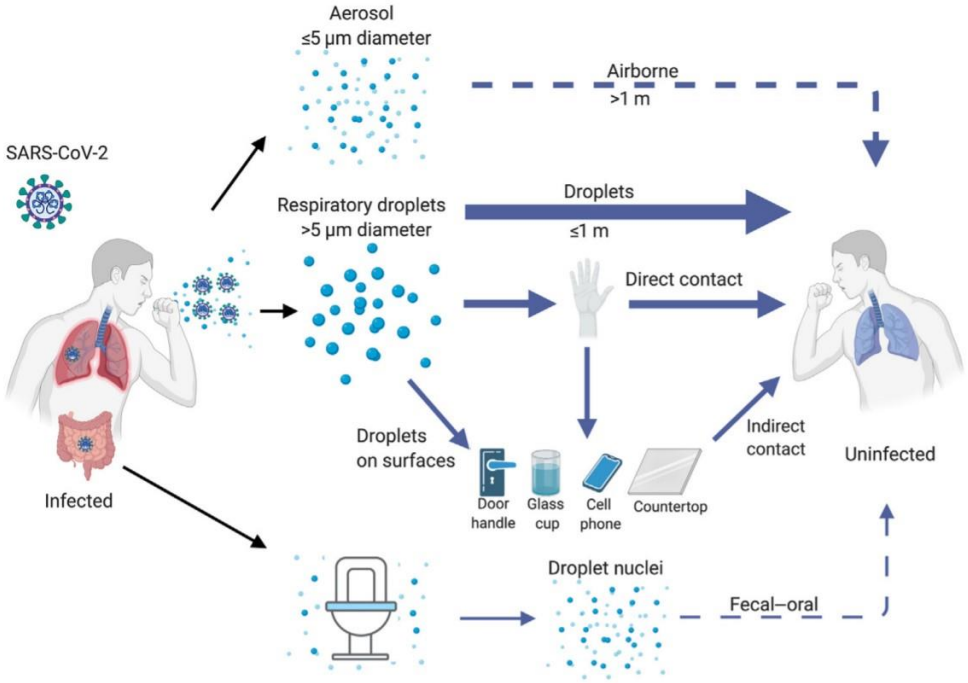


Figura 2 – *Modalità di trasmissione di SARS-CoV-2* (9)

La trasmissione diretta tramite goccioline respiratorie è sostenuta dall'attiva replicazione di SARS-CoV-2 nelle cellule del tratto respiratorio superiore e inferiore e dall'alto numero di segnalazioni che indicano una diffusione da uomo a uomo tra contatti stretti attraverso il meccanismo della tosse (19).

Ciononostante, diversi studi in Letteratura indicano la possibilità di trasmissione del virus da soggetti in fase presintomatica/non sintomatica di infezione, andando apparentemente in contrasto con la dinamica di trasmissione sopradescritta (20). Tale scoperta sottolinea la capacità di SARS-CoV-2 di colonizzare e replicarsi in faringe durante le fasi più precoci di infezione (21).

Un parametro importante in un'epidemia di una malattia infettiva è il cosiddetto R0 ovvero il "numero di riproduzione di base" che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie prodotte da ciascun individuo infetto in una popolazione completamente suscettibile cioè mai venuta a contatto con il nuovo patogeno emergente. Questo parametro misura la potenziale trasmissibilità di una malattia infettiva. Ad esempio, se l'R0 di una malattia infettiva è circa 2, significa che in media un singolo malato infetterà due persone. Quanto maggiore è il valore di R0 e tanto più elevato è il rischio di diffusione dell'epidemia. Se invece il valore di R0 fosse inferiore ad 1 ciò significa che l'epidemia può essere contenuta.

Da quando l'epidemia del nuovo coronavirus (2019-nCoV) emerso in Cina ha cominciato a diffondersi e sono iniziati a circolare i dati sui primi casi confermati, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e numerosi istituti di ricerca di tutto il mondo hanno diffuso stime di R0 dell'infezione. Queste stime sono comprese tra 1,4 e 3,8 nelle aree colpite nella prima fase di diffusione. (22)

Uno studio ha descritto la dinamica di trasmissione di SARS-CoV-2 in individui presintomatici ha indicato che l'R0 in un soggetto presintomatico si avvicina alla soglia per innescare un focolaio (R0 >1); al contrario, nelle stime corrispondenti per SARS-CoV R0 si avvicinava al valore di 0 (23).

Comprendere le dinamiche di trasmissione dell'attuale pandemia di COVID-19 è essenziale per le autorità di sanità pubblica, per adottare le misure di controllo complete ed efficaci, che includono l'uso della mascherina, il tracciamento dei contatti e l'isolamento fisico.

L'infezione da coronavirus altamente patogeni, come SARS-CoV-2, provoca gravi sintomi simil-influenzali che possono evolvere in distress respiratorio acuto (ARDS), polmonite, insufficienza renale e morte (24, 25).

I sintomi più comuni sono febbre, tosse e dispnea, che si manifestano rispettivamente nell'83%, l'82% e il 31% dei pazienti con COVID-19 (26).

Il periodo di incubazione in COVID-19 è rapido: 5–6 giorni circa a differenza dei 2–11 giorni nelle infezioni da SARS-CoV (19).

Con il perdurare della pandemia, è diventato sempre più evidente che COVID-19 comprende non solo quadri acuti di sintomatologia respiratoria e/o gastrointestinale, ma può comportare anche effetti a lungo termine, non del tutto noti.

Inoltre, forme severe di COVID-19 non riguardano soltanto la popolazione anziana, come inizialmente segnalato; anche bambini e giovani adulti sono a rischio (27).

Dal punto di vista prognostico, COVID-19 presenta con alcuni aspetti radiologici e di laboratorio "caratteristici", che possono essere utili nella valutazione della progressione della malattia. Globalmente, COVID-19 inizialmente si presenta con sintomi simil-influenzali e successivamente può progredire verso un'infiammazione sistemica ed una disfunzione multiorgano pericolosa per la vita.

1.2.3 Patogenesi: la “tempesta citochinica”

È noto dalla Letteratura che le citochine svolgono un ruolo molto importante nella patogenesi di una infezione virale. La risposta immunitaria innata, rapida e ben coordinata, è la prima linea di difesa contro l'infezione stessa.

Tuttavia, una risposta immunitaria disregolata ed eccessiva può essa stessa rappresentare la causa del danno all’organismo ospite (28,29).

Evidenze provenienti da pazienti affetti da forme gravi di infezione da coronavirus umani suggeriscono che la risposta proinfiammatoria gioca un ruolo importante nella patogenesi dell’infezione.

Esperimenti cellulari in vitro mostrano che nelle cellule epiteliali respiratorie, nelle cellule dendritiche e nei macrofagi, durante la fase iniziale dell'infezione da SARS-CoV, si verifica un rilascio ritardato di citochine e chemochine. Successivamente, le cellule secernono bassi livelli di interferone (IFN) e alti livelli di citochine proinfiammatorie (interleuchina (IL)-1β, IL-6 e fattore di necrosi tumorale (TNF)) e chemochine (CCL-2, CCL-3 e CCL-5). (30, 31)

La produzione di IFN-I o IFN-α/β è la chiave della risposta immunitaria naturale contro le infezioni virali e l'IFN-I è la molecola che svolge un ruolo antivirale nelle prime fasi dell'infezione.

Il rilascio ritardato di IFN nelle prime fasi dell'infezione da SARS-CoV e MERS-CoV ostacola la risposta antivirale dell'organismo. (32)

In seguito, il rapido aumento di citochine e chemochine attira diverse cellule infiammatorie, come neutrofili e monociti, provocando un'eccessiva infiltrazione delle cellule infiammatorie nel tessuto polmonare e quindi danno polmonare.

Da questi studi risulta che le risposte disregolate e/o esagerate di citochine e chemochine da parte di cellule infettate da SARS-CoV o infettate da MERS-CoV potrebbero svolgere un ruolo importante nella patogenesi della SARS o della MERS.

L'ARDS è la principale causa di morte nei pazienti infetti da SARS-CoV o MERS-CoV. È ormai noto che diverse citochine proinfiammatorie (IL-6, IL-8, IL-1β, fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi) e chemochine (come CCL2, CCL-5, proteina indotta da IFNγ10 (IP-10) e CCL3) contribuiscono tutti al verificarsi di ARDS. (33-35)

Questi risultati supportano le osservazioni che, a seguito di infezione da SARS-CoV, la carica virale elevata e la disregolazione della risposta citochine/chemochine provocano una tempesta

infiammatoria di citochine. La tempesta infiammatoria di citochine è accompagnata da alterazioni immunopatologiche nei polmoni.

In pazienti affetti da COVID-19 sono stati rilevati alti livelli di espressione di IL-1B, IFN-γ, IP-10 e proteina chemiotattica dei monociti 1 (MCP-1). Queste citochine infiammatorie possono attivare la risposta delle cellule T-*helper* di tipo 1 (Th1). (36) L'attivazione di Th1 è un evento chiave nell'attivazione dell'immunità specifica. (37) Tuttavia, a differenza dei pazienti affetti da SARS, i pazienti con COVID-19 presentano anche alti livelli delle citochine secrete dalle cellule Th2 (come IL-4 e IL-10), che inibiscono la risposta infiammatoria.

I livelli sierici di IL-2R e IL-6 nei pazienti con COVID-19 sono correlati positivamente con la gravità della malattia (cioè pazienti critici > pazienti gravemente malati > pazienti ordinari). Altri studi hanno riscontrato che, confrontati con i pazienti affetti da COVID-19 provenienti da reparti di degenza ordinaria, i pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva mostrano livelli sierici più elevati di fattore stimolante le colonie di granulociti, IP-10, MCP-1, proteina infiammatoria 1-α dei macrofagi e TNF-α. Gli studi di cui sopra suggeriscono che la tempesta citochinica è positivamente correlata con la gravità della malattia. (36)

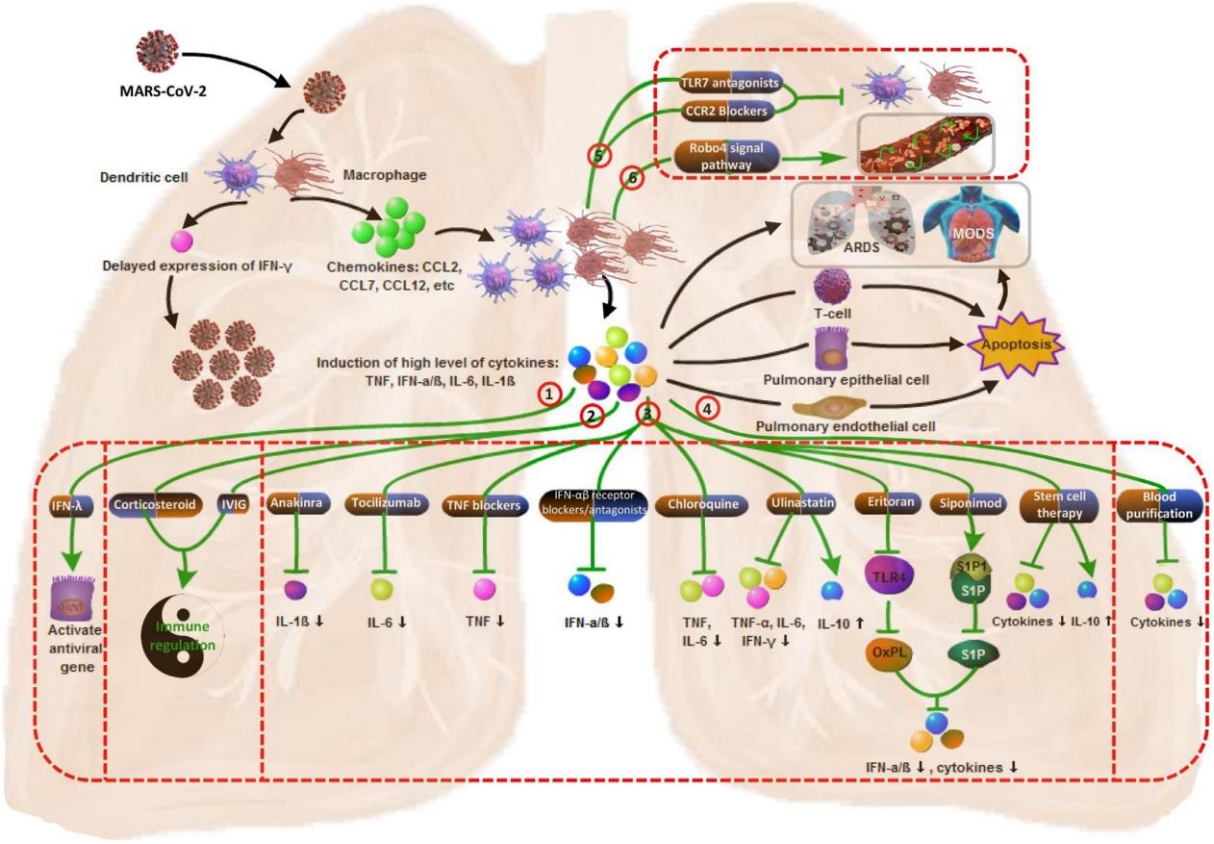


Figura 3 – *I meccanismi della tempesta citochinica in COVID-19 e potenziali target terapeutici* (38)

L’elemento patogenetico nell'ARDS è il danno ai tessuti polmonari e interstiziali causato dall'infiltrazione aspecifica di cellule infiammatorie. (39) L'eccessivo rilascio locale di citochine è il fattore decisivo che induce il danno e le manifestazioni cliniche. (40)

La tempesta di citochine è anche un fattore chiave nel determinare il decorso clinico dell'insufficienza multiorgano extrapolmonare. (41) Ciò spiega in parte i segni di insufficienza d'organo extrapolmonare (come elevati enzimi epatici e creatinina) osservati in alcuni pazienti COVID-19 senza insufficienza respiratoria.

In sintesi, l'infezione da SARS-CoV-2 provoca una tempesta infiammatoria di citochine nei pazienti. La tempesta di citochine porta a ARDS e/o ad insufficienza multiorgano extrapolmonare ed è un fattore importante che causa l'esacerbazione del COVID-19 o addirittura l’*exitus*.

Sulla base della gravità di presentazione della malattia, il National Institutes of Health (NIH) ha pubblicato linee guida che classificano COVID-19 in cinque stadi distinti in cui possono essere raggruppati gli adulti con infezione da SARS-CoV-2.

Tale classificazione considera: la gravità dei sintomi clinici, anomalie di laboratorio e radiografiche, emodinamica e funzione d'organo:

- *infezione asintomatica o presintomatica*: soggetti con test SARS-CoV-2 positivo senza sintomi clinici suggestivi di COVID-19;
- *malattia lieve*: individui che presentano sintomi di COVID-19 come febbre, tosse, mal di gola, malessere, mal di testa, dolori muscolari, nausea, vomito, diarrea, anosmia o disgeusia ma senza affanno o anomalie nell’imaging toracico;
- *malattia moderata*: individui che presentano sintomi clinici o evidenze radiologiche di malattia delle basse vie respiratorie e che hanno una saturazione di ossigeno (SpO2) ≥ 94% in aria ambiente;
- *malattia grave*: individui che hanno SpO2 ≤ 94% in aria ambiente; un rapporto tra la pressione parziale dell'ossigeno arterioso e la frazione dell'ossigeno inspirato, (PaO2/FiO2) <300 con tachipnea marcata, frequenza respiratoria >30 respiri/min o infiltrati polmonari >50%. Può esserci neutrofilia;
- *malattia critica*: individui che hanno insufficienza respiratoria acuta, shock settico e/o insufficienza multiorgano. I pazienti con gravi comorbidità possono sviluppare la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) che tende a manifestarsi circa una settimana dopo l'insorgenza dei sintomi.

COVID-19 può causare inoltre una serie di quadri patologici extra-polmonari, tra i quali:

- *manifestazioni neurologiche*: anosmia/ageusia, cefalea, stroke, deterioramento di coscienza, crisi epilettiche, encefalopatia tossica metabolica, Sindrome di Guillain Barrè:
- *manifestazioni cardiologiche*: ischemia/infarto del miocardio e miocardite sono manifestazioni cardiache ben riconosciute nei pazienti con COVID-19. Altre manifestazioni cardiache comuni includono aritmie, cardiomiopatie e shock cardiogeno;
- *manifestazioni ematologiche*: la linfopenia è un reperto di laboratorio estremamente comune, insieme a trombocitopenia, leucopenia, aumento degli indici di flogosi e leucocitosi. Il COVID-19 è anche associato a uno stato di coagulopatia, come evidenziato dall'elevata prevalenza di eventi venosi e tromboembolici come EP, TVP, infarto del miocardio, ictus ischemico e trombosi arteriosa;
- *manifestazioni renali*: si manifestano più comunemente come danno renale acuto ("acute kidney injury", AKI), probabilmente multifattoriale in un contesto di ipervolemia, danno da farmaco, danno vascolare, e citotossicità diretta del virus stesso. Altre manifestazioni cliniche e di laboratorio includono proteinuria, ematuria, anomalie elettrolitiche come iperkaliemia, iponatriemia, disturbi dell'equilibrio acido-base come acidosi metabolica;
- *manifestazioni gastrointestinali*: sono descritti sintomi quali diarrea, nausea, vomito, dolore addominale;
- *altre*: manifestazioni epato-biliari, endocrinologiche nonché conseguenze psicologiche soprattutto nei pazienti cosiddetti "long COVID".

1.3 La diagnosi

Attualmente, i diversi kit commerciali di rilevamento per SARS-CoV-2, cui è stata assegnata l'autorizzazione dalla FDA, possono identificare:

a) specifiche regioni del genoma virale attraverso tecniche di amplificazione dell'acido nucleico (reazione a catena della polimerasi inversa, RT-PCR),

b) gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario in risposta all'infezione virale (sierologia/immunoglobulina M IgM /Immunoglobuline G IgG) e

c) l'antigene virale (test antigenico a flusso laterale).

I suddetti test devono essere eseguiti da personale che abbia ricevuto idoneo addestramento, munito di idonei dispositivi di protezione individuale (DPI) ed in laboratori autorizzati.

I test sierologici non diagnosticano direttamente la presenza del virus, bensì evidenziano gli anticorpi IgM e IgG, prodotti dall'organismo dopo l'ingresso del virus. I test IgG/IgM svolgono un ruolo centrale nella lotta contro COVID-19, classificando accuratamente gli individui che hanno sviluppato una risposta immunitaria a seguito dell'infezione da SARS-CoV-2. Sebbene tali test siano adatti per la diagnosi indiretta, la durata degli anticorpi prodotti, così come la loro efficacia, è ancora incerta, e ciò suggerisce l'impiego degli stessi come un valido strumento di sorveglianza epidemiologica. (42)

Finora nessun paese ha ancora eseguito un test anticorpale su scala nazionale, anche se sono in corso enormi sforzi nelle singole realtà locali (43).

Al 22 Gennaio 2022, il numero di casi attivi di SARS-Cov-2 nel mondo è di circa 347.825.879 persone, con 5.606.040 decessi e 277.219.085 guariti (44).

Lo sviluppo di strumenti di rilevazione di SARS-CoV-2 ad alte prestazioni, veloci, accurati, sensibili e specifici è diventato fondamentale per le autorità di sanità pubblica (45).

1.3.1 Test di amplificazione degli acidi nucleici

I test di amplificazione degli acidi nucleici (*nucleic acid amplification tests*, NAATs) si basano sull'amplificazione della sequenza "target", seguita da una procedura di lettura per il rilevamento.

Utilizzando queste tecniche, l'acido nucleico di SARS-CoV-2 può essere ricercato direttamente nei campioni raccolti di:

- saliva,

- espettorato,
- sangue,
- tampone/lavaggio/aspirato nasofaringeo o nasale,
- tampone faringeo
- tampone rettale,
- liquido di lavaggio broncoalveolare,
- tessuti proveniente da biopsia o autopsia, urina. (46)

Sulla base delle linee guida pubblicate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i NAATs sono i principali test utilizzati per l'individuazione del virus nei casi sospetti soprattutto nelle prime fasi dell'infezione (47).

1.3.1.1 Test basati sull'utilizzo della PCR

RT PCR

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*) è la metodica più comunemente utilizzata per il rilevamento di COVID-19 nei laboratori, ed è stata anche definita il "gold standard" per diagnosticare l'infezione da SARS-CoV-2 (47).

La combinazione di questa tecnica con la PCR in tempo reale (*quantitative PCR – qPCR– o real time-PCR*) viene spesso utilizzata per migliorare alcuni aspetti tecnici del rilevamento.

La maggior parte dei NAATs sviluppati e commercializzati per il rilevamento di COVID-19 si basa sulla tecnologia qRT-PCR convenzionale, eseguita in laboratorio e sviluppata per amplificare uno o più geni del nuovo coronavirus, come i geni ORF1a e b, RdRP (codificante per la RNA polimerasi RNA dipendente), E, N e S (48). Le due categorie principali di RT-PCR sono i kit manuali eseguiti laboratorio ed i test PoC (*point of care*).

La tecnica RT-PCR si basa su due reazioni consecutive:

a) trascrizione di RNA in DNA complementare (*complementary DNA*, cDNA) attraverso l'enzima trascrittasi inversa (chiamata talvolta "DNA polimerasi RNA-dipendente") e

b) amplificazione del campione di cDNA mediante reazione a catena della polimerasi utilizzando primer gene-specifici e sonde di idrolisi marcate con molecole fluorescenti.

La prima fase produce modelli di DNA da utilizzare nella seconda fase, in cui il numero di copie di DNA viene aumentato tramite ripetuti cicli termici.

Primer gene-specifici guidano la seconda reazione per l'amplificazione della sola regione selezionata sul genoma mentre le sonde producono segnali fluorescenti ad ogni

amplificazione riuscita delle regioni geniche, consentendo un sistema di reazione quantificabile (49).

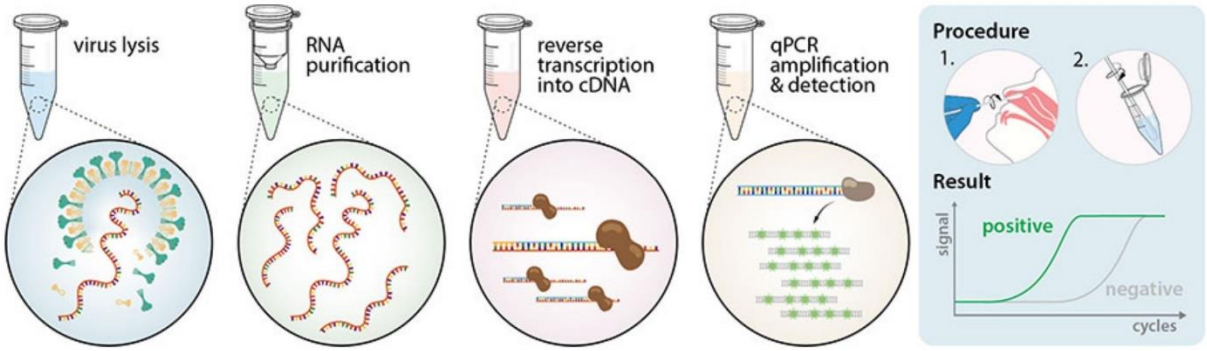


Figura 4 – *Principio di funzionamento dei NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests)* (50)

L'RT-PCR rappresenta attualmente il "gold standard" per il rilevamento di SARS-Cov-2, e ciò è dovuto alla sua capacità di ricercare direttamente porzioni del genoma virale, rispetto a biomarcatori secondari come antigeni o anticorpi.

Il *Malaysian Institute for Medical Research* (IMR) ha messo a disposizione i primi primer e le sonde RT-PCR specifici per SARS-CoV-2 l'11 gennaio 2020 (51), giorno in cui gli scienziati cinesi avevano appena rilasciato l'intera sequenza del genoma virale (52).

La FDA ha da subito concesso l'*Emergency Use Authorization* (EUA) per il sistema Abbott m2000 (53), Panther Fusion SARS-COV-2 Assay di Hologic (54), COVID-19 RT-PCR test di LabCorp (55, 56) e TaqPath COVID-19 Combo Kit di Thermo Fisher Scientific (57) per l'uso in laboratori autorizzati.

La FDA fornisce l'EUA per "prodotti medici non approvati, nonché il nuovo utilizzo dei prodotti medici esistenti e approvati" ai sensi della sezione 564 del *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (58), solo per emergenze come minacce alla salute pubblica e pandemie in cui non esistano alternative appropriate.

L'elenco dei kit di test concessi dall'EUA, che devono essere utilizzati solo da laboratori autorizzati, è continuamente aggiornato sul sito web della FDA (59, 60)

I kit per RT PCR sono stati utilizzati per campioni provenienti da varie regioni dell'organismo, inclusi tamponi nasofaringei, orofaringei o nasali, aspirato delle vie respiratorie superiori e inferiori, lavaggio bronco-alveolare ed espettorato.

Il rapporto ISS COVID-19 n. 11/2020 (Rev.2) indica le raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione ed analisi sul tampone rino/orofaringeo per la diagnosi di COVID-19, ed attualmente rappresenta, nel nostro Paese, il documento più autorevole sul corretto metodo di raccolta dei campioni (61).

Per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 il campione di elezione è un campione delle vie respiratorie. Questo può essere delle alte vie respiratorie (tampone nasale, tampone oro-faringeo, tampone rino-faringeo) e più raramente, ove disponibili, delle basse vie respiratorie: aspirato endotracheale o lavaggio bronco-alveolare (*Broncho-Alveolar Lavage*, BAL).

Il campione delle basse vie respiratorie è da preferire per una maggiore concentrazione di virus nei casi di polmonite.

Il prelievo del tampone rinofaringeo e orofaringeo è una procedura che consiste nel prelievo di muco che riveste le cellule superficiali della mucosa del rinofaringe o dell'orofaringe, mediante un tampone (attualmente sono disponibili dei tamponi in materiale sintetico capaci di trattenere molto più materiale organico rispetto ai tradizionali tamponi di ovatta).

Il prelievo viene eseguito in pochi secondi e ha un'invasività minima, originando al più un impercettibile fastidio nel punto di contatto. Il prelievo deve essere sempre eseguito da personale addestrato e specializzato che deve garantire la corretta esecuzione della procedura evitando sia la contaminazione del campione che la raccolta solo del tratto più esterno delle fosse nasali, procedura che inficerebbe il risultato del test molecolare.
Il personale sanitario addetto all'esecuzione del tampone rino-oro-faringeo deve essere provvisto dei seguenti dispositivi di protezione individuale:

- guanti monouso (molti sanitari prediligono l'utilizzo del doppio guanto, per permettere un agile ricambio del paio di guanti esterno);
- camice monouso impermeabile con manica lunga e polsino elastico;
- cuffia per capelli monouso;
- filtrante facciale monouso FFP2/FFP3;
- protezione per gli occhi (occhiali o schermo facciale di protezione tipo "barrier").

La vestizione e la svestizione dell'operatore devono seguire un ordine rigoroso, per evitare errori che mettano a rischio di contagio. Tali azioni devono essere svolte preferibilmente sotto la supervisione di altro operatore esperto e solo in zone appositamente riservate alla procedura.

I DPI utilizzati e il materiale da scartare deve essere considerato come rifiuto infetto e gettato nell'apposito contenitore. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti seguendo le procedure del materiale infetto categoria B UN3291.

Su ogni campione deve essere apposta un'etichetta riportante

- nome, cognome e data di nascita del paziente;
- data del prelievo;
- tipo di campione.

l tampone rinofaringeo richiede una minima conoscenza dell'anatomia e della procedura per poter essere eseguito; di fatto, il tampone rinofaringeo comprende anche il tampone nasale anteriore.

I tamponi orofaringeo, nasale anteriore e nasale del turbinato medio possono essere eseguiti laddove vi siano difficoltà nella procedura del tampone rinofaringeo per limiti anatomici o per scarsa collaborazione del paziente, rappresentando comunque i tamponi ad oggi prevalentemente eseguiti e riconosciuti nelle linee guida dei CDC di Atlanta e del Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità.

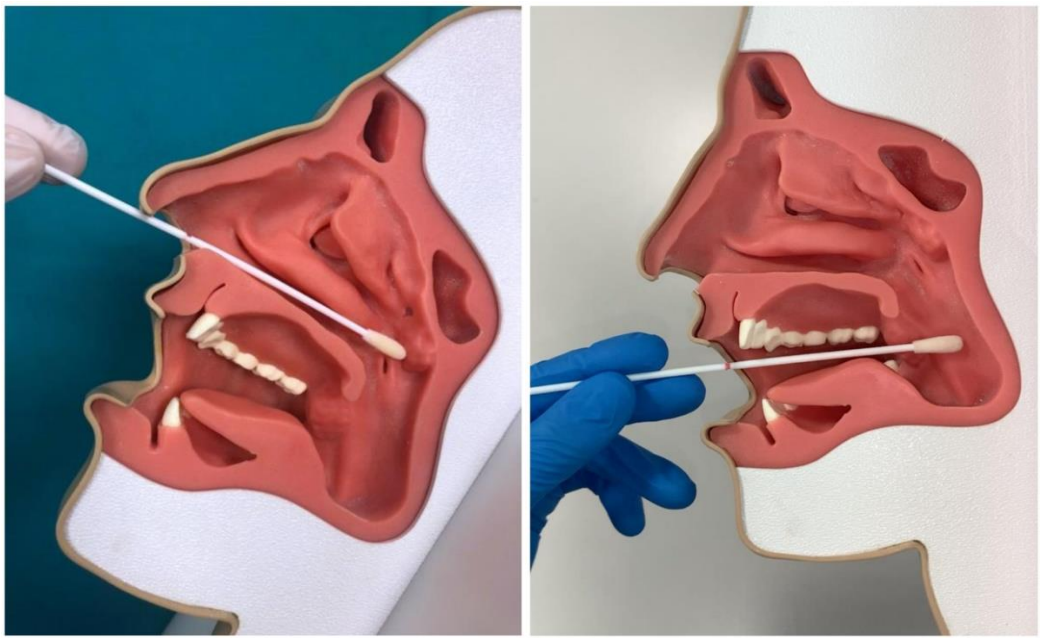


Figure 5 e 6 – *Tampone rinofaringeo e tampone orofaringeo* (61)

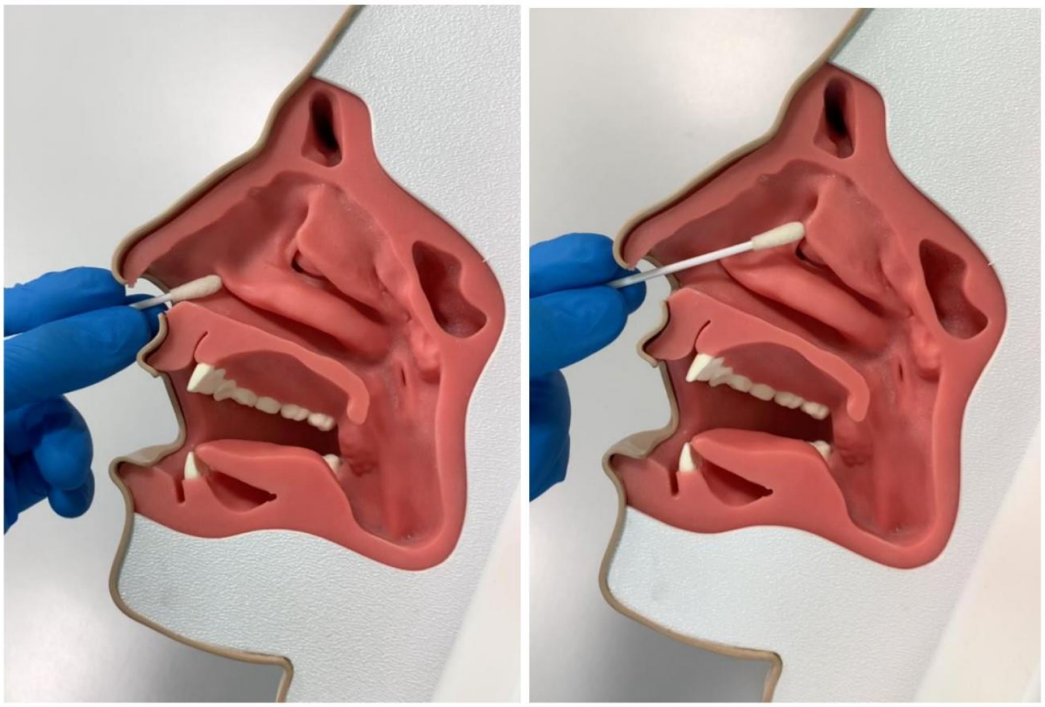


Figure 7 e 8 – *tampone nasale anteriore e tampone nasale medio* (61)

I campioni devono essere inviati immediatamente in laboratorio o in alternativa possono essere conservati in frigo (+4°C) per un tempo non superiore alle 48 ore. Se il campione non può essere processato entro 48 ore, deve essere conservato a –80°C.

Dal materiale biologico viene dunque effettuata l'estrazione e la purificazione dell'RNA per la successiva ricerca dell'RNA virale utilizzando la metodica *Reverse Real-Time PCR*.

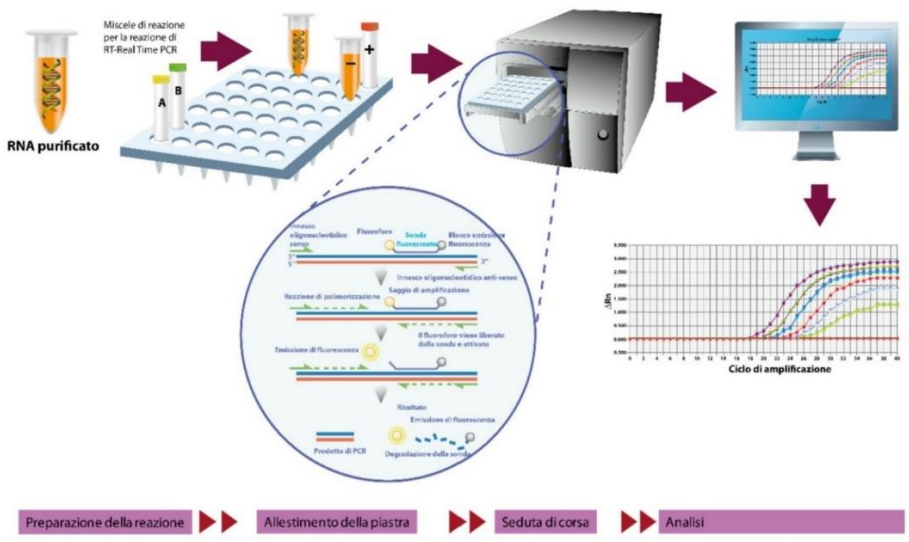


Figura 9 - *Diagnosi molecolare per COVID-19 mediante rRT-PCR* (61)

Anche i test basati su RT-PCR più veloci e accurati riportano, però, alcune carenze. I costi sono elevati per l'acquisto sia dello strumento che dei materiali necessari, e per questo motivo, la stragrande maggioranza delle persone non ha accesso ai centri attrezzati per tali test a livello globale.

Durante l'utilizzo del sistema automatizzato, tutti i campioni inseriti vengono consumati all'interno dello strumento e non è possibile accedere all'acido nucleico estratto per eseguire test aggiuntivi, soprattutto quando il risultato è negativo e sono necessari test supplementari. Inoltre, questi sistemi sono quantitativi e non rilevano la carica virale nel campione per analisi più specifiche.

ddPCR (Droplet Digital PCR)

La *Droplet Digital PCR* (ddPCR) è una delle potenziali strategie per aumentare la sensibilità e la specificità dei test PCR convenzionali riducendo i risultati falsi negativi, soprattutto nei casi in cui il paziente risulti al test debolmente positivo con bassa carica virale (62)

La "reazione a catena della polimerasi digitale a goccia" (ddPCR) è un metodo di reazione a catena della polimerasi (PCR) quantitativo altamente sensibile basato sul frazionamento del campione in migliaia di reazioni individuali "acqua-in-olio" di dimensioni nanometriche.

Lo svantaggio principale è la durata, poiché i risultati vengono riportati 24-48 ore dopo la raccolta del campione, e ciò ha limitato l'applicazione della ddPCR nei laboratori medici; la durata del flusso di lavoro della ddPCR è di circa 2 ore superiore alla qRT-PCR (15% in più di tempo) e i costi medi per le apparecchiature ed i materiali di consumo per ddPCR sono circa il 5–10% superiori rispetto a qRT-PCR. (63)

Il limite di rilevamento è considerevolmente basso per questo test rispetto alla maggior parte degli altri kit e può rilevare un numero di copie di RNA virale fino a 2 copie in un millilitro del campione introdotto (64). Questa strategia ha il potenziale di aumentare il rapporto segnale-rumore e richiede quantità inferiori di materiali, il che si traduce in una maggiore efficienza in termini di costi (65).

Un confronto tra le prestazioni di RT-qPCR con la metodica ddPCR ha dimostrato che qRT-PCR non è in grado di rilevare basse cariche virali a causa della sua sensibilità insufficiente. Un altro importante vantaggio della ddPCR rispetto alla qRT-PCR è che l'uso di micro-diluizioni comporta una minore interferenza degli effetti di qualsiasi inibitore di reazione sul sistema e i risultati sono più ripetibili e robusti (63).

Si può concludere che la ddPCR migliora la procedura per la diagnosi precoce di COVID-19 e anche l'effetto degli interventi terapeutici, ma questa strategia non è adatta per il rilevamento rapido presso i PoC.

N PCR (Nested PCR)

"Nested PCR" è una tecnica che riduce l'amplificazione non specifica del modello di DNA. È eseguita con due PCR successive.

La prima reazione viene eseguita con primer che coprono la sequenza target e qualche sequenza aggiuntiva che fiancheggia entrambe le estremità della sequenza target.

Dopo la prima reazione, viene eseguita una seconda reazione sui prodotti della prima PCR con primer che si legano alla sequenza target e sono all'interno della sequenza amplificata della prima PCR. Ciò riduce la quantità di legami non specifici perché nella seconda reazione, la maggior parte degli ampliconi della prima reazione contiene solo la sequenza bersaglio e le sequenze circostanti. (66)

Il principale punto debole di questa tecnologia è un aumento del rischio di contaminazione dovuto alla sequenza di passaggi manuali, ed è per questo che questa tecnica non è solitamente il test di prima scelta da eseguire nei laboratori clinici. Inoltre, la necessità di eseguire due passaggi manuali di nPCR aumenta il carico di lavoro ed i tempi di esecuzione, il che lo rende non applicabile come test PoC (67, 68).

1.3.1.2 "Isothermal Nucleic Acid Amplification-Based Tests"

A causa degli attuali limiti delle strategie basate sulla PCR, lo sviluppo di potenziali strategie diagnostiche alternative ha suscitato grande interesse a livello globale.

L'amplificazione isotermica dell'acido nucleico è una strategia alternativa con un breve *TaT* (*"turnaround time"*, tempo di completamento del processo) che consente l'amplificazione a temperatura costante ed elimina la necessità di un termociclatore (69, 70).

Tali vantaggi rappresentano il motivo per il quale attualmente alcuni metodi di rilevamento sono in fase di sviluppo o hanno ricevuto l'approvazione sulla base di questo principio.

1.3.1.3 CRISPR/Cas-Based Tests

I sistemi CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) sono strumenti potenti e specifici per il biorilevamento degli acidi nucleici e l'*editing* del genoma in diversi campi.

Una delle applicazioni promettenti è il *DNA o RNA-targeting* in cui il sistema CRISPR/Cas viene utilizzato per la generazione del segnale nella fase di rilevamento in combinazione con una fase di pre-amplificazione aggiuntiva. La precedente procedura di pre-amplificazione è principalmente un'amplificazione isotermica, che aumenta la sensibilità del test amplificando le sequenze target e diminuendo il *LoD* (*"limit of detection"*). Il passaggio finale è la generazione del segnale: la lettura di questi segnali fluorescenti viene eseguita utilizzando gel di agarosio, lo smorzamento della fluorescenza o il rilevamento visivo quando integrato con saggi a flusso laterale (LFA). (71)

I test di rilevazione COVID-19 che utilizzano il sistema CRISPR/Cas sono rapidi, portatili, accurati anche per la rilevazione di variazioni di una singola base, semplici da sviluppare, non necessitano di costosi strumenti o infrastrutture necessarie nei laboratori molecolari tradizionali e hanno costi estremamente bassi. (72)

Questi test richiedono materiali diversi rispetto alla PCR, offrendo una potenziale alternativa in un periodo di carenza di reagenti chimici.

Considerando tutti gli aspetti, i sistemi CRISPR/Cas sono tecnologie innovative e in miglioramento adatte per lo screening su larga scala in contesti "vicini al paziente".

Tuttavia, sono gravati da alcune complicazioni nella preparazione del campione, regioni target limitate e da alcuni problemi nel rilevamento (73). Va notato che le loro applicazioni sono limitate ai test diagnostici di laboratorio a causa di una serie di passaggi manuali di miscelazione e incubazione. La necessità di un'ulteriore fase di amplificazione e di pretrattamento del campione aumenta il carico di lavoro ed il tempo di realizzazione dell'intera procedura (74, 75).

1.3.1.4 DNA-Microarray Based Tests

Il *microarray* è una tecnica preziosa per il rilevamento quantitativo e la genotipizzazione dell'acido nucleico virale. I microarray sono costituiti da migliaia di oligonucleotidi di DNA utilizzati come sonde in grado di identificare diversi acidi nucleici contemporaneamente, esibendo una specificità e una sensibilità significativamente più elevate rispetto ai test mirati ad una sola sequenza (76). Questi test non sono comunemente usati per scopi "Point of Care" e la loro applicazione principale è ottenere informazioni sui livelli di espressione genica, la genotipizzazione, la caratterizzazione del DNA o dell'RNA per il rilevamento di mutazioni e alcune altre nuove applicazioni (77).

Le principali sfide della progettazione di test basati su microarray sono la presenza di sequenze altamente conservate nell'RNA dei coronavirus e l'incidenza di reazioni crociate tra i genomi dei coronavirus (78). Sebbene i costi siano generalmente elevati per i test basati su microarray, sono stati sviluppati anche microarray a basso costo per studiare i ceppi di coronavirus con una sensibilità paragonabile alla qRT-PCR (79).

1.3.1.5 Test basati sul sequenziamento

Il sequenziamento di nuova generazione (*next generation sequencing*, NGS) è un metodo ad alto rendimento per studiare l'intero genoma, alcune parti del materiale genetico o la trascrizione nelle cellule.

Sono state impiegate tre metodiche principali per il sequenziamento dell'RNA SARS-CoV-2: il sequenziamento dell'intero genoma, il sequenziamento diretto dell'RNA ed il sequenziamento metagenomico.

L'esecuzione di questi test richiede attrezzature specifiche e numerosi interventi manuali. La semplificazione e l'automazione future potrebbero trasformare questa strategia in un piano diagnostico di routine riducendo il tempo di esecuzione, la potenziale contaminazione e l'errore umano (80).

1.3.2 Tecnologie "Protein-based": sierologia e test antigenici

Per il rilevamento di SARS-CoV-2 vengono utilizzate due categorie diagnostiche principali: il primo gruppo di metodiche ricerca l'acido nucleico virale ed il secondo cattura polipeptidi specifici nella struttura del virus o nel sangue delle persone con sospetta infezione. (81)

Il materiale genetico di SARS-CoV-2 è un RNA comprendente sei frame di lettura aperti (ORF) responsabili della produzione del nucleocapside (N), della proteina *spike* (S), della membrana (M) e di subunità di proteine strutturali dell'*envelope* (E); il resto dei geni produce 16 proteine funzionali come l'RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRP) e l'elicasi (82). La proteina N si lega all'RNA virale e forma il nucleocapside. Le glicoproteine spike (sottodomini S1 e S2) sono proteine di superficie, densamente glicosilate, che sono coinvolte in varie funzioni nei diversi tessuti: esse hanno un ruolo cruciale nel legame al recettore della cellula ospite, determinando anche il "tropismo" dell'ospite stesso (83) L'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), espresso nelle cellule endoteliali umane nel polmone, nell'intestino, nel cuore e nel rene, è una proteina di superficie e un recettore funzionale per il coronavirus (84). Questa proteina funge da sito di legame diretto per la proteina S del virus; il dominio di legame del recettore (RBD) della subunità S1 della proteina S interagisce direttamente il recettore ACE2 con un'elevata affinità e ha ruoli cruciali

nell’adesione e nella fusione del virus alle cellule ospiti che esprimono ACE2 (85). La proteina M ha un ruolo predominante nella formazione di nuove particelle virali e potrebbe inserire alcune proteine dall’ospite nell’involucro virale (86). La proteina E è la più piccola proteina strutturale che ha ruoli nell’assemblaggio e nella patogenesi del coronavirus (87) La disposizione di queste quattro proteine è diversa tra i coronavirus, ma la loro presenza è fondamentale per le caratteristiche infettive di SARS-CoV-2.

Dopo l'ingresso del coronavirus nell’organismo, il sistema immunitario mette in atto una pronta risposta difensiva agli antigeni virali e produce anticorpi specifici per combattere la malattia (5). Il coronavirus è in grado di indurre un’ampia gamma di stati di malattia, da infezioni asintomatiche a insufficienze respiratorie gravi. I principali sintomi associati a COVID-19 includono febbre, tosse secca, affanno ed astenia. SARS-CoV-2 induce un aumento delle citochine pro-infiammatorie per poi determinare la cosiddetta “tempesta citochinica” nell’organismo del paziente, la quale potrebbe determinare un’insufficienza multi-organo e successivamente l’exitus (88). Studi clinici hanno dimostrato che l'infezione da SARS-CoV-2 è anche in grado di indurre lesioni cardiache, insufficienza renale, lesioni renali, renali, epatiche e cardiache acute. È stato dimostrato che l'età media dell'incidenza di COVID-19 grave associata a neutrofilia, leucocitosi e morte è superiore a quella dei pazienti sopravvissuti, pari a circa di 65 anni.

Da un punto di vista diagnostico, è possibile rilevare antigeni virali specifici o anticorpi specifici contro questi antigeni nei campioni raccolti da pazienti positivi al COVID-19, ad esempio tamponi respiratori, saliva, sangue, siero, feci e altri tipi di campioni (89). Considerando le linee guida pubblicate dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), dalla FDA e dai Centri per la prevenzione ed il controllo delle malattie (CDC), i test basati sull’acido nucleico sono i principali test impiegati per la rilevazione del virus nei casi sospetti ed i test sierologici sono per lo più strumenti qualitativi utili per la conferma del risultato riportato e come test supplementari insieme ad altri dati clinici (47,90).

I **test sierologici** sono stati nel tempo una delle categorie principali di test diagnostici per rilevare le malattie infettive partendo dal rilievo di anticorpi specifici, le immunoglobuline, presenti nell’organismo. Le immunoglobuline vengono secrete dai globuli bianchi, in particolare dai linfociti B, come proteine “protettive” durante l'infezione (91, 92). Ogni anticorpo comprende quattro proteine strutturali, due catene pesanti (H) e due catene leggere

(L); l'estremità N-terminale di tutte le catene rappresenta il sito di legame dell'antigene, specifico per un particolare antigene e diverso dagli altri anticorpi.

Esistono diversi isotipi di anticorpi, tra cui le immunoglobuline M (IgM), IgG e IgA che si distinguono per le loro regioni specifiche situate all'estremità C-terminale della catena pesante.

L'IgG è l'anticorpo maggiormente secreto nel sangue (siero), seguito dalle IgM, mentre l'IgA è abbondante sia nel sangue che in altri liquidi biologici come la saliva e il latte materno. L'espressione degli anticorpi specifici che si legano agli antigeni SARS-CoV-2 è indotta dall'infezione virale (con un principio di "*up-regulation*") (93) Più specificamente, le IgM dimostrano un'elevata espressione nella fase moderata della malattia fino a circa la seconda settimana dell'infezione e iniziano a diminuire, quasi scomparendo, intorno alla settima settimana, mentre l'espressione di IgG è indotta a partire dalla seconda/terza settimana e rimane elevata anche oltre le sette settimane (le durate esatte sono sconosciute) (94, 95).

Il rilevamento delle IgM ha una bassa sensibilità nella fase iniziale dell'infezione, e richiederebbe ripetuti prelievi di campioni ogni giorno. Le IgG non sono l'esame di scelta per lo screening dell'infezione, ma per il follow-up e lo stato di convalescenza dei pazienti, nonché per la determinazione della risposta immune dei casi asintomatici. (96) Rispetto a IgM e IgG, l'IgA ha finora rivestito meno attenzione a fini diagnostici; tuttavia, l'evidenza suggerisce che lo stimolo alla produzione delle IgA avvenga prima anche prima di quello delle IgM e mancano ancora studi sistematici sulle IgA nei pazienti COVID-19. (97)

Le prime generazioni di test per la ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2 si basavano sull'utilizzo di antigeni di SARS-CoV per rilevare gli anticorpi specifici SARS-CoV-2, a causa dell'assenza degli antigeni specifici del nuovo coronavirus in quel momento. (98).

Tutti i test sierologici si basano sulla cattura di anticorpi specifici presenti in una miscela utilizzando il meccanismo di legame antigene-anticorpo (99). Sulla base della letteratura, la maggior parte degli anticorpi anti SARS-CoV-2 sono contro l'antigene N, e ciò rende tale antigene l'obiettivo più *sensibile* per la sierodiagnosi. Gli anticorpi più *specifici* sono contro il dominio S1 della proteina S. Per questo motivo, S1 è suggerito come il bersaglio virale più specifico, mentre S2 ha dimostrato di avere reazioni crociate con anticorpi diretti contro altri coronavirus. Nei primi giorni dopo l'infezione, la sensibilità dei test sierologici è bassa e gli stessi spesso esitano in un risultato falso negativo. Le quantità degli anticorpi non sono sufficientemente elevate per essere rilevate nei campioni prelevati dai pazienti nelle prime fasi dell'infezione, mentre, dopo circa 10-15 giorni e nei casi sintomatici, i test dimostrano una

maggiore sensibilità e specificità nella ricerca degli anticorpi. (100) È interessante notare che il limite dei test sierologici che rilevano gli anticorpi specifici è la probabilità di rilevare una reazione crociata per la presenza di anticorpi preesistenti o per altri motivi. La vaccinazione o una precedente infezione da SARS-CoV-2 potrebbe comportare l'attivazione del sistema immunitario seguita dalla secrezione e della persistenza a lungo termine di una porzione di anticorpi come le IgG specifiche per SARS-CoV-2.

I risultati di tali test dipendono fortemente da numerosi fattori quali il tipo di campione, la condizione clinica del paziente e la fase della malattia al momento della raccolta del campione. In generale, i test anticorpali sono molto appropriati in virtù della loro capacità di rilevare infezioni pregresse, ma sono meno affidabili per la diagnosi precoce di COVID-19 nei primi stadi della malattia perché la sieroconversione si verifica dopo la comparsa dei sintomi. Questi test sono più appropriati se l'esecuzione avviene per la valutazione dello stato di convalescenza, della risposta immunitaria e utilizzati come strumenti di screening per testare il tasso di sieroprevalenza. (101)

1.3.2.1 NIIA (Non-Isotopic Immunoassay)

I test immunoenzimatici (EIA) sono test NIIA (*Laboratory-Based Non-Isotopic Immunoassay Serological Tests*) adatti per il rilevamento o la misurazione in laboratorio di anticorpi specifici nel sangue. In generale, i principali inconvenienti che limitano l'applicazione clinica dei test immunologici sono i costi elevati, la loro complessità e lunga durata che li rende non applicabili come strumento PoC semplice, rapido e "vicino al paziente" (102).

Per il rilevamento di COVID-19 vengono spesso impiegate varianti EIA, inclusi in particolare i test immunologici a chemiluminescenza (CLIA) e il saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (ELISA); sono anche i metodi sierologici di routine per il follow-up della convalescenza e la quantificazione di varie molecole, inclusi anticorpi e ormoni.

CLIA (Chemiluminescence Immunoassays)

CLIA (*Chemiluminescence Immunoassays*) è uno dei test immunologici più diffusi che utilizza marcatori chemiluminescenti o emettitori di luce per il rilevamento di biomolecole presenti nel sangue, nel siero o nel plasma in un tempo totale di circa 1-2 ore (103). In questa tecnologia, gli antigeni ricombinanti marcati con materiali chemiluminescenti formano complessi con gli anticorpi specifici quando il campione positivo viene introdotto nel micropozzetto, e ciò è seguito dalla fase di rilevamento del segnale luminoso grazie all'utilizzo di apposite apparecchiature. (104) I test CLIA richiedono una bassa quantità di

antigene e un tempo di esecuzione più breve rispetto ad altre tecniche. Questa tecnologia è nota essere un metodo sensibile per rilevare piccole quantità di proteine con un elevato rendimento; tuttavia, potrebbero esserci dei problemi durante la misurazione o dei problemi di solubilità del composto.

I test diagnostici proposti basati su CLIA per il rilevamento di SARS-CoV-2 hanno utilizzato principalmente antigeni virali N o S o una loro combinazione (105). Sulla base della letteratura, il dominio RBD dell'antigene S e l'antigene N rappresentano il bersaglio migliore da utilizzare per la rilevazione di IgM/IgG o anticorpi totali. L'accuratezza più alta riportata per la tecnica CLIA è quella legata alla ricerca delle IgG anti-RBD (106). Va tuttavia sottolineato che molti fattori, come il tempo di raccolta del campione e la fase della malattia, influenzano le prestazioni di questi test.

Molti ricercatori e produttori hanno sviluppato test diagnostici basati su varianti CLIA, come il test immunologico a elettrochemiluminescenza (ECLIA) ed il test immunologico a microparticelle a chemiluminescenza (CMIA). La principale differenza tra ECLIA e CLIA è la tecnica di generazione della chemiluminescenza, le reazioni elettrochimiche in ECLIA e le reazioni chimiche in CLIA.

Long e colleghi hanno studiato IgM e IgG utilizzando una combinazione di antigeni S e N in 363 campioni di pazienti positivi al COVID-19 e hanno osservato una sierologia positiva per IgG e IgM al giorno 13 dopo l'insorgenza dei sintomi e una sieroconversione del 100% per IgG al giorno 20. (107)

Lin e colleghi ha sviluppato un metodo di chemiluminescenza-immunodosaggio utilizzando sfere magnetiche e antigene N ricombinante per la rilevazione di COVID-19. Il test ha ottenuto una sensibilità del 60,76% per le IgM e del 92,25% per le IgG. La specificità del test per IgM e IgG era rispettivamente del 92,25% e del 97,5%. Hanno concluso che IgG CLIA è più accurato rispetto a IgM CLIA e adatto per essere integrato con RT-PCR per migliorare il rilevamento clinico (108).

Nella Figura seguente, sono riportati alcuni test basati sulla metodica CLIA, alcuni dei quali sono stati utilizzati nella raccolta dati per il presente lavoro di Tesi, con le loro caratteristiche tecniche.

Table 1. Selected approved CLIA-based tests as Lab-based and high throughput COVID-19 detection strategies based on FDA Serology Test Performance [44].

Company	Test	Technology	Target	Antigen	Sensitivity (Day 15 after Symptom Onset)	Specificity	Throughput
Ortho Clinical Diagnostics, Inc.	VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack	CLIA	Total Antibody	S	100%	100%	150 tests/h with one result in 48 min
Beckman Coulter, Inc.	Access SARS-CoV-2 IgG	Automated CLIA	IgG	S	96.8%	99.6%	50–200 tests/h
Babson Diagnostics, Inc.	Babson Diagnostics aC19G1	Fully Automated CLIA	IgG	S	100%	100%	440 tests/h
Ortho Clinical Diagnostics, Inc.	VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 IgG Reagent Pack	CLIA	IgG	S	90.0%	100%	150 tests/h
Siemens Healthcare Diagnostics Inc.	ADVIA Centaur SARS-CoV-2 Total (COV2T)	Automated-Semi-quantitative CMIA	Total Antibody	S	100%	99.8%	240 samples/h with one result in 18 min
Siemens Healthcare Diagnostics Inc.	Atellica IM SARS-CoV-2 Total (COV2T)	Automated CMIA	Total Antibody	S	100%	99.8%	440 tests/h with one result in 10 min
DiaSorin	LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG	Complex Automated CLIA	IgG	S (S1/S2)	97.6%	99.3%	170 tests/h and 35 min time to first result
Vibrant America Clinical Labs	Vibrant COVID-19 Ab Assay	CLIA	IgM and IgG	S and N	98.1%	98.6%	24–36 h
SNIBE Diagnostic	MAGLUMI 2019-nCoV IgM/IgG	Automated CLIA	IgM and IgG	S and N	64.3%	100%	30 min for one test
Diazyme Laboratories, Inc.	Diazyme SARS-CoV-2 IgM CLIA test	CLIA	IgM	S and N	94.4%	98.3%	50 tests/h
Diazyme Laboratories, Inc.	Diazyme DZ-Lite SARS-CoV-2 IgG CLIA Kit	Automated CLIA	IgG	S and N	100%	97.4%	50 tests/h
Roche Diagnostics	Elecsys Anti-SARS-CoV-2	ECLIA	Total Antibody	N	100%	99.8%	300 tests/h
Abbott Laboratories Inc.	Architect SARS-CoV-2 IgG	CMIA	IgG	N	100%	99.6%	100 samples in 70 min
Abbott Laboratories Inc.	Alinity i SARS-CoV-2 IgG	CMIA	IgG	N	100%	99.0%	4000 tests in 24 h, with a 29 min time to first result

Figura 10 – *i principali test basati su metodica CLIA* (81)

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

L'ELISA *(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* è uno dei metodi più frequentemente utilizzati per il rilievo sierologico dell'infezione in circa 1–5 h. L'ELISA, come la versione manuale della CLIA automatizzata, è un test basato su micropozzetti/piastre che impiega un antigene di cattura immobilizzato e un antigene secondario/tracciante che si lega ad anticorpi specifici nel siero, nel plasma e/o in campioni di sangue intero, con conseguente generazione di fluorescenza o cambiamento di colore visibile in virtù di un un substrato cromogenico dotato di attività enzimatica (109). I vantaggi dell'ELISA sono la sensibilità e la specificità, la capacità di rilevazione di infezione in atto e pregressa, i costi inferiori rispetto al CLIA e l'elevato rendimento. D'altra parte, alcune svantaggi come la preparazione del campione, che richiede un volume di campione elevato, la probabilità di falsi positivi, la variabilità degli anticorpi, le procedure manuali e l'elevato carico di lavoro, nonché le probabili reazioni crociate hanno limitato le applicazioni.

Per la diagnosi di COVID-19 basata su ELISA, i ricercatori evidenziano la risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2, con la possibilità di distinguere tra infezione recente e pregressa. Sulla base alla Letteratura esistente, la produzione di IgM e le IgG è maggiormente rappresentata rispetto a quella delle IgA e le prime due agiscono come bersagli migliori nelle indagini sul COVID-19. Tuttavia, gli studi hanno dimostrato che anche le IgA aumentano in risposta all'infezione ed alcuni test sono stati sviluppati per ricercare questi anticorpi nel sangue o nei campioni di siero (110).

Sebbene alcuni test utilizzino l'antigene S intero come *target*, si fa comunemente riferimento all'uso di peptidi più corti, specifici di questa proteina, come il dominio RBD. Un gruppo di ricerca ha sviluppato due differenti versioni del test ELISA per il rilevamento di anticorpi specifici S utilizzando la proteina S a lunghezza intera e il dominio RBD. I dati hanno rivelato che la reattività di entrambi gli antigeni era elevata, con una reattività significativamente maggiore per l'antigene S (111). Okba et al. ha anche valutato l'efficacia dell'antigene S e dei suoi domini S1 e RBD utilizzando diversi kit ELISA. Hanno osservato che le proteine RBD e N hanno ottenuto i migliori risultati nel caso di pazienti con sintomi lievi e, quando sono state testate utilizzando campioni del paziente in quattordicesima giornata dopo l'insorgenza dei sintomi, l'ELISA RBD aveva una sensibilità del 100% per le IgG e del 94% per le IgM, mentre, per la proteina N, la specificità del targeting di IgG e IgM era rispettivamente del 94% e dell'88%. Hanno anche osservato che, quando la molecola target è S1 e gli obiettivi sono IgA e IgG, IgA ELISA mostra una migliore sensibilità e IgG mostra una migliore specificità (112).

1.3.2.2 FIA (Fluorescence Immunoassay)

FIA *(Lab-based Fluorescence Immunoassay)* è un test immunologico quantitativo basato su fluorescenza, una tecnica biochimica che rileva il legame dell'anticorpo di cattura con l'analita desiderato. Questa tecnologia utilizza un materiale fluorescente che emette energia o luce come segnale fluorescente. In questa tecnica, coloranti fluorescenti come FITC forniscono il segnale e un fluorimetro per micropiastre lo misura (113).

Il test immunologico a microsfere fluorescenti (FMIA) viene utilizzato come metodo quantitativo o semiquantitativo per la diagnosi di COVID-19. Rispetto all'ELISA, la FMIA ha il vantaggio di essere più accurata ed economicamente vantaggiosa, rileva l'infezione utilizzando campioni sia di siero che campioni diversi, e non sono necessari cicli di diluizione per eseguire un test semiquantitativo (114). Questa tecnologia richiede un piccolo volume di campione e rileva simultaneamente più bersagli (115). Tuttavia, il numero di test sviluppati utilizzando FMIA è inferiore rispetto ad altre tecniche.

1.3.2.3 Test sierologici rapidi "lateral flow"

Rispetto alle strategie diagnostiche di laboratorio, i test sierologici rapidi hanno avuto ampia diffusione poiché sono eseguibili al letto del paziente o anche a casa per uno screening rapido e semplice mirato alla rilevazione degli anticorpi specifici contro i patogeni.

Presentano, tuttavia, diversi difetti come la scarsa accuratezza clinica, l'elevata dipendenza dallo stadio della malattia e la mancanza della capacità di distinguere gli anticorpi

neutralizzanti. Sebbene i test diagnostici rapidi richiedano un aggiornamento per superare queste limitazioni, svolgono un ruolo fondamentale negli studi epidemiologici (81).

Quasi tutti i test sierologici rapidi per il rilevamento di SARS-CoV-2 sono dispositivi basati su cassette che si basano su LFIA o sui cosiddetti test immunocromatografici su striscia (IST). I saggi a flusso laterale (LFA) sono strip cartacee per il rilevamento PoC di malattie infettive come COVID-19; sono test portatili, veloci, di facile utilizzo e non richiedono strumentazione complessa ed una particolare formazione tecnica. Come per altri saggi immunologici, il metodo si basa su una reazione antigene-anticorpo. Per eseguire l'analisi si immerge la strip nel campione liquido. Se l'analita è presente nel campione, entro cinque minuti sulla strip appare una banda colorata. Questa valutazione visiva consente un'analisi qualitativa e semiquantitativa. Con un lettore LFD è poi possibile analizzare la strip quantitativamente.

Uno dei vantaggi di questo test è la capacità di implementare più test e bande di controllo contemporaneamente per rilevare rapidamente più analiti in un singolo campione. (116)

La diagnostica sierologica rapida in vitro (qualitativa o semiquantitativa è significativamente conveniente e fornisce i risultati entro 5-30 minuti. L'utilizzo di tali dispositivi non richiede personale di laboratorio addestrato e sono applicabili in ospedali, pronto soccorso e altre strutture di assistenza ai pazienti.

Nelle strisce LFIA, il primo passaggio consiste nell'utilizzare un metodo colorimetrico per rilevare la presenza dell'analita o degli analiti specifici. A tal fine, gli elementi di bioriconoscimento sono fissati nella/e linea/e di test ed è presente una linea di controllo per confermare la validità del test (117). Per il rilevamento PoC dell'infezione, la potenziale strategia di monitoraggio si basa sul cambiamento di colore visibile ad occhio nudo. L'oro colloidale (AuNP) è di solito il rilevatore maggiormente utilizzato nei test rapidi in commercio, grazie alla sua stabilità a lungo termine, facilità d'uso, rilevamento rapido in loco, bassi costi e risultati della lettura visiva, essendo inoltre altamente biocompatibile e di tossicità biologica trascurabile. Tuttavia, gli LFIA basati su AuNP non sono in grado di eseguire misurazioni quantitative. Un altro inconveniente di queste strisce è la minore sensibilità rispetto alla rilevazione basata sull'utilizzo di lettori.

Tutti i test basati sulla metodica LFIA richiedono una piccola quantità (10-20 µL) di campione dal paziente ed i risultati vengono riportati in circa 30 minuti. (118)

Panagiota I. Kontou e colleghi hanno valutato i test IgG e IgM basati su ELISA, CLIA, FIA e LFIA in campioni positivi a COVID-19 in una revisione sistematica. I risultati hanno mostrato che i test che utilizzano come target l'antigene S sono più sensibili di quelli basati sull'antigene N. È stato anche dimostrato che i test IgG hanno prestazioni migliori e mostrano

una migliore sensibilità quando i pazienti si trovano a diversi giorni dall'inizio dei sintomi. Tuttavia, la combinazione di entrambi gli anticorpi (IgG e IgM) ha ottenuto il miglior risultato. I test basati su ELISA e CLIA hanno raggiunto la migliore sensibilità di circa il 90-94%, questo valore variava dall'80% all'89% per LFIA e FIA (98).

Dai dati presenti in Letteratura, l'accuratezza dei test LFIA è inferiore rispetto ai test qRT-PCR. In generale, a causa della loro minore sensibilità e di un più alto tasso di reattività crociata con altri agenti patogeni respiratori, risultanti rispettivamente in falsi negativi e falsi positivi, è preferibile utilizzare test LFIA rapidi come test supplementari per confermare i risultati della RT-PCR, in particolare quando il campione restituisce un esito negativo (118).

1.3.2.4 Protein microarray

I test microarray proteici sono metodiche con capacità uniche poichè sfruttano una nuova promettente tecnologia proteomica che esegue test ad alto rendimento, in grado di ricercare analiti presenti in piccole quantità nei campioni (120).

Gli array proteici permettono una misurazione diretta dei prodotti genici, con l'obiettivo di definire la quantità, le modificazioni, l'attività, la localizzazione e le interazioni di tutte le proteine del campione in esame. Un microarray proteico è costituito da un supporto solido (slide) sul quale diversi reagenti (proteine purificate, peptidi, anticorpi, allergeni ecc…) sono depositati ("spottati") in maniera ordinata e ad una specifica e definita densità (fino a 500 molecole/spot di 150mm). Ognuno di questi agenti cattura la propria proteina target, isolandola così da una miscela complessa, quale può essere, per esempio, un lisato cellulare, e le proteine catturate vengono successivamente evidenziate e quantificate o valutate per quanto concerne la loro attività, le modificazioni, le interazioni proteina-proteina. (119)

ELISA e LFIA sono in grado di ricercare una o poche proteine; al contrario, i microarray proteici forniscono una caratterizzazione "proteome-wide" degli anticorpi presenti in risposta agli antigeni SARS-CoV-2 (121). Il genoma SARS-CoV-2 codifica per 28 proteine di cui 5 strutturali, 15 non strutturali e 8 accessorie; polipeptidi specifici da queste 28 proteine possono essere impiegati per la fabbricazione di array specifici SARS-CoV-2.

Il limite principale dei microarray proteici è il tempo di risposta più elevato rispetto alla maggior parte dei test sierologici e la durata totale di questo test richiede meno di 24 ore, compresa la preparazione del campione per l'analisi dei dati (122).

Jiang e colleghi hanno utilizzato un microarray di anticorpi per profilare le risposte di convalescenza IgG/IgM specifiche per SARS-CoV-2 (121): i risultati hanno chiaramente

illustrato che le proteine S1 e N sono adatte per il rilevamento, S1 con una sensibilità maggiore rispetto alla proteina N. Anche le risposte degli anticorpi alle proteine ORF9b e NSP5 erano significative.

1.3.2.5 I test antigenici rapidi

I test antigenici sono la seconda categoria di test a base di proteine che è stata immessa sul mercato. Questa strategia si basa sulla cattura degli antigeni virali specifici, presenti in una miscela, utilizzando un attacco anticorpo-antigene per rilevare direttamente la presenza delle particelle virali (123). Attualmente, LFIA è la tecnologia preferita per lo sviluppo di PoC rapidi e test antigenici da eseguire presso il domicilio.

Le prestazioni cliniche di questi strumenti dipendono enormemente da vari fattori e dalla situazione del paziente. La finestra di tempo migliore per rilevare gli antigeni virali è la prima settimana dopo l'infezione. La carica virale è elevata in tale lasso di tempo ed i test antigenici dimostrano le loro migliori prestazioni; tale carica diminuisce durante il tempo, il che si traduce in una diminuzione dell'accuratezza del test antigenici nelle fasi successive della malattia (124). Un altro fattore è il tipo di campione che potrebbe influenzare direttamente i risultati del test. La maggior parte degli attuali test di rilevamento dell'antigene si basano su campioni nasofaringei; diversi kit, invece, testano campioni nasali ed alcuni rilevano gli antigeni nei campioni salivari.

La proteina più frequentemente presente nella struttura SARS-CoV-2 è la proteina N, una fosfoproteina evolutiva conservata e altamente immunogena. La proteina S, in particolare nel sottodominio S1 RBD, è un'altra proteina immunogena sulla superficie delle particelle virali, con rare variazioni negli amminoacidi. Tutti i test di rilevamento dell'antigene applicano anticorpi specifici contro le proteine di SARS-CoV-2, più frequentemente contro l'antigene N. I test antigenici rapidi presentano alcuni vantaggi rispetto alla PCR, quali costi inferiori e velocità più elevate. Sono altamente specifici per SARS-CoV-2 ma dimostrano una bassa sensibilità; questo è uno dei principali limiti attuali dei test antigenici.

Una parte dei test antigenici sviluppati impiegano nanoparticelle di oro colloidale come substrato per il rilevamento visivo dell'infezione. Diversi altri kit richiedono, invece, uno strumento specifico per la fase di rilevamento (lettore).

Lin et al. hanno sviluppato un test immunologico microfluidico PoC per il rilevamento simultaneo degli antigeni IgG/IgM/SARS-CoV-2 in 15 minuti. Quando il campione è positivo al COVID-19, i marker di SARS-CoV-2 si attaccano agli anticorpi di cattura che sono rivestiti

con FMS (microsfere fluorescenti) ed il complesso formato viene immobilizzato sulla regione di fluorescenza del test tramite una seconda interazione dovuta all'interazione antigene-anticorpo. Dopo 10 minuti, l'analizzatore di fluorescenza portatile riporta i risultati (125).

1.4 La vaccinazione

Da quando, l'11 gennaio 2020, è stata pubblicata la sequenza genetica del virus SARS-CoV-2, scienziati, industrie e altre organizzazioni in tutto il mondo hanno collaborato per sviluppare il prima possibile vaccini sicuri ed efficaci contro il COVID-19.

L'obiettivo di tutti questi vaccini è quello di produrre una risposta immunitaria al fine di neutralizzare il virus e impedire l'infezione delle cellule. Le principali piattaforme utilizzate sono le seguenti:

- *vaccini virali inattivati*: prodotti coltivando il virus SARS-CoV-2 in colture cellulari e inattivandolo chimicamente;
- *vaccini vivi attenuati*: prodotti generando una versione geneticamente indebolita del virus che si replica in misura limitata, non causando la malattia ma inducendo risposte immunitarie simili a quelle indotte dall'infezione naturale;
- *vaccini proteici ricombinanti*: basati sulla proteina spike, o sul "receptor binding domain" (RBD) o su particelle simili a virus;
- *vaccini a vettore virale*: tipicamente basati su un virus esistente (generalmente un adenovirus incompetente per la replicazione) che trasporta la sequenza del codice genetico che codifica per la proteina spike;
- *vaccini a DNA*: basati su plasmidi, modificati in modo da trasportare geni che codificano in genere per la proteina spike che viene poi prodotta nell'individuo vaccinato;
- *vaccini a RNA*: basati su RNA messaggero (mRNA) o un RNA autoreplicante che fornisce l'informazione genetica per la proteina spike. (126)

I vaccini inattivati rappresentano l'opzione più "rapida" per i vaccini antivirali, che sono ottenuti da cellule infettate dal virus. Questo metodo è stato inventato per la prima volta nel 1940 utilizzando embrioni di pollo per produrre il vaccino antinfluenzale (127). Ad oggi, per inattivare i coronavirus sono stati utilizzati vari metodi chimici e fisici, incluso l'uso di formalina, formaldeide, β-propiolattone e raggi UV o una combinazione di questi metodi (128). Le subunità di questi virus inattivati sono comunemente usate per produrre anticorpi perché l'uso di virus interi aumenta il rischio di reattogenicità.

Poiché questi vaccini forniscono un'immunità più debole rispetto ai vaccini con virus vivo attenuato, è necessario l'uso di adiuvanti per ottenere una risposta immunitaria efficace e robusta (129).

Sebbene l'uso di vaccini inattivati sia uno dei metodi di immunizzazione comunemente utilizzato in tutto il mondo, questo comporta anche degli svantaggi, quali, ad esempio, il loro breve periodo di immunità. (130) I vaccini precedentemente inattivati contro SARS-CoV hanno mostrato che i livelli di IgG antivirali sono diminuiti rapidamente 16 mesi dopo l'inoculazione (131).

Un'altra tecnologia vaccinale per combattere SARS-CoV-2 è rappresentata dai vaccini proteici ricombinanti. Questi vaccini dipendono fortemente dagli adiuvanti per aumentare la loro immunogenicità: i peptidi, come gli RNA, sono generalmente instabili e quindi si trovano all'interno di nanoparticelle adsorbite su adiuvanti. Diverse subunità della proteina S, inclusi RBD e RBD-Fc, ed il dominio N-terminale della proteina S hanno mostrato diversi gradi di protezione e risposte immunitarie in vari modelli animali (132, 133). Il processo di preparazione di questi vaccini prevede che i geni, che codificano per i componenti antigenici predominanti del virus, siano clonati ed espressi in vari sistemi come, ad esempio, cellule batteriche o cellule di mammifero, e successivamente purificati. Questi prodotti ricombinanti sono usati per produrre vaccini stabili. Il tipo di adiuvante può alterare gli effetti del vaccino e talvolta l'uso di più adiuvanti in combinazione può avere effetti sinergici sul livello della risposta immunitaria. Tra i vantaggi di questi vaccini vi sono la loro sicurezza ed efficacia in termini di costi, e le loro limitazioni includono, come già esposto in precedenza, la necessità di adiuvanti per ottenere una risposta immunitaria a lungo termine.

Tra i vaccini a vettore virale, la maggior parte di essi si basa su adenovirus. Gli adenovirus sono virus a DNA a doppio filamento che vengono inattivati eliminando le regioni geniche E1A ed E1B regione. (134) Questi vaccini inducono intense risposte immunitarie e stimolano sia l'immunità umorale che quella cellulo-mediata.

I vettori ad adenovirus sono caratterizzati dalla facile crescita di questi virus ad alto titolo nelle linee cellulari, dall'elevata espressione del transgene e dall'efficace trasduzione, nonché da un'ampia gamma di tropismo virale (135). Uno dei limiti dei vaccini a vettore virale è che la maggior parte delle persone presenta una precedente immunità a diversi ceppi di adenovirus (patogeni delle infezioni delle vie respiratorie superiori) o si immunizza rapidamente dopo la prima dose di vaccino (136). Un modo per superare questo problema è utilizzare vettori adenovirali alternativi e vettori derivati da adenovirus non umani, che sono meno comuni negli esseri umani. AstraZeneca, Johnson & Johnson e Sputnik V sono tra i vaccini SARS-CoV-2 appartenenti a questa tipologia, che attualmente vengono somministrati in molti paesi. (137)

Una delle cause che determina la severità dell'infezione COVID-19 è rappresentata dallo squilibrio nella produzione di diverse cellule immunitarie, per cui l'aumento dei linfociti T CD3+ CD8+ è associato alla diminuzione dei monociti CD14+ HLA-DR+ (138). Pertanto, il punto considerato cruciale nella progettazione dei vaccini è quello di produrre una risposta immunitaria efficace senza creare un tale squilibrio. I vaccini a DNA inseriscono geni che codificano per un antigene nelle cellule ospiti, in particolare le cellule presentanti l'antigene (APC), utilizzando plasmidi di DNA come vettore. Il materiale genetico così fornito si localizza all'interno del nucleo cellulare; il promotore nel vettore viene quindi attivato e la trascrizione dei geni bersaglio viene eseguita dalla cellula ospite (139). Il metodo utilizzato per veicolare il DNA plasmidico nelle cellule è l'elettroporazione, che utilizza brevi impulsi elettrici per creare una penetrazione temporanea e reversibile nella membrana cellulare. Questa rottura della membrana consente a grandi molecole come i plasmidi di entrare nelle cellule. I vantaggi di questi vaccini sono la non infettività, la facile produzione in breve tempo, l'economicità e la stabilità. Inoltre, uno dei vantaggi dei vaccini a DNA è una maggiore stabilità termica, pertanto, questi vaccini hanno meno requisiti di refrigerazione rispetto ai vaccini mRNA.

I vaccini a base di mRNA contengono molecole di mRNA che codificano per antigeni proteici. Un modo per superare l'instabilità dell'mRNA è posizionare molecole di mRNA all'interno di nanoparticelle lipidiche, le quali agiscono anche come adiuvanti e inducono la risposta immunitaria B-cellulare e T-helper follicolare (140). In questo tipo di vaccino, la molecola di mRNA viene iniettata direttamente nella cellula ospite e tradotta nella proteina bersaglio all'interno citoplasma. La struttura generale dei vaccini mRNA contiene una cornice di lettura aperta (ORF) con una coda poliadenilata all'estremità 3′ che può indurre entrambe le risposte immunitarie (cellulare e umorale) (141). I vaccini a base di mRNA presentano alcuni vantaggi rispetto ad altri vaccini: non vi è alcun rischio di infezione durante la produzione del vaccino; l'esame di modelli murini ha mostrato che le vaccinazioni ripetute con vaccini mRNA sono associate ad immunità a lungo termine; poiché non è necessario entrare nel nucleo cellulare per l'espressione dell'antigene, non vi è alcuna possibilità di creare mutazioni inserzionali (142). Finora, la tecnologia dei vaccini basata sull'mRNA è stata utilizzata per produrre vaccini contro varie malattie infettive, tra cui Ebola, virus respiratorio sinciziale, virus dell'influenza e HIV.

I vaccini mRNA anti SARS-CoV-2 maggiormente studiati, quali Comirnaty (BNT162b2, della ditta BioNTech/Pfizer) e Spikevax (mRNA-1273, di Moderna), sono incorporati in nanoparticelle lipidiche (LNP) e codificano per la proteina S a lunghezza intera ancorata alla

membrana (BNT162b2) e per il dominio di legame del recettore secreto (BNT162b1) di SARS-CoV-2 (143).

I vaccini BioNTech e Moderna richiedono delle dosi di richiamo per garantire un'elevata titolazione anticorpale e sicurezza a lungo termine. Tuttavia, la risposta dell'anticorpo al dominio di legame del recettore in entrambi i vaccini ha mostrato un titolo anticorpale più elevato rispetto ai pazienti che si stanno riprendendo da COVID-19 (144).

Uno dei principali vantaggi dei vaccini a base di acido nucleico è il breve tempo necessario dalla progettazione; pertanto, testare questi vaccini contro varie probabili mutazioni che si verificano nel virus SARS è facilmente e rapidamente possibile (145).

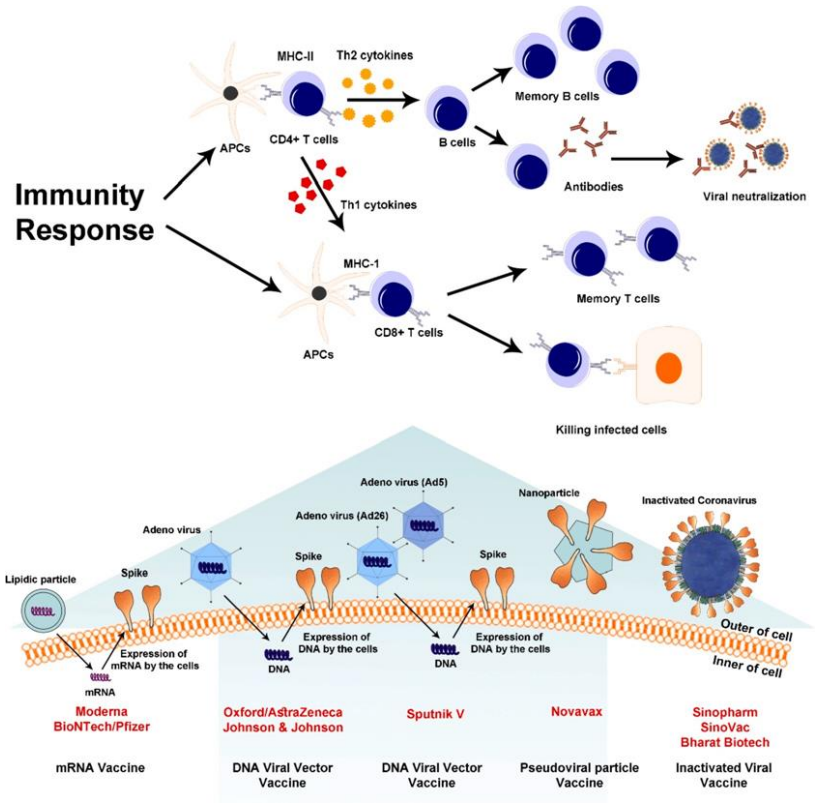


Figura 11 – *I differenti tipi di vaccino anti SARS-CoV-2 e la risposta immunitaria evocata* (129)

I vaccini attualmente autorizzati e utilizzati in Italia nella campagna di vaccinazione per COVID-19 sono 4:

- Comirnaty (Pfizer/BioNTech), vaccino a mRNA autorizzato dal 22/12/2020 e utilizzato dal 27/12/2020;

- Spikevax (Moderna), vaccino a mRNA autorizzato dal 07/01/2021 e utilizzato dal 14/01/2021;
- Vaxzevria (AstraZeneca), vaccino a vettore virale ricombinante autorizzato dal 29/01/2021 e utilizzato dal 01/02/2021;
- COVID-19 Vaccino Janssen (Janssen Cilag), vaccino a vettore virale autorizzato dal 12/03/2021 e utilizzato dal 22/04/2021. (146)

Comirnaty è il vaccino attualmente più utilizzato nella campagna vaccinale italiana (71,2%), seguito da Vaxzevria (14,5%), Spikevax (12,5%) e COVID-19 Vaccino Janssen (1,8%)

Alla data di oggi, 7 febbraio 2022, il 61,4% della popolazione mondiale ha ricevuto almeno una dose di vaccino COVID-19. Sono state somministrate 10,22 miliardi di dosi a livello globale ed attualmente ne vengono somministrate 23,37 milioni ogni giorno. (147)

In Italia sono state somministrate 130.896.357 dosi di vaccino, le persone con almeno una somministrazione sono 49.275.967 (91,23 % della popolazione over 12), le persone che hanno completato il ciclo vaccinale sono 47.757.907 (88,42 % della popolazione over 12). (148)

1.5 Le varianti emergenti

Come noto dalla letteratura, mutazioni adattative nel genoma virale possono alterare il potenziale patogeno del virus (149).

Anche un singolo scambio di amminoacidi può influenzare drasticamente la capacità di un virus di eludere il sistema immunitario e complicare il progresso dello sviluppo di misure preventive e protettive. (150)

SARS-CoV-2, come altri virus a RNA, è soggetto all'evoluzione genetica, nel processo di adattamento all'ospite, con lo sviluppo di mutazioni e conseguente comparsa di molteplici varianti che possono avere caratteristiche diverse rispetto ai suoi ceppi originali.

Il sequenziamento genomico periodico dei campioni virali aiuta a rilevare eventuali nuove varianti genetiche di SARS-CoV-2 che circolano nelle comunità, soprattutto in un contesto pandemico globale.

L'evoluzione genetica di SARS-CoV-2 è stata minima durante la fase iniziale della pandemia con l'emergere di una variante globalmente dominante chiamata D614G, che era associata a una maggiore trasmissibilità ma senza una maggiore gravità della malattia. (151) Un'altra variante è stata identificata nell'uomo, attribuita alla trasmissione da visoni da allevamento in Danimarca, che non era associata a una maggiore trasmissibilità. (152)

Da allora sono state descritte molteplici varianti di SARS-CoV-2, di cui alcune sono considerate varianti "preoccupanti" (VOC, *Variant Of Concern*), dato il loro impatto sulla salute pubblica. Le VOC sono associate a una maggiore trasmissibilità o virulenza, riduzione della neutralizzazione da parte degli anticorpi ottenuti attraverso l'infezione naturale o la vaccinazione, capacità di eludere il rilevamento e diminuzione dell'efficacia terapeutica o della vaccinazione.

Sulla base del recente aggiornamento epidemiologico dell'OMS, all'11 dicembre 2021 sono stati identificate cinque VOC SARS-CoV-2 dall'inizio della pandemia:

- Alfa (B.1.1.7): prima variante descritta nel Regno Unito (Regno Unito) a fine dicembre 2020;
- Beta (B.1.351): segnalata per la prima volta in Sud Africa a dicembre 2020;
- Gamma (P.1): segnalata per la prima volta in Brasile all'inizio di gennaio 2021;
- Delta (B.1.617.2): segnalata per la prima volta in India nel dicembre 2020;

- Omicron (B.1.1.529): segnalata per la prima volta in Sud Africa nel novembre 2021.

Tutti le VOC segnalate -Alpha (B.1.1.7); Beta (B.1.351); Gamma (P.1); Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529) - hanno mutazioni nell'RBD (dominio di legame per il recettore) e nell'NTD (dominio N-terminale), di cui la mutazione N501Y situata sull'RBD è comune a tutte le varianti (tranne la variante Delta) e si traduce in una maggiore affinità della proteina spike con i recettori ACE 2, migliorando così l'attacco virale e il suo successivo ingresso nelle cellule ospiti. Insieme all'NBD, l'RBD funge da bersaglio per gli anticorpi neutralizzanti e facilita la produzione anticorpale in risposta ad antisieri o vaccini. (153)

Due recenti pubblicazioni preliminari hanno riportato che una singola mutazione di N501Y da sola aumenta l'affinità tra RBD e ACE2 circa dieci volte di più rispetto al ceppo ancestrale (N501-RBD).

Nonostante la straordinaria velocità di sviluppo del vaccino contro COVID-19 e i continui sforzi di vaccinazione di massa, il continuo emergere di nuovi ceppi varianti di SARS-CoV-2 minaccia di ribaltare i significativi progressi compiuti finora nell'arrestare la diffusione della pandemia.

Per quanto concerne invece le "varianti di interesse" (*Variants of interest*, VOIs) sono disponibili prove sulle proprietà genomiche, epidemiologiche o in vitro che potrebbero implicare un impatto significativo sulla trasmissibilità, gravità e/o immunità, con un impatto realistico sulla situazione epidemiologica. Tuttavia, l'evidenza è ancora preliminare o è associata a grande incertezza.

Sin dall'inizio della pandemia, l'OMS ha descritto otto varianti di interesse (VOI):

- Epsilon (B.1.427 e B.1.429);
- Zeta (P.2);
- Eta (B.1.525);
- Theta (P.3);
- Iota (B.1.526);
- Kappa (B.1.617.1);
- Lambda (C.37) e
- Mu (B.1.621).

Secondo le indicazioni del Centro Europeo per la Prevenzione e Controllo delle Malattie (ECDC) per la sorveglianza genomica, il numero di sequenziamenti da effettuare nei diversi

paesi deve essere tale da garantire l'identificazione di varianti che circolano con una prevalenza del 5% o inferiore. Attualmente nei report ECDC che monitorano le attività di sequenziamento, l'Italia è sempre collocata tra i Paesi europei che rispettano tale livello di performance. L'Italia, infatti, oggi sequenzia una percentuale di campioni positivi che permette di stimare la proporzione di varianti con una precisione sufficiente ad intercettare una prevalenza compresa tra 1% e 2.5%. (154)

In base all'indagine rapida più recente (03/01/2022), la variante prevalente in Italia è la variante Omicron, presente nell'80,75% (range regionale: 33,3% - 100%) dei campioni esaminati su tutto il territorio nazionale, in aumento rispetto alla precedente indagine rapida (20/12/2021), dove la prevalenza era stata stimata al 21% a livello nazionale (range regionale: 3,0%-65,0%). La variante Delta è stata individuata in quasi tutte le Regioni/PPAA; la prevalenza di tale variante si attesta al 19,22% a livello nazionale (range regionale: 0,0%-66,7%), ben al di sotto del valore osservato nell'indagine rapida precedente (20/12/2021), con prevalenza pari al 79% (range regionale: 35,0%-97,0%). L'indagine rapida non ha invece evidenziato la presenza, sul territorio nazionale, della variante Gamma e della variante Beta.

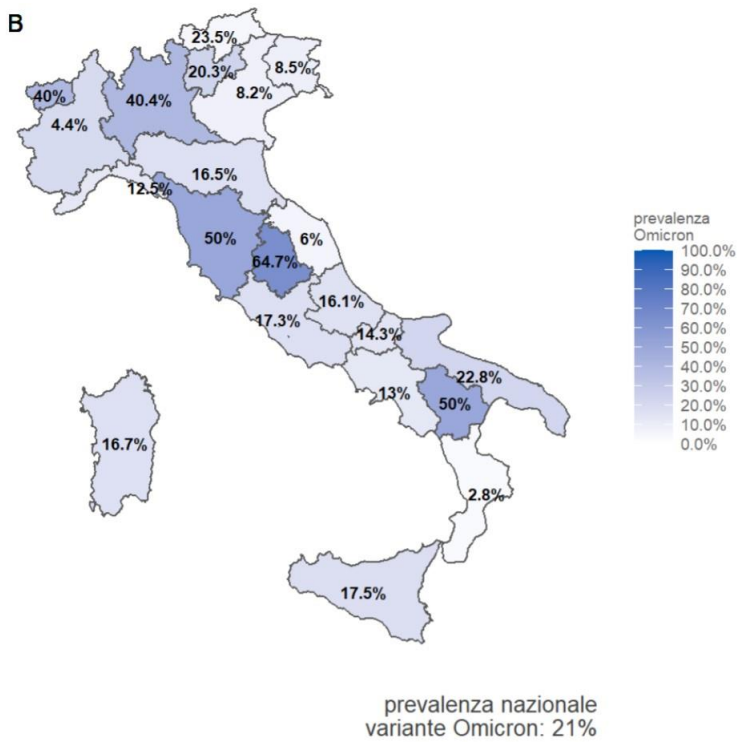


Figura 12 - *prevalenza della variante Omicron in Italia, al 20 Dicembre 2021* (154)

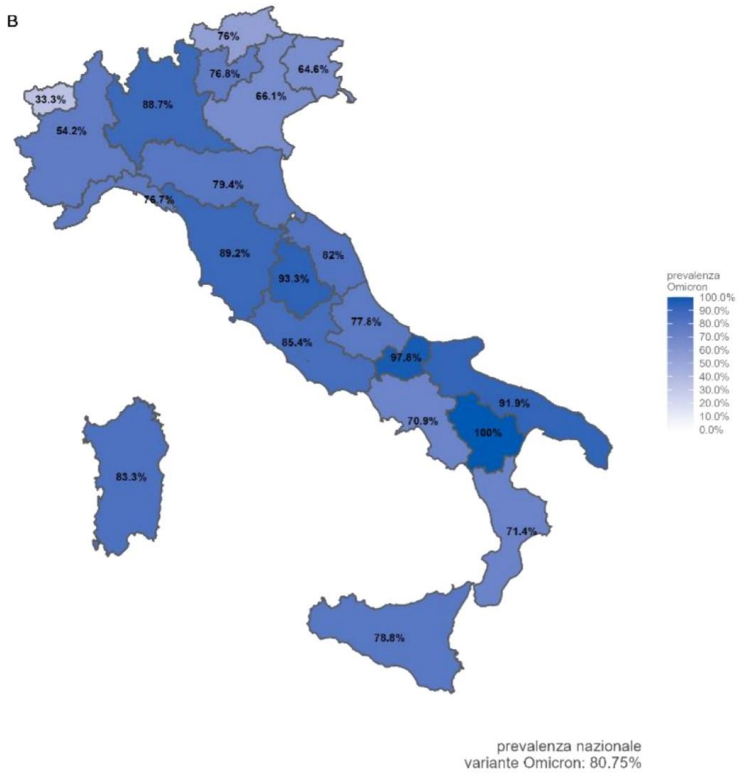


Figura 13 - *prevalenza della variante Omicron in Italia, al 3 Gennaio 2022* (154)

La piattaforma I-Co-Gen (ITALIAN-COVID19-GENOMIC) sviluppata dall'ISS e attiva dal 29 aprile 2021, è basata su un'infrastruttura collaborativa per la raccolta, analisi e condivisione dei dati di sequenziamento genomico di rilevanza nazionale (https://irida.iss.it).

Dalla fine del mese novembre 2021, dopo la prima identificazione in Sud Africa, la variante Omicron è stata posta sotto stretto monitoraggio. Tale variante è caratterizzata da un elevato numero di mutazioni nella regione che codifica la proteina Spike, in particolare nella regione del sito di legame al recettore e del dominio N-terminale. La maggior parte delle sequenze dei ceppi della variante Omicron, presentano una delezione del gene S in posizione 69/70 che può causare il fallimento dell'amplificazione del gene S in alcuni saggi Real-time PCR diagnostici (risultato definito come *S-gene target failure* o SGTF).

Tale delezione è presente nella maggior parte delle sequenze Omicron 82.7% depositate nella piattaforma I-Co-Gen. La stessa delezione è stata descritta ed è molto frequente (N= 19.664) nella variante Alpha 20I.

Il SGTF può rappresentare un'indicazione della presenza di una variante Omicron già nella fase di screening diagnostico. Tuttavia, la conferma dovrebbe essere ottenuta mediante sequenziamento, sia perché alcuni ceppi appartenenti a questa variante mancano di questa delezione sia perché la stessa è presente anche in altre VOC (ad es. Alfa e sottoinsiemi di Gamma e Delta), ancora circolanti a livello globale. (154)

Nella Figura che segue, si evidenzia l'andamento delle VOC identificate in Italia nei campioni sequenziati e depositati nella piattaforma I-Co-Gen. Si osserva come la variante Alfa era la VOC prevalente nelle fasi iniziali dell'attività di sequenziamento. A partire dal mese di luglio 2021, la variante Delta è divenuta prevalente rispetto a tutte le altre varianti identificate.

Dalla sua prima identificazione in Italia alla fine di novembre 2021, la variante Omicron ha mostrato una crescita costante rappresentando una frazione significativa (2.062 nel mese di dicembre) delle sequenze depositate nella piattaforma.

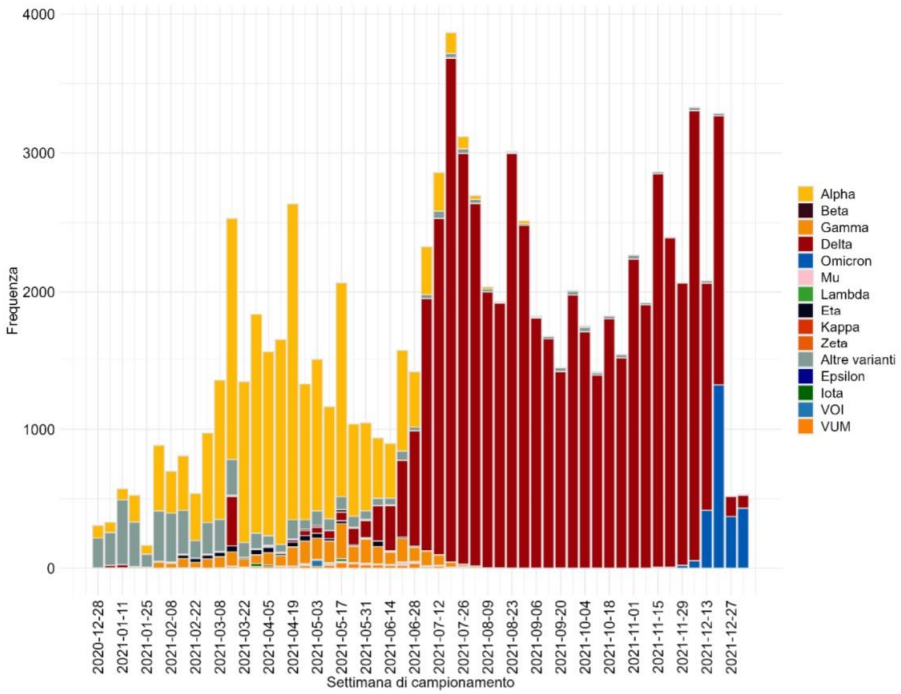


Figura 14 - *Andamento delle principali VOC identificate mediante sequenziamento per settimana di campionamento (28 dicembre 2020 – 10 gennaio 2022)* (154)

1.6 I nuovi farmaci antivirali

In Italia sono stati finora autorizzati due antivirali orali per il trattamento della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) negli adulti che non necessitano di ossigenoterapia supplementare e che presentano un elevato rischio di sviluppare una forma severa di COVID-19:

- *Paxlovid* (PF-07321332/ritonavir) dell'Azienda Pfizer Europe MA EEIG
- *Lagevrio* (molnupiravir) dell'Azienda Merck Sharp & Dohme.

Per Paxlovid (PF-07321332/ritonavir) l'Italia ha recepito l'autorizzazione europea con la determina n.15 del 31 gennaio 2022, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 26 del 1 febbraio 2022.

Lagevrio (molnupiravir) non ha ancora ricevuto l'approvazione della Commissione europea, ma in Italia ne è stata temporaneamente autorizzata la distribuzione con Decreto del Ministero della Salute del 26 novembre 2021 pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 295 del 13 dicembre 2021. Con la determina n. 1644 del 28 dicembre 2021, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 308 del 29 dicembre 2021, l'AIFA, su parere della Commissione Tecnico Scientifica, ha definito le modalità e le condizioni di impiego del medicinale antivirale per uso orale molnupiravir.

La distribuzione di Lagevrio è effettuata dal Commissario straordinario per l'attuazione e il coordinamento delle misure di contenimento e contrasto dell'emergenza epidemiologica COVID-19 di cui all'art. 122 del decreto-legge n. 18 del 17 marzo 2020, secondo modalità e procedure dallo stesso definite.

In Italia risulta autorizzato anche un antivirale ad uso endovenoso per il trattamento di COVID-19:

- *Veklury* (remdesivir) dell'Azienda Gilead Sciences.

Veklury (remdesivir) è il primo farmaco ad azione antivirale ad aver ricevuto autorizzazione, con decisione della Commissione europea del 3 luglio 2020, per il "trattamento della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), in pazienti adulti ed adolescenti (di età pari o superiore a 12 anni e peso pari ad almeno 40 kg) con polmonite che richiede ossigenoterapia supplementare". Tale autorizzazione è stata recepita in Italia con la determina 92/2020, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 250 del 09-10-2020.

Dal 30 dicembre 2021, in seguito all'autorizzazione europea di un'estensione di indicazione, Veklury è indicato anche per il trattamento di COVID-19 negli adulti non ospedalizzati per COVID-19 e non in ossigeno-terapia con insorgenza di sintomi da non oltre 7 giorni e in presenza di condizioni cliniche predisponenti che rappresentino dei fattori di rischio per lo sviluppo di COVID-19 grave.

La prescrizione degli antivirali per il trattamento di COVID-19 è sottoposta a registro di monitoraggio e prevede l'utilizzo della scheda relativa ai farmaci sottoposti a monitoraggio disponibile all'interno degli elenchi pubblicati nella pagina "Lista aggiornata dei Registri e dei Piani Terapeutici web based". Inoltre, tuti gli antivirali sono sottoposti a monitoraggio addizionale. Ciò permette la rapida identificazione di nuove informazioni sulla sicurezza. (155)

Paxlovid

Paxlovid è una combinazione di *nirmatrelvir*, un inibitore della proteasi di seconda generazione, e *ritonavir*, un "enhancer", utilizzato per trattare l'infezione da SARS-CoV-2.

Paxlovid viene somministrato per via orale per 5 giorni nei pazienti con infezione lieve o moderata in fase iniziale. Al momento non sono descritti effetti collaterali quali aumento delle aminotransferasi sieriche o danno epatico clinicamente evidente.

Nirmatrelvir è un inibitore peptido-mimetico della principale proteasi di SARS-CoV-2 e ha attività antivirale in vitro contro diversi coronavirus tra cui SARS-CoV-1 e -2.

Ritonavir è un inibitore della proteasi e un potente inibitore dell'enzima (CYP 3A4) responsabile del metabolismo del nirmatrelvir, il che consente livelli di picco più elevati e un'emivita più prolungata del metabolita antivirale attivo.

In diversi trial, Paxlovid, iniziato entro 5 giorni dall'esordio dei sintomi, ha dimostrato una riduzione dell'89% dei ricoveri per COVID-19 (1,0% vs 6,7%) e una significativa riduzione della mortalità a 28 giorni (0 vs 1,6%).

Paxlovid è disponibile sottoforma di compresse da 150 mg di nirmatrelvir confezionate insieme a compresse da 100 mg di ritonavir; la dose raccomandata è di 2 compresse di nirmatrelvir e una compressa di ritonavir due volte al giorno per 5 giorni. La terapia a lungo termine non è raccomandata, né la terapia è raccomandata per i pazienti ospedalizzati o per i pazienti che hanno avuto sintomi o segni per più di 5 giorni.

Attualmente, Paxlovid è attivamente valutato per l'efficacia e la sicurezza nel trattamento di pazienti non ad alto rischio di complicazioni, nei bambini, e nei pazienti con esposizione nota a casi COVID positivi (profilassi post-esposizione).

Paxlovid sembra essere ben tollerato; eventi avversi lievi possono includere mal di testa, mialgia, disturbi gastrointestinali, nausea e diarrea.

L'esperienza clinica totale con Paxlovid è ancora limitata e la sua sicurezza non è stata completamente definita. (156)

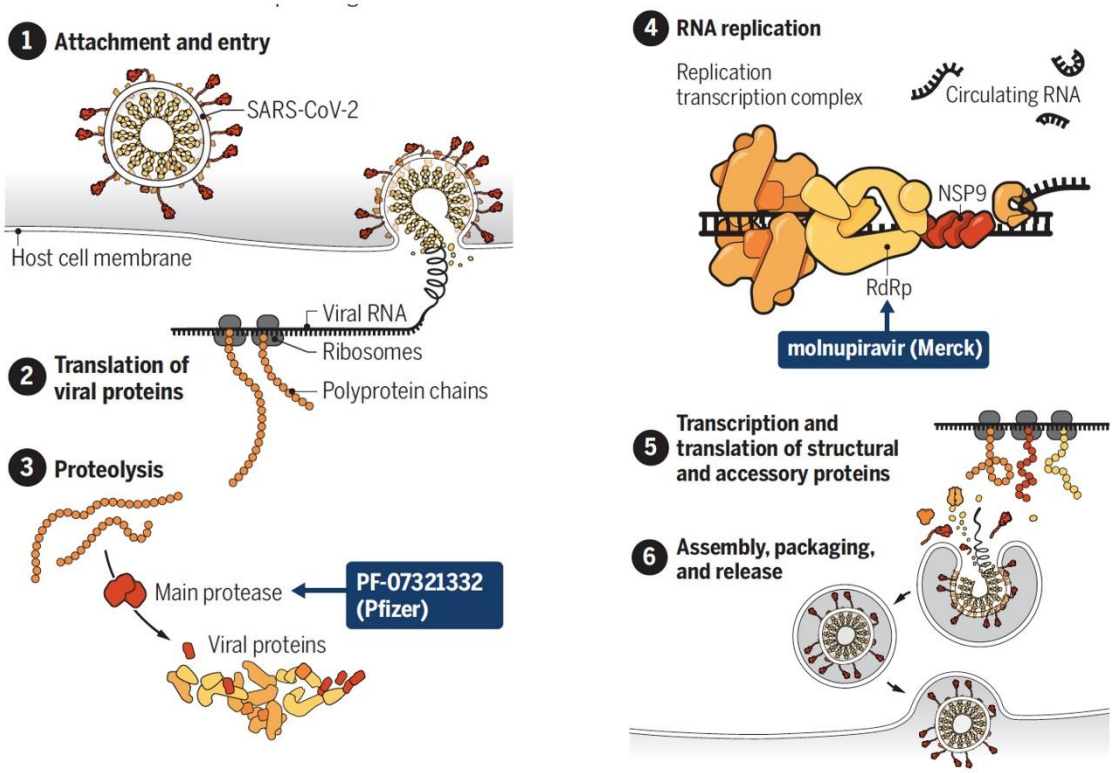


Figura 15 – *Meccanismo d'azione dei principali farmaci anti-virali utilizzati nel trattamento di COVID-19* (157)

Molnupiravir

Molnupiravir è un farmaco sviluppato da "Drug Innovation Ventures" presso la Emory University, in seguito è stato acquisito da "Ridgeback Therapeutics" in collaborazione con Merck & Co, USA.

In generale, i farmaci antivirali testati finora generalmente interrompono l'allungamento della catena di RNA nascente, mirando alle polimerasi virali, ma tali antivirali non hanno mostrato un ruolo molto promettente nel trattamento delle infezioni da SARS-CoV-2 a causa di

un’attività di correzione esonucleolitica che rimuove i nucleotidi erroneamente incorporati dall'RNA nascente. (158)

Sia *molnupiravir* che *remdesivir* hanno come target l'enzima RNA-polimerasi RNA-dipendente, utilizzato dal virus per la trascrizione e la replicazione del genoma (159).

Mentre *remdesivir* è un analogo nucleosidico che blocca l’RNA polimerasi-RNA dipendente e quindi “aggira” il meccanismo di correzione, *molnupiravir* ha un meccanismo d’azione particolare.

Inizialmente emerso come possibile trattamento dei virus dell’influenza, il farmaco sembra funzionare con il meccanismo della “catastrofe dell'errore” che si basa essenzialmente sul concetto che aumentando il tasso di mutazione nel genoma virale, oltre una soglia biologicamente tollerabile, diventa letale per il virus e porta alla sua estinzione (160).

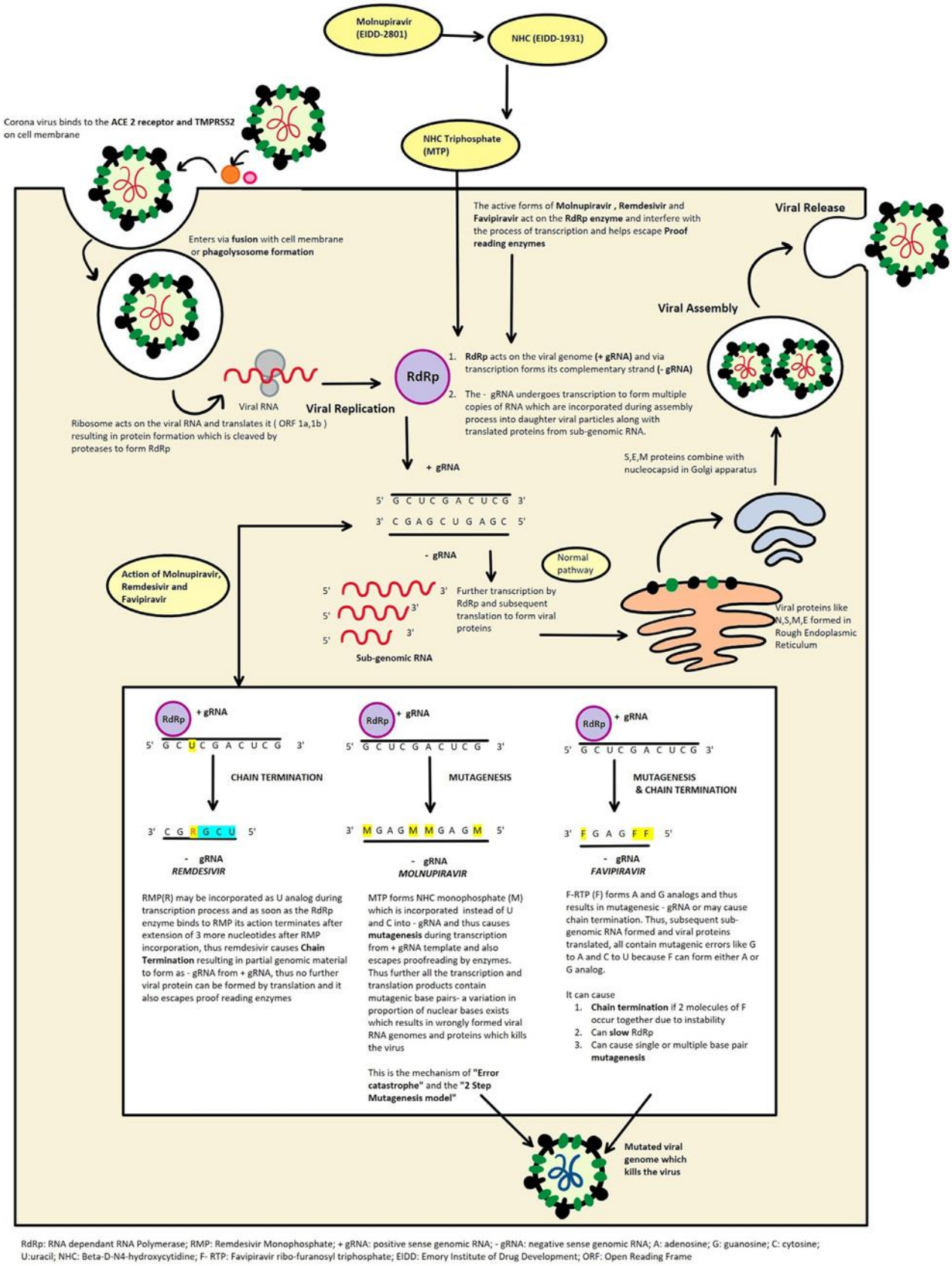


Figura 16 - *Meccanismo d'azione di molnupiravir contro SARS-CoV-2 (agisce inducendo la mutagenesi nell'RNA virale) rispetto a remdesivir (agisce bloccando l'RNA polimerasi-RNA dipendente, a sua volta causando la terminazione della catena del filamento di RNA appena*

formato) e favipiravir (agisce rallentando/bloccando la RNA polimerasi-RNA dipendente provocando la terminazione della catena o inducendo mutagenesi o entrambi). (158)

Riassumendo, *molnupiravir* è un agente antivirale orale ad ampio spettro, ad azione diretta, che agisce sull'enzima RNA polimerasi RNA dipendente e, competendo con i substrati di uridina e citidina trifosfato porta infine all'incorporazione di A e G che formano complessi stabili nella regione attiva dell'enzima portando alla mutagenesi, e sfuggendo al meccanismo di correzione. Il farmaco blocca la replicazione virale mediante il suo modello di mutagenesi in 2 fasi e i meccanismi di "catastrofe dell'errore". In altre parole, muta il virus per uccidersi. Molnupiravir deve essere somministrato solo per un breve periodo di tempo (5 giorni) per via orale, risulta agevole da somministrare in ambulatorio e quindi presenta una migliore "compliance".

Tra i vantaggi, c'è il fatto che può essere prodotto su larga scala e non richiede il trasporto a freddo, né richiede ambienti ospedalieri per la somministrazione, a differenza di altri farmaci approvati per il trattamento di COVID-19.

1.7 Verso il controllo della pandemia

E' recentissimo il lavoro di Rosanna W. Peeling e Colleghi "Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control" pubblicato su Lancet (161), che indica un possibile modello di gestione di COVID-19, alla luce delle più recenti acquisizioni della Letteratura.

Come già noto, i test diagnostici sono utili per confermare la diagnosi in pazienti che presentano sintomi coerenti con COVID-19, indipendentemente dal loro stato vaccinale.

Per i soggetti che si presentano entro le prime 2 settimane di insorgenza di sintomi "COVID-like", deve essere raccolto un campione per eseguire il test molecolare e confermare la diagnosi clinica. (162) I campioni migliori sono nasofaringei o tamponi nasali. (163)

Data l'elevata sensibilità e l'elevata specificità dei test molecolari, risultati falsi positivi o falsi negativi sono rari. Un risultato positivo conferma la diagnosi e dovrebbe attivare procedure di gestione del paziente e misure di sanità pubblica come l'autoisolamento ed il tracciamento dei contatti. Anche se diversi studi hanno dimostrato che un test molecolare positivo non può essere interpretato nel senso che il paziente è contagioso, le suddette misure precauzionali di sanità pubblica devono essere messe in atto comunque.

Tuttavia, per i pazienti in cui il sospetto clinico di COVID-19 è alto ma il risultato del test è negativo, esiste la possibilità che il campione fosse inadeguato o sia stato commesso un errore nel test, nel qual caso anche il test dovrebbe essere ripetuto con un altro tampone nasofaringeo o con un campione delle vie respiratorie inferiori (p. es., espettorato, broncoalveolare lavaggio o aspirato tracheale), se possibile. (164)

Durante l'attesa per i risultati del test, il paziente deve essere tenuto in isolamento in via precauzionale.

Un risultato positivo su test ripetuti conferma un caso di COVID-19 ed il soggetto dovrebbe essere gestito di conseguenza.

Se esiste un sospetto fondato a causa di un "link" epidemiologico od altri segni clinici/di laboratorio ma il test molecolare è negativo, il soggetto potrebbe essere ulteriormente valutato utilizzando un test anticorpale, ma solo allo scopo di documentare retrospettivamente una recente infezione da SARS-CoV-2.

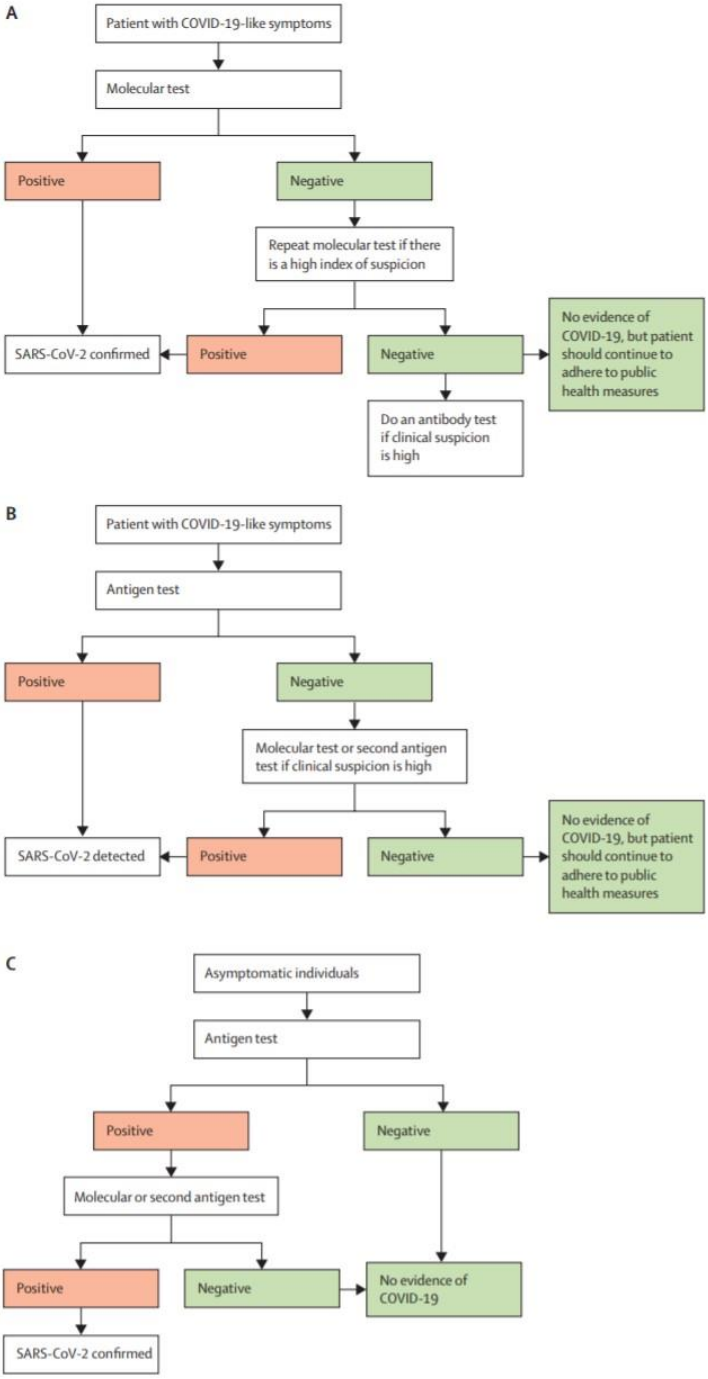


Figura 17 - *Algoritmo diagnostico per l'uso dei test diagnostici* (161)

Se i soggetti con sintomi suggestivi di COVID-19 ritardano ad eseguire degli accertamenti (ad esempio se sono trascorsi 7-14 giorni dall'esordio dei sintomi), dovrebbe essere considerato l'uso combinato di test molecolari, di test di rilevamento dell'antigene e di test sierologici.

Se i test molecolari non sono fattibili o se ci sono ritardi nel riportare i risultati, il test antigenico rapido è raccomandato dalle seguenti istituzioni: OMS (162), Africa Centres for

Disease Control and Prevention (165), e il Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie. (166)

Poiché un soggetto con sintomi suggestivi di COVID-19 ha un'elevata probabilità pre-test di risultare positivo, non è necessaria la conferma del test antigenico.

Nei paesi in cui ci sono adeguate risorse ed il tempo per ottenere il risultato non è ampio, i risultati positivi del test antigenici possono essere confermati mediante un test molecolare.

Tuttavia, è possibile che un individuo potrebbe essere affetto da COVID-19, ma riportare un risultato del test antigenico negativo a causa della bassa carica virale, della raccolta inadeguata del campione o di errori durante la processazione del campione.

Se c'è un forte sospetto clinico di COVID-19 o un'esposizione nota, ed il test antigenico è negativo, un secondo campione dovrebbe essere raccolto con cura e inviato per l'analisi molecolare o testato con un test antigenico di maggiore sensibilità. Il paziente deve essere tenuto in isolamento fino a che non siano disponibili i risultati dei test.

L'identificazione dei soggetti affetti nella comunità è un elemento fondamentale nella gestione della pandemia.

La ricerca dei casi può essere passiva o attiva. La ricerca passiva si basa su individui con segni e sintomi che riconoscono questi come associati all'infezione e si segnalano agli operatori sanitari. La ricerca attiva dei casi si basa sul ricercare gli individui con infezione e testare tutti coloro che mostrano segni e sintomi. Altre forme di ricerca attiva dei casi includono gli screening di popolazione e gli screening mirati a persone che vivono in contesti ad elevata diffusione della malattia.

Gli operatori sanitari ed i lavoratori occupati in strutture residenziali per persone di età pari o superiore a 65 anni, i lavoratori impiegati in "attività essenziali" e quelli impiegati nei trasporti pubblici sono ad aumentato rischio di contrarre e trasmettere COVID-19.

Eseguire test di routine tra i soggetti asintomatici in queste popolazioni è una componente cruciale di un'efficace strategia di controllo dell'infezione. Test frequenti e tempi di refertazione rapidi dei risultati del test porterebbero ad una diagnosi precoce, e quindi alla prevenzione di eventuali focolai, in contesti a rischio. (167)

Diversi modelli epidemiologici (168, 169) hanno suggerito che l'efficacia del controllo dell'epidemia dipende in gran parte dalla frequenza di esecuzione dei test e dalla velocità di refertazione, ed è solo marginalmente migliorata dalla sensibilità dei test medesimi.

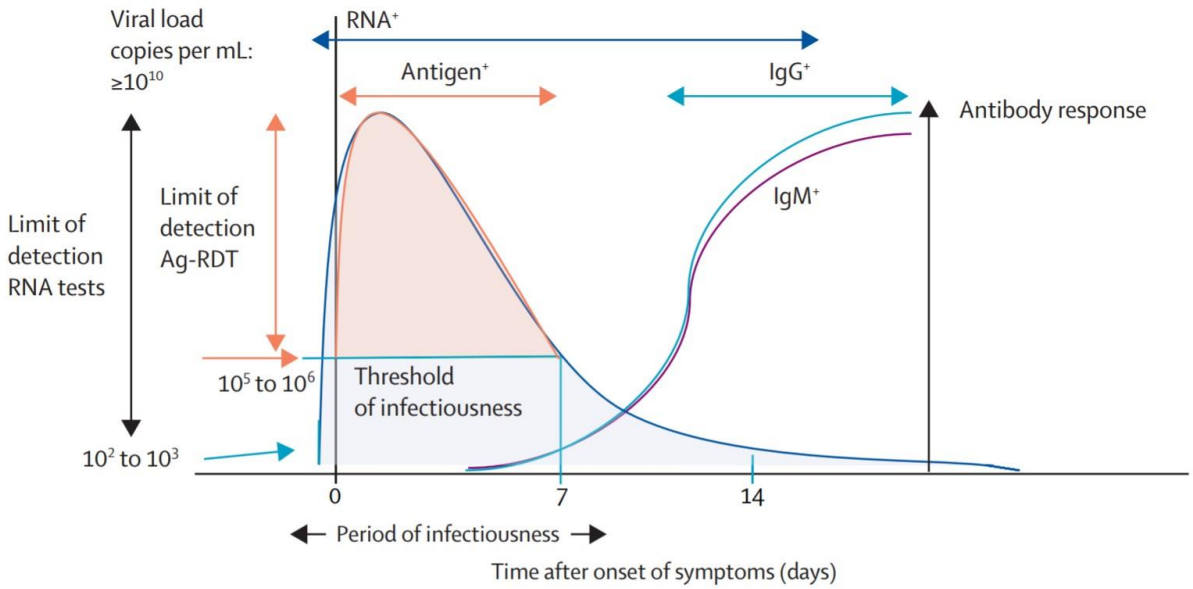


Figura 18 – *"Timing" per l'uso ottimale di diversi test diagnostici per il rilevamento del COVID-19 e la risposta dell'ospite* (161)

2. Contributo personale

2.1 Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi è il risultato di una parte dell'attività svolta dall'UOSD Medici Competenti e Autorizzati della ASL 1 Abruzzo durante l'emergenza, Unità Operativa presso la quale ho prestato la mia attività di studio e ricerca con una collaborazione realizzata nell'ambito della possibilità di svolgere attività clinica connessa alle attività Dottorali.

Tale emergenza ci ha visti impegnati sul fronte della salute e sicurezza dei lavoratori (ed in particolar modo degli operatori sanitari) sin dalla prima ondata di contagi, seguita dopo breve tempo dall'attivazione delle attività di sorveglianza sanitaria straordinaria e dall'allestimento di un ambulatorio appositamente dedicato alla gestione dei casi COVID, sia dal punto di vista della diagnostica molecolare che dal punto di vista dello studio sierologico.

L'obiettivo primario del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare la risposta immunitaria umorale in una popolazione di operatori sanitari che ha ricevuto due dosi della vaccinazione anti SARS-CoV-2 BNT162b2 Pfizer/BioNTech. Il titolo anticorpale è stato valutato a 21, 28 e 50 giorni dalla somministrazione della prima dose di vaccino. Tale obiettivo aveva un risvolto pratico fondamentale per gli scopi della Medicina del Lavoro, in una fase della pandemia durante la quale era necessario che gli operatori sanitari acquisissero, in breve tempo, una immunità umorale protettiva.

Obiettivo secondario è stato quello di valutare l'influenza di fattori come età e sesso sullo sviluppo del titolo anticorpale stesso, per ottenere una fotografia "reale" della copertura anticorpale in una popolazione di lavoratori di età prevalentemente avanzata e di sesso prevalentemente femminile.

Poiché l'efficacia delle misure preventive tra la popolazione dipende dalla proporzione di varianti di SARS-CoV-2 diffuse in una determinata area (170), l'immunizzazione ha attirato l'attenzione di molti gruppi di ricerca come indice individuale per testare l'efficacia della vaccinazione.

Il lavoro di raccolta dei dati è stato condotto nel periodo compreso tra gennaio ed aprile 2021, nella sede aquilana della ASL 1 Abruzzo Avezzano-Sulmona-L'Aquila.

Lo studio si è svolto con l'approvazione del Comitato Etico ASL delle Province di L'Aquila e Teramo (verbale n.21 del 16 Luglio 2020), il quale autorizzava l'utilizzo dei dati derivanti dall'attivita di sorveglianza sanitaria dei lavoratori.

2.2 Materiali e metodi

Nel presente studio, monocentrico, prospettico ed osservazionale, sono stati utilizzati 2845 campioni di siero, prelevati da 1306 operatori sanitari (449 maschi e 857 femmine), impiegati presso il presidio ospedaliero San Salvatore dell'Aquila.

I sieri sono stati raccolti a seguito dell'inizio della campagna vaccinale anti SARS-CoV-2, che nella Regione Abruzzo ha avuto inizio il giorno 27 Dicembre 2020.

Gli operatori si sono sottoposti a prelievo di sangue venoso a 21, 28 e 50 giorni dalla somministrazione della prima dose di vaccino anti COVID-19 BNT162b2 Pfizer Biontech. Il prelievo venoso della ventunesima giornata è stato effettuato in concomitanza alla somministrazione della seconda dose del vaccino.

Un totale di: 1306 campioni sono stati raccolti dopo 21 giorni dalla prima dose, 871 campioni sono stati raccolti dopo 28 giorni dalla prima dose e 668 campioni dopo 50 giorni dalla prima dose.

I criteri di inclusione per la partecipazione a questo studio comprendevano:

1) essere lavoratori impiegati presso la ASL 1 Abruzzo Avezzano-Sulmona-L'Aquila (lo studio, in particolare, è stato condotto presso la sede dell'Aquila);

2) essere idonei alla vaccinazione, secondo il programma nazionale per la vaccinazione COVID-19.

In analogia con precedenti lavori (171, 172) lo studio è stato impostato come segue: un siero è stato considerato come "negativo" per la ricerca di IgG anti SARS-CoV-2 se almeno tre dei quattro replicati dello stesso saggio avevano dato un risultato negativo, applicando i criteri di interpretazione del produttore. Al contrario, un siero è stato considerato "positivo" per IgG anti-SARS-CoV-2 se almeno due dei quattro replicati dello stesso saggio avevano dato un risultato positivo.

A causa delle difficoltà di approvvigionamento dei reagenti di laboratorio e delle indicazioni del piano aziendale anti-corruzione, per l'analisi dei sieri sono stati utilizzati tre saggi immunoenzimatici semiquantitativi diversi: il Liaison SARS-CoV-2 S1/S2 IgG assay (DiaSorin, Italia, metodo CLIA), il Liaison SARS-CoV-2 S2 IgG assay (DiaSorin, Italia, metodo CLIA) e l'Elecsys Anti-SARS-CoV -2 test (Roche, USA, metolo ECLIA), di cui le relative schede tecniche sono disponibili ai seguenti link:

https://www.diasorin.com/it/immunodiagnostica/aree-cliniche/malattie-infettive/covid-19, https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-anti-sars-cov-2.html.

Per consentire il confronto dei valori quantitativi tra i saggi, i valori sono stati normalizzati utilizzando il metodo “min-max”. Secondo tale metodo si esegue una trasformazione lineare in cui i dati vengono ridimensionati e scalati su un intervallo fisso, in genere [0, 1]. Questa normalizzazione migliora l’accuratezza dell’analisi grazie alla migliore distribuzione dei dati. (211)

I risultati del test sono stati confrontati per studiare la risposta immunitaria umorale in una popolazione di operatori sanitari sottoposta a due dosi della vaccinazione anti SARS-CoV-2 BNT162b2 Pfizer/BioNTech (obiettivo primario).

Sono stati inoltre raccolti dati sul sesso e l'età di ciascun lavoratore, in modo da correlare tali variabili con il livello di anticorpi sierici (obiettivo secondario).

Analisi statistica

Tutte le variabili sono state analizzate e riportate come frequenze o media e deviazione standard (DS) o mediana e IQR, se si trattava rispettivamente di variabili qualitative o quantitative.

Tutte le analisi sono state eseguite con il software STATA 15, impostando l'alfa a 0,05.

I confronti statistici sono stati eseguiti utilizzando il *test t di Student* o il *test U di Mann–Whitney*, a seconda dei casi. Il *test x2* o il *test esatto di Fisher* è stato utilizzato per confrontare l'uguaglianza delle proporzioni tra i gruppi di lavoratori.

2.3 Risultati

Il presente lavoro di tesi è stato condotto su 2.845 campioni di siero. I campioni sono stati raccolti da 1.306 diversi operatori sanitari (449 maschi e 857 femmine; età media 47.9 ± 12.7 anni), la totalità di coloro che si è sottoposta alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 nel periodo dello studio. 1.306 sieri sono stati raccolti 21 giorni dopo la prima dose di vaccino, 871 dopo 28 giorni e 668 dopo 50 giorni (435 sieri non sono stati raccolti per lo screening a 28 giorni e 203 per lo screening a 50 giorni per impossibilità di reperire i campioni).

La tabella che segue mostra la demografica di popolazione.

	Prima	Seconda	Terza	*p*
Sesso				
- Maschi	449 (34.4%)	281 (32.3%)	201 (30.1%)	0.992
- Femmine	857 (65.6%)	590 (67.7%)	467 (69.9%)	
Età	47.9 ± 12.7	47.7 ± 12.5	48.2 ± 12.9	0.9677

Tabella I – *Demografica di popolazione*

Come si evince dalla Tabella I, la distribuzione delle variabili "sesso" ed "età" è rimasta costante nei tre gruppi (rispettivamente p=0.992 e p=0.9677), pertanto i gruppi risultano essere sufficientemente omogenei.

La tabella che segue mostra le proporzioni di campioni positivi e negativi per anticorpi anti SARS-CoV-2 in occasione dei tre campionamenti.

	Prima	Seconda	Terza	*p*
Risultato				
- Positivo	1,198 (91.7%)	863 (99.1%)	666 (99.7%)	<0.0001
- Negativo	108 (8.2%)	8 (0.9%)	2 (0.3%)	
Titolo anticorpale normalizzato	0.18 ± 0.14	0.77 ± 0.33	0.68 ± 0.31	0.0001
Mediana titolo anticorpale normalizzato	0.16	0.99	0.75	

Tabella II – *Campioni positivi e negativi per la ricerca di anticorpi ai tre dosaggi*

Non c'era differenza nella distribuzione di genere (p=0,148) e nell'età dei lavoratori (p=0,666).

La proporzione di campioni con anticorpi positivi per SARS-CoV-2 è aumentata nel tempo: in particolare, è aumentata significativamente dal 91,7% al 99,1% dopo sette giorni (e la seconda dose di vaccino) (p<0,0001). Non ci sono state differenze statisticamente

significative nella proporzione di campioni positivi per anticorpi anti SARS-CoV-2 tra la seconda e la terza raccolta (aumento dal 99.1% al 99.7%, p=0,134).

Sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel titolo anticorpale normalizzato tra tempi diversi (p<0,0001): tra il primo e il secondo test si è verificato un aumento statisticamente significativo del titolo anticorpale (da 0,18 a 0,77; p<0,0001); tuttavia, nel saggio successivo, scende leggermente da 0,77 a 0,68 (p<0,0001).

Non ci sono state differenze di genere nella proporzione di campioni positivi per anticorpi anti-SARS-CoV-2 in nessuno dei test.

Tuttavia, è stato riscontrato che il titolo anticorpale medio era più alto nelle femmine rispetto ai maschi in ciascuno dei test eseguiti (Figura I /Tabella III).

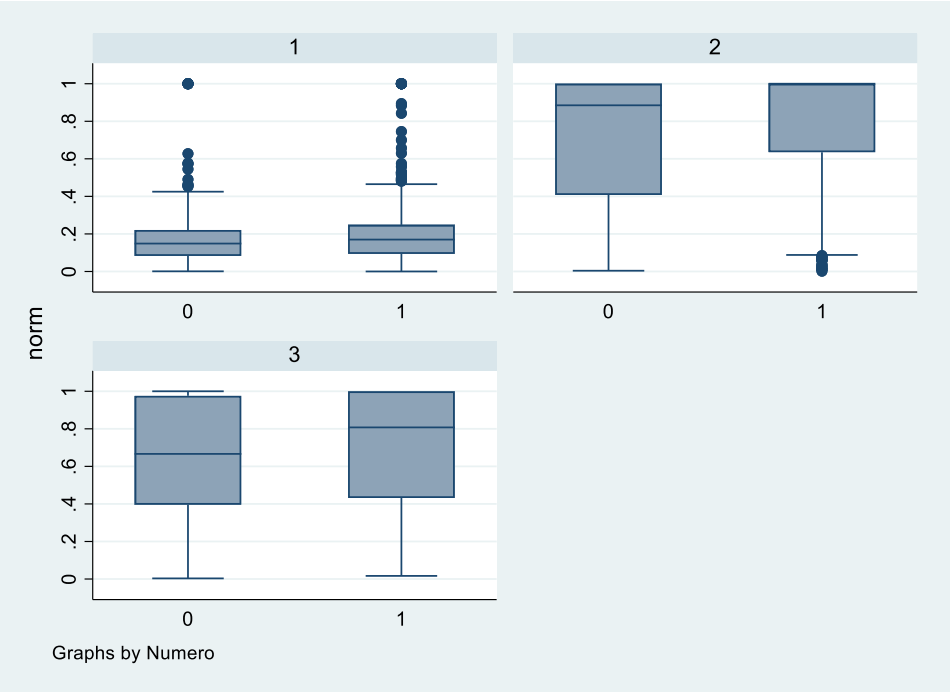


Figura I e Tabella III – *confronto del titolo anticorpale sulla base della variabile "sesso"*

	Maschi	Femmine	*p*
Prima	0.17±0.14	0.19±0.14	0.0025
Seconda	0.7±0.35	0.79±0.32	<0.0001
Terza	0.65±0.31	0.7±0.31	0.0115
p	0.0001	0.0001	

E' stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'età media tra coloro che avevano un titolo anticorpale positivo e quelli che non lo avevano: i lavoratori con titolo

anticorpale protettivo erano in media di età inferiore, sia per quanto riguarda i maschi che per quanto riguarda le femmine, come si evince dalla tabella che segue.

Età media	Non protetti	Protetti	*p*
Maschi	56.6±11.2	49.5±13.6	0.0003
Femmine	54.1±7.7	46.8±12.1	<0.0001
Totale	55.1	47.6	<0.0001

Tabella IV – *confronto del titolo anticorpale sulla base della variabile "età"*

Effettuando la stessa analisi, per periodo di rilevazione, la differenza è presente solo al primo dosaggio, e scompare nei successivi dosaggi.

È stata quindi indagata la relazione tra età e titolo anticorpale mediante correlazione di Spearman: l'analisi ha mostrato una moderata correlazione inversa tra i valori del titolo normalizzato e l'età, al momento del primo test. Tale correlazione viene mantenuta anche nei saggi successivi, sebbene con valori inferiori, come mostrato nella tabella che segue.

Rilevazione	Rho	*p*
Prima	-0.2667	<0.0001
Seconda	-0.1292	0.0001
Terza	-0.1361	0.0005

Tabella V – *correlazione tra "età" e titolo anticorpale, mediante test di Spearman*

Il test di Spearman è stato eseguito per stabilire la "forza" di tale associazione.

Infine, il modello di regressione lineare ha mostrato come "sesso", "età" e "tempo" fossero associati al titolo anticorpale normalizzato (R-quadrato: 0,5411; p<0,0001). In particolare, il sesso femminile e l'età più giovane erano associati a un titolo anticorpale più elevato (tabella VI).

	Coeff.	Intervallo di confidenza		*p*
Maschi	Rif			
Femmine	0.038	0.018	0.058	<0.0001
Età	-0.003	-0.004	-0.002	<0.0001
Prima rilevazione	Rif.			
Seconda rilevazione	0.576	0.554	0.597	<0.0001
Terza rilevazione	0.506	0.482	0.530	<0.0001

Tabella VI – *Modello di regressione lineare multivariato tra le variabili sesso, età e tempo ed il titolo anticorpale normalizzato*

Dalla tabella si evince come le variabili che hanno “peso” maggiore nel determinare il titolo anticorpale protettivo siano:

- il sesso femminile
- la giovane età
- e, indirettamente, aver eseguito la seconda dose di vaccino. Nell’intervallo tra la prima e la seconda rilevazione, infatti, il titolo anticorpale è aumentato di più che nell’intervallo tra la seconda e la terza rilevazione (la seconda rilevazione è ad una settimana dalla seconda dose -28°esimo giorno dalla prima-).

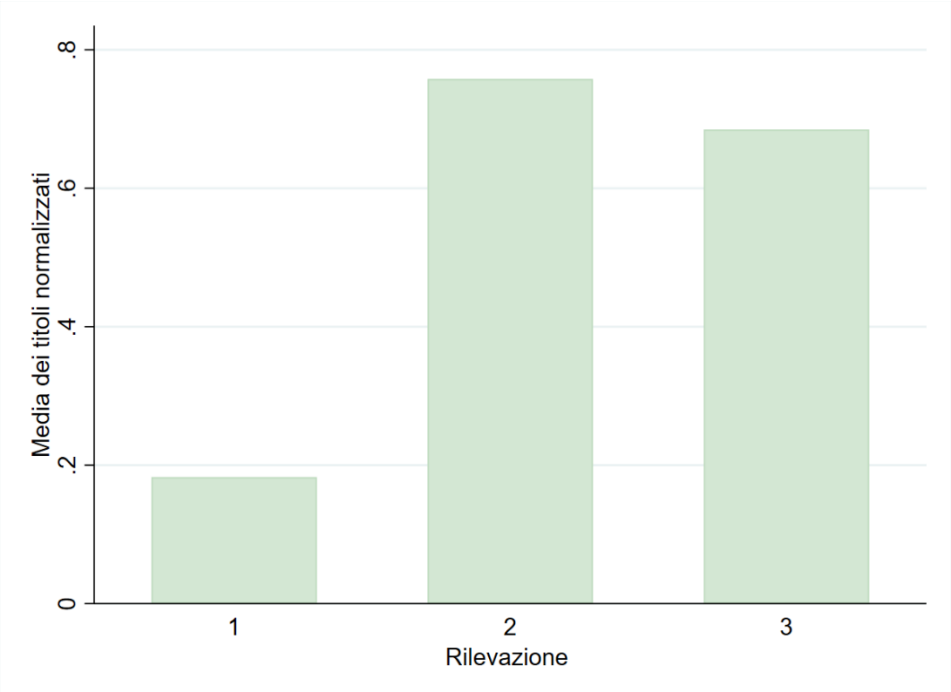


Figura II – *Media del titolo anticorpale normalizzato, nelle tre rilevazioni temporali (21, 28 e 50 giorni dalla prima dose di vaccino)*

2.4 Discussione

Nel Dicembre 2019, le autorità sanitarie cinesi della provincia di Wuhan hanno descritto la diffusione di una malattia polmonare di origine sconosciuta, che stava provocando numerosi "cluster" di polmonite atipica. Nel Gennaio 2020, l'intero genoma del nuovo coronavirus (poi denominato SARS-CoV-2) veniva identificato e diffuso come l'agente causale del quadro patologico COVID-19. A marzo dello stesso anno, l'Organizzazione Mondiale della Sanità dichiarava la diffusione di questo virus come un'emergenza sanitaria di interesse internazionale. Con i primi rudimentali protocolli di terapia disponibili agli inizi della pandemia, la ricerca su misure di profilassi vaccinali, soprattutto per le frange di popolazione più ad alto rischio, è diventata una priorità assoluta.

La proteina "spike" di SARS-CoV2, ed in particolar modo il suo sito di legame per il recettore (*receptor binding domain*, RBD) è risultata essere, sin dall'inizio, il target più importante contro cui venivano prodotti gli anticorpi dei soggetti che avevano contratto l'infezione (173).

La neutralizzazione di questo dominio avrebbe interferito con l'affinità di legame al recettore ACE2, localizzato sulle cellule di diversi tessuti dell'organismo.

Per questo motivo, diverse tipologie di vaccino, incluso quello a mRNA BNT162b2 di Pfizer/BioNTech, hanno mirato ad indurre la produzione di anticorpi diretti contro il dominio RBD.

Quest'ultimo vaccino è costituito da mRNA inglobato in nanoparticelle di natura lipidica, che codifica per una proteina spike modificata, che rimane stabile nello stadio della fase di pre-fusione e stimola una potente risposta immunitaria. (174, 175). Tale vaccino induce una produzione durevole di anticorpi dose-dipendente, sia per quanto riguarda i livelli di IgG anti-RBD che gli anticorpi neutralizzanti (i quali mostrano una forte correlazione), e induce anche la risposta dei linfociti T. (176)

Come nel caso di tutti i vaccini, a seguito della somministrazione possono verificarsi degli eventi avversi: i più comuni includono dolore nel punto di inoculo, astenia, artro-mialgie, febbre, cefalea, ed in alcuni casi possono verificarsi anche delle reazioni allergiche ad alcuni componenti del vaccino. (177).

BNT162b2 Pfizer/BioNTech è stato il vaccino di scelta per la somministrazione agli operatori sanitari in Italia, che hanno rappresentato una categoria prioritaria in base a quanto previsto

dal “Piano strategico nazionale dei vaccini per la prevenzione delle infezioni da SARS-CoV-2”.

Il primo schema vaccinale per il vaccino BNT162b2 Pfizer/BioNTech prevedeva la somministrazione di due dosi, a distanza di 21 giorni l’una dall’altra. (178) I primi studi, infatti, suggerirono che l’efficacia del vaccino era inferiore in chi aveva ricevuto solo una dose rispetto a chi aveva eseguito il ciclo vaccinale completo. (179, 180).

Sono state sollevate alcune perplessità per quanto riguarda l’omogeneità interindividuale dei livelli di anticorpi SARS-CoV-2 che il vaccino induceva nella popolazione generale.

Numerosi studi hanno indicato che fattori psicologici, fisiologici e comportamentali avrebbero potuto svolgere un ruolo importante nell’intensità della risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione. (181, 182)

Un ridotto successo dell’efficacia vaccinale nei gruppi di popolazione di età avanzata era già noto per altre vaccinazioni, quali quelle anti-HBV, anti-pneumococcica, ed antinfluenzale. (183, 184).

Sebbene i tratti distintivi di quella che viene definita “immunosenescenza” dipendano da numerosi fattori e varino notevolmente da individuo a individuo, si considera una correlazione con i seguenti elementi: una ridotta capacità di rispondere a nuovi antigeni associata ad una ridotta risposta dei plasmablasti periferici, una ridotta capacità dei linfociti T di memoria ed uno stato di lieve infiammazione cronica persistente. Ciò porta ad una diminuzione dell’efficienza immunitaria, con conseguente maggiore suscettibilità alle malattie infettive e ridotta risposta alle vaccinazioni. (185, 186).

Per quanto riguarda l’impatto di alcune variabili demografiche, quali età e sesso, sull’efficacia del vaccino BNT162b2, i dati finora raccolti sono limitati e contraddittori. L’approfondimento di tali informazioni identificherebbe eventuali gruppi specifici di popolazione con una potenziale debole risposta al vaccino. Tale aspetto risulta cruciale per la pianificazione delle strategie di stratificazione del rischio in sanità pubblica.

Nello studio di Kageyama e Colleghi (187) sono stati reclutati 2015 operatori sanitari di un ospedale giapponese e sono stati sottoposti a prelievo ematico, prima della prima dose di vaccino (BNT162b2) ed a seguito della seconda dose dello stesso, per la determinazione del titolo anticorpale, utilizzando un metodo di laboratorio a elettrochemiluminescenza. Il gruppo di ricerca mirava a descrivere eventuali fattori predittivi del titolo anticorpale post-vaccino eseguendo un’analisi di regressione lineare univariata e multivariata. I risultati mostravano

che terapie immunosoppressive, età, tempo intercorso dalla seconda dose di vaccino al prelievo, terapia con glucocorticoidi ed abitudine alcolica erano fattori predittivi di un titolo anticorpale più basso; mentre pregressa infezione COVID, sesso femminile, tempo intercorso tra le due dosi, trattamenti di premedicazione per anamnesi di allergopatie erano fattori predittivi per un titolo anticorpale post-vaccinale più alto in maniera statisticamente significativa.

Nomura e Colleghi (170) hanno condotto uno studio su 378 operatori sanitari per analizzare il titolo anticorpale a tre mesi dalla seconda dose di vaccinazione (BNT162b2), e ricercare eventuali variabili cliniche predittive. Le conclusioni sono state che i soggetti con età maggiore, hanno mostrato un titolo anticorpale significativamente più basso. Ad un'analisi condotta per fasce di età, gli unici fattori di rischio associati con un titolo anticorpale minore erano il sesso maschile e l'abitudine tabagica (ma gli autori hanno ipotizzato che la differenza riguardante il sesso, potesse derivare dalle differenze di sesso nella popolazione dei fumatori). Pertanto, le variabili associate ad un titolo anticorpale più basso, sono risultate essere età e fumo.

Nello studio condotto da Vassilaki e Colleghi (188) su 1643 operatori sanitari sottoposti a vaccinazione con vaccino BNT162b2 Pfizer BioNTech, la maggior parte ha sviluppato un titolo anticorpale al di sopra della soglia del test di laboratorio utilizzato. L'analisi statistica ha dimostrato che la mediana del titolo anticorpale riportava differenze statisticamente significative in differenti gruppi di età. Il titolo anticorpale era inoltre più alto nelle donne rispetto a quello degli uomini.

Lo studio di Muller e Colleghi (189) è stato condotto su 2 gruppi di soggetti vaccinati, "under" e "over" 60 anni di età. I risultati indicavano l'età come variabile principale nello sviluppo della risposta immunitaria umorale. Entrambi i gruppi di età esaminati hanno sviluppato un titolo anticorpale protettivo, ma il titolo era significativamente minore nel gruppo di soggetti con età avanzata. Anche se l'incremento del titolo dopo la seconda dose di vaccino era maggiore nei più anziani, il titolo medio assoluto restava maggiore nei giovani. Nel gruppo dei soggetti con età avanzata, inoltre, una maggiore percentuale di persone non aveva sviluppato anticorpi neutralizzanti.

Contrariamente a quanto sopra esposto, un altro studio, in cui il test Euroimmun anti-SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA è stato utilizzato per monitorare la risposta umorale al vaccino mRNA BNT162b2, non ha mostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra l'età e il sesso degli individui e la risposta immunitaria indotta dal vaccino. (190)

Per quanto concerne la variabile sesso, molti studi riportano che le donne sviluppano una risposta immunitaria più "robusta" degli uomini. Nel 1967 uno studio pubblicato su Nature da Butterworth e Colleghi (191) riportava che le donne producono titoli più alti di immunoglobuline circolanti IgG e IgM rispetto agli uomini, dato confermato anche da altri studi. La motivazione biologica dietro questa affermazione potrebbe spiegare la protezione che si osserva nel sesso femminile dai casi di COVID-19 con esito infausto. (192)

D'altra parte, altri studi giungono invece a risultati contrastanti riguardo la cinetica del titolo anticorpale anti SARS-CoV-2 nei differenti sessi. Tali lavori sottolineano più alti livelli di IgG e IgA anti-spike e più alti livelli di anticorpi neutralizzanti negli uomini, il che potrebbe spiegare il rischio più alto di esito infausto di COVID-19 in quest'ultima popolazione, a causa di una risposta infiammatoria più intensa. (193, 194, 195)

Kontopoulou e Colleghi non indicano differenze legate al sesso nella risposta immunitaria (titolo anti-spike/RBD) post-vaccinale dopo 14 giorni dalla prima somministrazione. (196)

Kamal e Collaboratori confermano lo stesso dato a 21 giorni dalla somministrazione della prima dose. (197).

Diversi lavori in letteratura paragonano il titolo anticorpale post-vaccinazione tra soggetti con pregressa infezione COVID-19 e soggetti naïve.

Lo studio di Bayart e Colleghi (198) condotto su 231 soggetti, comprendenti sia casi di pregressa infezione COVID che casi *naïve*, prevedeva l'analisi del titolo anticorpale 14, 28 e 42 giorni dopo la vaccinazione con BNT162b2. I ricercatori hanno indagato se fattori "confondenti" quali età, sesso, terapie ormonali, gravidanze, gruppo sanguigno, BMI e pregressa infezione COVID-19 potessero influenzare il titolo anticorpale post-vaccinale anti SARS-CoV-2. Nei soggetti naïve, il livello di IgG anti-spike/RBD aumentava gradualmente dopo la somministrazione della prima dose di vaccino, per raggiungere il massimo a 28 giorni, ed il *plateau* a 42 giorni. Nei soggetti vaccinati con pregressa infezione da SARS-CoV-2, il plateau veniva raggiunto prima (quattordicesimo giorno). Nella popolazione naïve, l'età aveva un impatto negativo, con significatività statistica, sul titolo anticorpale al giorno 14 e 28, mentre tale significatività veniva persa al giorno 42. Nei soggetti con pregressa infezione, l'età non aveva influenza sullo sviluppo del titolo anticorpale. Per quanto riguarda la variabile sesso, gli uomini al giorno 42 del gruppo naïve, mostravano un titolo anticorpale più basso rispetto alle donne; nessuna differenza veniva invece rilevata nel gruppo di soggetti con pregressa infezione.

Nello studio di Cavalcanti e Colleghi, i risultati mostrano un titolo anticorpale post-vaccinale maggiore nei soggetti che avevano contratto infezione. (199) Anche Krammer e Colleghi hanno dimostrato che la risposta immunitaria al vaccino dopo la prima dose è sostanzialmente più pronunciata nei soggetti con pregressa infezione ed è simile alla risposta immunitaria sviluppata dopo la seconda dose dai soggetti senza pregressa infezione (200). Tali risultati sono confermati anche in altri studi. (201, 202)

Nel presente lavoro, è stato esaminato il titolo anticorpale di un gruppo di operatori sanitari di una ASL del Centro Italia, che si sono sottoposti alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 con il vaccino BNT162b2 Pfizer/BioNTech. Per ognuno dei partecipanti, è stato eseguito il prelievo di sangue venoso con il seguente schema temporale:

- 21 giorni,
- 28 giorni,
- 50 giorni

dalla la somministrazione della prima dose del vaccino.

La quasi totalità dei soggetti ha sviluppato un titolo anticorpale protettivo (al di sopra del "cut-off" delle rispettive metodiche di laboratorio), ma il titolo anticorpale era significativamente maggiore nelle persone di età più giovane e nelle persone di sesso femminile.

Il dato è concorde con numerosi studi di letteratura citati.

La principale differenza, per quanto concerne il dato relativo all'età, è probabilmente dovuta ad una ridotta risposta immunitaria adattativa nelle persone di età avanzata (203).

È ampiamente descritto in letteratura che i soggetti di età avanzata non solo hanno maggiori tassi di morbidità dovuti alle infezioni contratte, ma rispondono anche meno alle vaccinazioni, soprattutto a causa di un declino della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata. (204, 205, 206)

All'analisi di regressione lineare, le variabili con maggior "peso" nel determinare la risposta anticorpale erano il sesso, l'età ed anche l'aver eseguito la seconda dose della vaccinazione. Quest'ultimo dato è molto importante: differenti strategie vaccinali sono state adottate in diversi Paesi, e lo stesso tipo di vaccino è stato somministrato con diverse periodicità. Tali differenze includono, ad esempio, un ritardo nella somministrazione della seconda dose, come è avvenuto in UK o in Israele, per permettere la somministrazione della prima dose ad una più

larga fetta di popolazione. Tale strategia è stata discussa ed è sovente oggetto di controversia. (207, 208)

Il presente lavoro di tesi testimonia in realtà l'importanza della somministrazione della seconda dose, in base all'aumento significativo del titolo anticorpale ad una settimana dalla somministrazione della stessa.

Ciononostante, altri studi di popolazione su larga scala riportano che perfino dopo una singola dose di vaccino si dimostra un calo delle ospedalizzazioni ed una diminuzione significativa di malattia severa nella popolazione generale, ma anche nelle fasce di popolazione di età avanzata. (209).

Non è ancora chiaro quanto sia durevole l'immunità indotta dal vaccino, pertanto ulteriori studi sul follow-up sierologico della popolazione appaiono necessari.

I dati presentati nel lavoro di tesi suggeriscono che potrebbe essere necessario adattare in alcuni casi le schedule vaccinali per superare alcune limitazioni correlate a differenze legate al sesso ed all'età, soprattutto in una popolazione come quella rappresentata dagli operatori sanitari, con età media peraltro avanzata, che di per sé appare più esposta ad occasioni di contagio.

L'Italia è un paese particolarmente longevo e con natalità molto bassa in cui l'invecchiamento della popolazione, in assenza di adeguate politiche, traccia la potenziale vulnerabilità del sistema, in particolar modo analizzando alcuni settori lavorativi. Il comparto della sanità, caratterizzato da lavoratori prevalentemente di genere femminile e con età media elevata, rappresenta un'attività di grande rilevanza dal punto di vista sia quantitativo, per il numero di lavoratori che impiega e che consente di attestare le aziende sia sanitarie sia ospedaliere come tra le più grandi e complesse realtà economiche, che qualitativo, per la peculiarità delle prestazioni erogate. Nel settore della sanità, i lavoratori anziani non solo sono numerosi, quindi, ma rappresentano, tra l'altro, un'importante criticità da risolvere in funzione della "mission" di fornire e garantire diagnosi, cura, assistenza e terapia al paziente.

In Italia, la Ragioneria Generale dello Stato ogni anno produce un rapporto, detto Conto annuale, che registra numero, caratteristiche e costi del personale pubblico italiano. L'età media dei medici è pari a 50,8 anni e si rileva una maggiore presenza del genere femminile nelle classi più giovani. Dall'analisi della piramide delle età è possibile osservare come la classe di età compresa tra 50 e 59 anni sia più numerosa e quella di età compresa tra 30 e 34 anni rappresenti la percentuale minore. Per il genere femminile i dati mostrano le prime due

fasce di età più numerose rispetto a quelle dei maschi confermando che la popolazione femminile medica è in aumento. (210)

Appare dunque evidente come la popolazione di operatori sanitari di età avanzata, e di sesso femminile, rappresenti la gran parte del totale.

Dai risultati del presente lavoro, la quasi totalità dei lavoratori ha sviluppato un titolo anticorpale "protettivo", tranne rari casi che, con un'anamnesi retrospettiva, sono stati identificati essere due soggetti, entrambi di sesso maschile e di età avanzata, sottoposti a trapianto d'organo ed in terapia immunosoppressiva. Tra i sei soggetti, con titolo anticorpale non protettivo alla seconda rilevazione, un soggetto ha esibito titolo anticorpale protettivo alle terza rilevazione e per gli altri cinque soggetti non era disponibile il campione di siero.

Il presente lavoro di tesi ha dei limiti:

- riguarda un solo centro, e coinvolge pressoché tutti soggetti italiani (non è stato possibile studiare una differenza sulla base dell'etnia);
- non è stata descritta la correlazione con anticorpi neutralizzanti. Tale integrazione è stata in realtà valutata, ma non è oggetto della tesi;
- non è stata indagata l'immunità cellulo-mediata;
- non sono state raccolte altre variabili (BMI, abitudine tabagica, comorbidità ecc..) trattandosi di uno studio organizzato in breve tempo, per non perdere il "timing" della raccolta dei campioni ematici;
- il metodo min-max ha lo svantaggio di non consentire la corretta gestione degli "outliers";
- non è stato possibile utilizzare, per tutti i sieri, la stessa metodica analitica di laboratorio. Trattandosi di uno studio "real world", non abbiamo potuto controllare variabili al di fuori della nostra volontà (ad esempio, in base alla procedura anti-corruzione vigente in azienda, sono stati ordinati lotti di reagenti di laboratorio di diverse ditte, e non della medesima);
- non è stato possibile eseguire un prelievo prima della vaccinazione. Questo avrebbe consentito una valutazione circa lo sviluppo di titoli anticorpali non dipendenti dal vaccino ma dall'infezione naturale.

Probabilmente quest'ultimo punto, il fatto di essere un lavoro "real world evidence", in realtà potrebbe non essere valutato come tale. Progettare uno studio con maggior rigore, avrebbe significato perdere il quadro effettivo delle condizioni in cui abbiamo operato, ricreando uno scenario poco calabile nel reale.

2.5 Conclusioni

Dall'analisi della letteratura, emergono numerose perplessità riguardo l'omogeneità interindividuale nel titolo anticorpale anti SARS-CoV-2 indotto dalla vaccinazione; diversi fattori svolgono un ruolo importante nello sviluppo della risposta immunitaria post-vaccinale.

Il presente lavoro evidenzia che la quasi totalità degli operatori sanitari arruolati nello studio ha sviluppato una brillante risposta alla vaccinazione, e tale dato conferma ed incoraggia l'utilizzo del vaccino su larga scala.

Per quanto riguarda l'impatto di alcune variabili demografiche, quali età e sesso, sull'efficacia del vaccino, i dati finora disponibili sono contraddittori.

Dall'analisi dei risultati del presente lavoro di tesi, il titolo anticorpale medio risulta essere più alto nelle femmine rispetto ai maschi in ciascuno dei dosaggi eseguiti; emerge una differenza statisticamente significativa nell'età media tra coloro che avevano un titolo anticorpale protettivo ed i soggetti che avevano un titolo anticorpale inferiore: gli operatori sanitari con titolo anticorpale protettivo sono, in media, di età inferiore, sia per quanto riguarda i maschi che per quanto riguarda le femmine.

L'approfondimento di tali informazioni identificherebbe eventuali gruppi specifici di popolazione con una risposta potenzialmente differente al vaccino. Tale aspetto risulta cruciale per la pianificazione di metodiche di stratificazione del rischio in sanità pubblica.

I fattori predittivi del titolo anticorpale post-vaccinale potrebbero aiutare in futuro ad ottimizzare la strategia vaccinale e generare ipotesi per nuovi studi di follow-up, per valutare l'importanza di altre variabili nel determinare le caratteristiche della risposta anticorpale.

Bibliografia

1. Harrison, Principi di Medicina Interna, 20ª edizione. Carosi G, Cauda R, Pession A, Antonelli G. La pandemia di COVID-19 in Italia. Edizione 3/8/2021.
2. Rabaan AA et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV: a comparative overview. Le infezioni in Medicina. 2020; 2:174-184.
3. Gorbalenya AE et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol. 2020; 5(4): 536–544.
4. Zhou P et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270–273 (2020)
5. Lu R et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet, Volume 395, Issue 10224, 565-574 (2020)
6. Redondo N et al. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. Front Immunol. 2021 Jul 7;12:708264.
7. Wu F et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 579, 265–269 (2020)
8. Hoffmann M et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. 2020;181(2):271-280.
9. Harrison AG et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends in Immunology, Volume 41, Issue 12, 2020, Pages 1100-1115
10. Snijder EJ, et al. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. J Virol. 2006 Jun;80(12):5927-40
11. Wu H-Y, Brian DA. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences Jul 2010, 107 (27) 12257-12262.
12. Kuba K, Imai Y, Rao S et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury. Nat Med 11, 875–879 (2005).
13. Hui KPY et al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo

and in-vitro cultures. The Lancet Respiratory Medicine, Volume 8, Issue 7, 2020, Pages 687-695.

14. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465–469 (2020)

15. Zhang H et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. bioRxiv 2020.01.30.927806; doi: https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927806

16. Xiao F et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. Gastroenterology, Volume 158, Issue 6, 1831-1833

17. Yu ITS et al. Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. N Engl J Med 2004 Apr 22;350(17):1731-9

18. Otter JA et al. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. Journal of Hospital Infection. Volume 92, Issue 3, March 2016, 235-250

19. Li Q et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. N Engl J Med 2020; 382:1199-1207

20. Arons MM et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. N Engl J Med. 2020 May 28;382(22):2081-2090

21. Zou L et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med. 2020 Mar 19;382(12):1177-1179

22. Istituto Superiore di Sanità. Speciale COVID-19: cosa sapere. www.iss.it, ultimo accesso 21/02/2022

23. Ferretti L et al. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. Science, 31 Mar 2020. Vol 368, Issue 6491

24. Wang D et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. JAMA. 2020;323(11):1061-1069

25. Ksiazek TG et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med 2003; 348:1953-1966

26.Chen N et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):507-513

27.Chao YJ et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Hospitalized and Critically Ill Children and Adolescents with Coronavirus Disease 2019 at a Tertiary Care Medical Center in New York City. The Journal of Pediatrics. Volume 223, August 2020, 14-19

28.Channappanavar R et al. Dysregulated Type I Interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. Cell Host Microbe 2016;19(2):181–93

29.Davidson S et al. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. J Interf Cytokine Res Offic J Int Soc Interf Cytokine Res 2015;35(4):252–64

30.Law HKW et al. Chemokine up-reg- ulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. Blood 2005;106(7):2366–74

31.Cheung CY et al. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. J Virol 2005;79(12):7819–26

32.Channappanavar R et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. J Clin Invest 2019;130:3625–39

33.Jiang Y et al. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. Am J Res- pirat Critical Care Med 2005;171(8):850–7

34.Reghunathan R et al. Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. BMC Immunol 2005;6:2

35.Cameron MJ et al. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). Virus Res 2008;133(1):13–19

36.Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020;395(10223):497–506

37.Marchingo JM et al. Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell acti- vation. eLife. 2020;9:e53725

38.Qing Ye et al. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19. Journal of Infection 80 (2020) 607–613

39. Force TADT Acute respiratory distress syndrome: the berlin definition. JAMA 2012;307(23):2526–33.

40. Douda DN et al. Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. J Immunol (Baltimore, Md: 1950) 2011;187(4):1856–65

41. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunctio syndrome. Am J Emerg Med 2008;26(6):711–15

42. Yüce M et al. COVID-19 diagnosis - A review of current methods. Biosensors and Bioelectronics 172 (2021) 112752

43. Cohen J et al. Unprecedented nationwide blood studies seek to track U.S. coronavirus spread. Science ; 2020.

44. Worldometer, 2020. https://www.worldometers.info/coronavirus/ Ultimo accesso 23/1/2022

45. Morales-Narva´ez E, Dincer C. 2020. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. Biosens. Bioelectron. 163, 112274

46. Shaffaf T, Ghafar-Zadeh E. COVID-19 Diagnostic Strategies. Part I: Nucleic Acid-Based Technologies. Bioengineering (Basel). 2021 Apr 17;8(4):49.

47. World Health Organization. Laboratory Testing for Coronavirus Disease (COVID-19) in Suspected Human Cases: Interim Guidance; World Health Organization: Geneva, The Switzerland, 3 March 2020.

48. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. AZ Quant. PCR 2004, 1, 89–113.

49. Nolan T et al. Quantification of mRNA using real-time RT- PCR. 2006. Nat. Protoc. 1, 1559-1582

50. Hartmut Pohl. How do Coronavirus Disease (COVID-19) Tests Work? https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2020/july/how-do-coronavirus-disease-covid-19-tests-work?/ Ultimo accesso 23/01/2022

51. General of Health Malaysia, 2020. Laboratory Readiness for Detecting the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infection in Malaysia – From the Desk of the Director- General of Health Malaysia. https://kpkesih atan.com/2020/02/13/laboratory-readiness-for-detecting-the-2019-novel-coronavir us-2019-ncov-infection-in-malaysia/. Ultimo accesso 23/01/2022

52. Harun HN. 2020. IMR Created Reagent to Handle 2019-nCoV Outbreak Ahead of the WHO. New StraitsTimes.

53. U.S. Food & Drug Administration, 2020. https://www.fda.gov/media/136255/download.

54. U.S. Food & Drug Administration, 2020. https://www.fda.gov/media/136153/download.

55. U.S. Food & Drug Administration, 2020. https://www.fda.gov/media/136148/download.

56. U.S. Food and Drug Administration, 2020. Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency - Serology Template for Manufacturers. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-gui dance-documents/policy-coronavirus-disease-2019-tests-during-public-health- emergency-revised.

57. U.S. Food & Drug Administration, 2020. https://www.fda.gov/me dia/136113/download.

58. Pilot LR. 2012. Federal food, drug, and cosmetic act. In: Pharmacy Law Desk Reference, 25–39.

59. U.S. Food & Drug Administration, 2020. https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations#covid19ivd.

60. U.S. Food and Drug Administration, 2020. Coronavirus (COVID-19) Update: Serological Tests. https://www.fda.gov/news-events/press-anno uncements/coronavirus-covid-19-update-serological-tests.

61. Raccomandazioni ad interim per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone rino/orofaringeo per la diagnosi di COVID-19. Versione del 29 maggio 2020. Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica. Rapporto ISS COVID-19 n. 11/2020 Rev. 2. https://www.iss.it/rapporti-covid-19/

62. Strain MC et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. PLoS ONE 2013, 8, e55943.

63. Falzone L et al. Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. Int. J. Mol. Med. 2020, 46, 957–964.

64. Lv J et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA residue on object surfaces in nucleic acid testing laboratory using droplet digital PCR. Sci. Total Environ. 2020, 742, 140370.

65. Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) Technology. Available online: https://www.bio-rad.com/en-ca/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY#Hindson.

66. Wanger A et al. Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice. 2017, Pages 233-257. Chapter 12 - Overview of Molecular Diagnostics Principles.

67. Mahony JB. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 2010, 8, 1273–1292.

68. Quan P-L et al. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. Antivir. Res. 2008, 79, 1–5.

69. Carter LJ et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. ACS Cent. Sci. 2020, 6, 591–605.

70. Ben-Ami R et al. Pooled RNA extraction and PCR assay for efficient SARS-CoV-2 detection. MedRxiv 2020.

71. Ai J-W et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for Mycobacterium tuberculosis. Emerg. Microbes Infect. 2019, 8, 1361–1369.

72. Terns MP. CRISPR-based technologies: Impact of RNA-targeting systems. Mol. Cell 2018, 72, 404–412.

73. Nouri R et al. CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result. Biosens. Bioelectron. 2021, 178, 113012.

74. Li S-Y et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. Cell Discov. 2018, 4, 1–4.

75. Kilic T et al. Molecular and immunological diagnostic tests of COVID-19–current status and challenges. Iscience 2020, 23, 101406.

76. Li PC et al. Microarray Technology: Methods and Applications; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.

77. Shaw-Smith C et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. J. Med Genet. 2004, 41, 241–248.

78.Chen Q et al. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. Intervirology 2010, 53, 95–104.

79.Hardick J et al. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2018, 91, 245–247.

80.Mboowa G. Current and emerging diagnostic tests available for the novel COVID-19 global pandemic. AAS Open Res. 2020, 3.

81.Shaffaf T, Ghafar-Zadeh E. COVID-19 Diagnostic Strategies Part II: Protein-Based Technologies. Bioengineering. 2021; 8(5):54.

82.Kakhki RK et al. COVID-19 target: A specific target for novel coronavirus detection. Gene Rep. 2020, 20, 100740.

83.Wu A et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. Cell Host Microbe 2020, 27, 325–328.

84.Clarke NE et al. Angiotensin-converting enzyme-2. Handb. Proteolytic Enzym. 2013, 499–504.

85.Wrapp D et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science 2020, 367, 1260–1263.

86.Hasöksüz M et al. Coronaviruses and SARS-COV-2. Turk. J. Med. Sci. 2020, 50, 549–556.

87.Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. Virol. J. 2019, 16, 69.

88.Cristina S et al. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. Int. Immunopharmacol. 2020, 84, 106519.

89.Abbott TR et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. Cell 2020, 181, 865–876.e12.

90.Xiao AT et al. False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. J. Med. Virol. 2020, 92, 1755–1756.

91.Tahmasebi S et al. The outlook for diagnostic purposes of the 2019-novel coronavirus disease. J. Cell. Physiol. 2020, 235, 9211–9229.

92. Qu J et al. Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Clin. Infect. Dis. 2020, 71, 2255–2258.

93. Jacofsky D et al. Understanding antibody testing for COVID-19. J. Arthroplast. 2020, 35, S74–S81.

94. Xiang F et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. Clin. Infect. Dis. 2020, 71, 1930–1934.

95. Zhang W et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: Implication of multiple shedding routes. Emerg. Microbes Infect. 2020, 9, 386–389.

96. Fang X et al. Low-dose corticosteroid therapy does not delay viral clearance in patients with COVID-19. J. Infect. 2020, 81, 147–178.

97. Ma H et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. Cell. Mol. Immunol. 2020, 17, 773–775.

98. Kontou PI et al. Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. Diagnostics 2020, 10, 319.

99. Cinquanta L et al. Chemiluminescent immunoassay technology: What does it change in autoantibody detection? Autoimmun. Highlights 2017, 8, 9.

100. Zhao J et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. Clin. Infect. Dis. 2020, 71, 2027–2034.

101. Sethuraman N et al. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. JAMA 2020, 323, 2249–2251.

102. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J. Investig. Derm. 2013, 133, e12.

103. Zhao L et al. Chemiluminescence immunoassay. TrAC Trends Anal. Chem. 2009, 28, 404–415.

104. Espejo, AP et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. Am. J. Clin. Pathol. 2020, 154, 293–304.

105. Bryan A et al. Performance characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. J. Clin. Microbiol. 2020, 58.

106. Xu Y et al. Clinical findings in critical ill patients infected with SARS-Cov-2 in Guangdong Province, China: A multi-center, retrospective, observational study. medRxiv 2020.

107. Long QX et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nat. Med. 2020, 26, 845-848

108. Lin D et al. Evaluations of serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020, 39, 2271–2277.

109. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin. Chem. 2005, 51, 2415–2418.

110. Dahlke C et al. Distinct early IgA profile may determine severity of COVID-19 symptoms: An immunological case series. medRxiv 2020.

111. Amanat F et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. Nat. Med. 2020, 26, 1033–1036.

112. Okba NM et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. Nat. Med. 2020, 26, 845–848.

113. Hicks JM. Fluorescence immunoassay. Hum. Pathol. 1984, 15, 112–116.

114. Rowland RR. Serological Approach for Diagnosis and Surveillance of Multiple Agents in Serum and Oral Fluid Samples. Available online: https://porkcheckoff.org/research/serological-approach-for-diagnosis-and-surveillance-of-multiple-agents- in-serum-and-oral-fluid-samples/.

115. Langenhorst RJ et al. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19, 180–189.

116. Fang C et al. Barcode lateral flow immunochromatographic strip for prostate acid phosphatase determination. J. Pharm. Biomed. Anal. 2011, 56, 1035-1040

117. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. Essays Biochem. 2016, 60, 111–120.

118. In Vitro Diagnostics EUAs. https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19- emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas

119. Facco M et al. Microarrays proteici e proteomica: nuove tecnologie per l'identificazione di marker biologici. Riv Med Lab - JLM, Vol. 4, N. 1, 2003

120. Wingren C, Borrebaeck CA. Antibody-based microarrays. In Microchip Methods in Diagnostics; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; 57–84.

121. Jiang H et al. SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses. Nat. Commun. 2020, 11, 1–11

122. Sanchez-Carbayo M. Antibody microarrays as tools for biomarker discovery. In Protein Microarrays; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; 159-182

123. Zhu H et al. The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. TrAC Trends Anal. Chem. 2020, 130, 115984

124. To KK-W et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: An observational cohort study. Lancet Infect. Dis. 2020, 20, 565–574

125. Lin Q et al. Microfluidic immunoassays for sensitive and simultaneous detection of IgG/IgM/antigen of SARS-CoV-2 within 15 min. Anal. Chem. 2020, 92, 9454–9458

126. I vaccini anti COVID-19. https://www.epicentro.iss.it/vaccini/covid-19 (ultimo accesso 08/02/2022)

127. Barberis I et al. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines, J. Prev. Med. Hyg. 57 (3) (2016) E115

128. Darnell ME et al. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome,SARS-CoV, J. Virol. Methods 121 (1) (2004) 85–91

129. Kumar A et al. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine, Front. Immunol. 9 (2018) 600

130. Fathizadeh H et al. SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review. Int J Biol Macromol. 2021 Oct 1;188:740-750.

131. Cao W-C et al. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery, N. Engl. J. Med. 357 (11) (2007) 1162–1163

132. Zhang N et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor- binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus, Cell. Mol. Immunol. 13 (2) (2016) 180–190

133. Jiaming L et al. The recombinant N-terminal domain of spike proteins is a potential vaccine against Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection, Vaccine 35 (1) (2017) 10–18

134. Benihoud K et al. Adenovirus vectors for gene delivery, Curr. Opin. Biotechnol. 10 (5) (1999) 440–447

135. Abe S et al. Adenovirus type 5 with modified hexons induces robust transgene-specific immune responses in mice with pre-existing immunity against adenovirus type 5, J. Gene Med. 11 (7) (2009) 570–579

136. Xiang Z et al. Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product, J. Virol. 76 (6) (2002) 2667–2675.

137. Dicks MD et al. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity, PloS one 7 (7) (2012), e40385

138. Duerr G et al. Parameters predicting COVID-19-induced myocardial injury and mortality, Life Sci. 260 (2020), 118400.

139. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity, EXpert Rev. Vaccines 15 (3) (2016) 313–329

140. Hassett KJ et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines, Mol. Ther. Nucleic Acids 15 (2019) 1–11.

141. Schlake T et al. Developing mRNA-vaccine technologies, RNA Biol. 9 (11) (2012) 1319–1330.

142. An D et al. Long-term efficacy and safety of mRNA therapy in two murine models of methylmalonic acidemia, EBioMedicine 45 (2019) 519–528.

143. Walsh EE et al. RNA-based COVID-19 Vaccine BNT162b2 Selected for a Pivotal Efficacy Study, Medrxiv, 2020.

144. Anderson EJ et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults, N. Engl. J. Med. 383 (25) (2020) 2427–2438.

145. Silveira MM et al. DNA vaccines against COVID-19: perspectives and challenges, Life Sci. 118919 (2020).

146. Rapporto sulla Sorveglianza dei vaccini COVID-19. Rapporto numero 9 – Periodo dal 27/12/2020 al 26/09/2021. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1315190/Rapporto_sorveglianza_vaccini_COVID-19_9.pdf (ultimo accesso 08/02/2022)

147. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Our world in data. https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL (ultimo accesso 08/02/2022)

148. Report Vaccini Anti COVID-19. https://www.governo.it/it/cscovid19/report-vaccini/ (ultimo accesso 08/02/2022).

149. Aleem A et al. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). [Updated 2022 Jan 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.

150. Giovanetti M et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 29;538:88-91

151. Korber B et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. Cell. 2020 Aug 20;182(4):812-827.e19

152. Oreshkova N et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. Euro Surveill. 2020 Jun;25(23)

153. Chi X et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. Science. 2020 Aug 07;369(6504):650-655.

154. Prevalenza e distribuzione delle varianti di SARS-CoV-2 di interesse per la sanità pubblica in Italia. Rapporto n. 16 del 19 gennaio 2022 (dari aggiornati al 10 gennaio 2022). https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/pdf/sars-cov-2-monitoraggio-varianti-rapporti-periodici-19-gennaio-2022.pdf

155. https://www.aifa.gov.it/uso-degli-antivirali-orali-per-covid-19 (ultimo accesso 21/02/2022).

156. Paxlovid. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-2022 Jan 31. PMID: 35138785.

157. https://www.science.org/content/article/pfizer-antiviral-slashes-covid-19-hospitalizations (ultimo accesso 21/02/2022).

158. Singh AK et al. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. Diabetes Metab Syndr. 2021 Nov-Dec;15(6):102329.

159. Cannalire R et al. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. J Med Chem. 2020 Nov 13:acs.jmedchem.0c01140. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01140. Epub ahead of print. PMID: 33186044; PMCID: PMC7688049.

160. Sheahan TP et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. Sci Transl Med. 2020 Apr 29;12(541):eabb5883. doi: 10.1126/scitranslmed.abb5883. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32253226; PMCID: PMC7164393.

161. Peeling RW et al. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. Lancet. 2022 Feb 19;399(10326):757-768.

162. WHO Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities. Interim guidance. June 25, 2021.

163. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA. 2020;323:1843–1844.

164. European Centre for Disease Prevention and Control Diagnostic testing and screening for SARS-CoV-2. May 21, 2021. https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/diagnostic-testing

165. African Union and Africa Centres for Disease Control and Prevention Interim guidance on the use of rapid antigen tests for COVID-19 response. Dec 16, 2020. https://africacdc.org/download/interim-guidance-on-the-use-of-rapid-antigen-tests-for-covid-19-response/

166. European Centre for Disease Prevention and Control Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA - first update. Oct 26, 2021.

167. Black JRM, Bailey C, Przewrocka J, Dijkstra KK, Swanton C. COVID-19: the case for health-care worker screening to prevent hospital transmission. Lancet. 2020;395:1418–1420.

168. Hellewell J, Russell TW, Beale R, et al. Estimating the effectiveness of routine asymptomatic PCR testing at different frequencies for the detection of SARS-CoV-2 infections. BMC Med. 2021;19:106

169. Larremore DB, Wilder B, Lester E, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. Sci Adv. 2021;7

170. Nomura Y et al. Age and Smoking Predict Antibody Titres at 3 Months after the Second Dose of the BNT162b2 COVID-19 Vaccine. Vaccines (Basel). 2021 Sep 18;9(9):1042

171. Krüttgen A et al. Determination of SARS-CoV-2 antibodies with assays from Diasorin, Roche and IDvet. J Virol Methods. 2021 Jan;287:113978

172. De Ory F et al. Comparison of commercial methods of immunoblot, ELISA, and chemiluminescent immunoassay for detecting type-specific herpes simplex viruses-1 and -2 IgG. J Clin Lab Anal. 2018 Jan;32(1):e22203.

173. Piccoli L et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. Cell. 2020 Nov 12;183(4):1024-1042.e21

174. Xia X. Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. Viruses. 2021;13(1):109

175. Topol EJ. Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2. Cell. 2021;184(6):1401. doi:10.1016/j.cell.2020.12.039

176. Sahin U et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. Nature. 2021 Jul;595(7868):572-577.

177. Banerji A et al. mRNA Vaccines to Prevent COVID-19 Disease and Reported Allergic Reactions: Current Evidence and Suggested Approach. J Allergy Clin Immunol Pract. 2021 Apr;9(4):1423-1437

178. Polack FP et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med. 2020 Dec 31;383(27):2603-2615

179. Thompson MG et al. Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers - Eight U.S. Locations, December 2020-March 2021. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2021 Apr 2;70(13):495-500

180. Britton A et al. Effectiveness of the Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine Among Residents of Two Skilled Nursing Facilities Experiencing COVID-19 Outbreaks - Connecticut,

December 2020-February 2021. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2021 Mar 19;70(11):396-401

181. Madison AA et al. Psychological and Behavioral Predictors of Vaccine Efficacy: Considerations for COVID-19. Perspect. Psychol. Sci. 2021, 16, 191–203

182. Salvagno GL et al. Anti-SARS-CoV- 2 Receptor-Binding Domain Total Antibodies Response in Seropositive and Seronegative Healthcare Workers Undergoing COVID-19 mRNA BNT162b2 Vaccination. Diagnostics 2021, 11, 832

183. Schenkelberg T. Vaccine-induced protection in aging adults and pandemic response. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 29;538:218-22

184. Crooke SN et al. Immunosenescence and human vaccine immune responses. Immun Ageing. 2019 Sep 13;16:25

185. Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? Immun Ageing. 2012 Jul 25;9(1):15

186. Aiello A et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. Front Immunol. 2019 Sep 25;10:2247

187. Kageyama T et al. Antibody responses to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and their predictors among healthcare workers in a tertiary referral hospital in Japan. Clin Microbiol Infect. 2021 Dec;27(12):1861.e1-1861.e5.

188. Vassilaki N et al. Impact of Age and Sex on Antibody Response Following the Second Dose of COVID-19 BNT162b2 mRNA Vaccine in Greek Healthcare Workers. Microorganisms. 2021 Aug 13;9(8):1725.

189. Muller L et al. Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination. Clin Infect Dis. 2021 Dec 6;73(11):2065-2072

190. Dorschug A et al. Comparative Assessment of Sera from Individuals after S-Gene RNA-Based SARS-CoV-2 Vaccination with Spike-Protein-Based and Nucleocapsid-Based Serological Assays. Diagnostics 2021, 11, 426

191. Butterworth M et al. Influence of sex in immunoglobulin levels. Nature. 1967 Jun 17;214(5094):1224-5

192. Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. Clin Microbiol Rev. 2019 Mar 13;32(2):e00084-18

193. Grzelak L et al. Sex Differences in the Evolution of Neutralizing Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. J Infect Dis. 2021 Sep 17;224(6):983-988

194. Korte W et al. SARS-CoV-2 IgG and IgA antibody response is gender dependent; and IgG antibodies rapidly decline early on. J Infect. 2021 Jan;82(1):e11-e14

195. Mehew J et al. Convalescent plasma for COVID-19: male gender, older age and hospitalisation associated with high neutralising antibody levels, England, 22 April to 12 May 2020. Euro Surveill. 2020 Nov;25(45):2001754

196. Kontopoulou K et al. Immunogenicity after the first dose of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine: real-world evidence from Greek healthcare workers. J Med Microbiol. 2021 Aug;70(8):001387

197. Kamal AJ et al. Impact of age, gender, ethnicity and prior disease status on immunogenicity following administration of a single dose of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine: real-world evidence from Israeli healthcare workers, December-January 2020. Eurosurveillance doi: 10.2807/1560-7917.es.2021.26.6.2100096

198. Bayart JL et al. Confounding Factors Influencing the Kinetics and Magnitude of Serological Response Following Administration of BNT162b2. Microorganisms. 2021 Jun 21;9(6):1340

199. Cavalcanti E et al. Vaccination strategy and anti - SARS-CoV-2 S titers in healthcare workers of the INT - IRCCS "Fondazione Pascale" Cancer Center (Naples, Italy). Infect Agent Cancer. 2021 May 12;16(1):32

200. Krammer F et al. Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. N Engl J Med. 2021 Apr 8;384(14):1372-1374

201. Padoan A et al. Antibody response to first and second dose of BNT162b2 in a cohort of characterized healthcare workers. Clin Chim Acta. 2021 Aug;519:60-63

202. Blain H et al. Spike Antibody Levels of Nursing Home Residents With or Without Prior COVID-19 3 Weeks After a Single BNT162b2 Vaccine Dose. JAMA. 2021 Apr 15;325(18):1898–9

203. Blomberg BB, Frasca D. Quantity, not quality, of antibody response decreased in the elderly. J Clin Invest. 2011;121(8):2981-2983

204. Gustafson CE et al. Influence of immune aging on vaccine responses. J Allergy Clin Immunol. 2020 May;145(5):1309-1321

205. Pera A et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. Maturitas. 2015 Sep;82(1):50-5

206. Frasca D, Blomberg BB. Aging induces B cell defects and decreased antibody responses to influenza infection and vaccination. Immun Ageing. 2020 Nov 19;17(1):37

207. Robertson JFR et al. Delayed second dose of the BNT162b2 vaccine: innovation or misguided conjecture? Lancet. 2021 Mar 6;397(10277):879-880

208. Bieniasz PD. The Case Against Delaying Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mRNA Vaccine Boosting Doses. Clin Infect Dis. 2021 Oct 5;73(7):1321-1323

209. Jangra S et al. The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera. medRxiv [Preprint]. 2021 Jan 29:2021.01.26.21250543

210. Isolani L, Comi F. Invecchiamento nel settore sanitario italiano: dalle criticità alle soluzioni possibili.

211. Han J, Kamber M, Pei J - Data Preprocessing, Editor(s): Jiawei Han, Micheline Kamber, Jian Pei, In The Morgan Kaufmann Series in Data Management Systems, Data Mining (Third Edition), Morgan Kaufmann, 2012, Pages 83-124, ISBN 9780123814791

Elenco delle Figure

Introduzione

Figura 1 - *Il ciclo vitale di SARS-CoV-2* (9)

Figura 2 - *Modalità di trasmissione di SARS-CoV-2* (9)

Figura 3 - *I meccanismi della tempesta citochinica in COVID-19 e potenziali target terapeutici* (38)

Figura 4 - *Principio di funzionamento dei NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests)* (50)

Figure 5 e 6 - *Tampone rinofaringeo e tampone orofaringeo* (61)

Figure 7 e 8 - *Tampone nasale anteriore e tampone nasale medio* (61)

Figura 9 - *Diagnosi molecolare per COVID-19 mediante rRT-PCR* (61)

Figura 10 - *Principali test basati su metodica CLIA* (81)

Figura 11 - *I differenti tipi di vaccino anti SARS-CoV-2 e la risposta immunitaria evocata* (129)

Figura 12 - *Prevalenza della variante Omicron in Italia, al 20 Dicembre 2021* (154)

Figura 13 - P*revalenza della variante Omicron in Italia, al 3 Gennaio 2022* (154)

Figura 14 - *Andamento delle principali VOC identificate mediante sequenziamento per settimana di campionamento (28 dicembre 2020 – 10 gennaio 2022)* (154)

Figura 15 - *Meccanismo d'azione dei principali farmaci anti-virali utilizzati nel trattamento di COVID-19* (157)

Figura 16 - *Meccanismo d'azione di molnupiravir contro SARS-CoV-2, rispetto a remdesivir e favipiravir*

Figura 17 - *Algoritmo diagnostico per l'uso dei test diagnostici* (161)

Figura 18 - *"Timing" per l'uso ottimale di diversi test diagnostici per il rilevamento del COVID-19 e la risposta dell'ospite* (161)

Contributo personale

Figura I - *Confronto del titolo anticorpale sulla base della variabile "sesso"*

Figura II - *Media del titolo anticorpale normalizzato, nelle tre rilevazioni temporali (21, 28 e 50 giorni dalla prima dose di vaccino)*

Elenco delle Tabelle

Introduzione

Tabella 1 - *SARS, MERS, COVID-19 a confronto* (1)

Contributo personale

Tabella I - *Demografica di popolazione*

Tabella II - *Campioni positivi e negativi per la ricerca di anticorpi ai tre dosaggi*

Tabella III - *Confronto del titolo anticorpale sulla base della variabile "sesso"*

Tabella IV - *Confronto del titolo anticorpale sulla base della variabile "età"*

Tabella V - *Correlazione tra "età" e titolo anticorpale, mediante test di Spearman*

Tabella VI – *Modello di regressione lineare multivariato tra le variabili sesso, età e tempo ed il titolo anticorpale normalizzato*

Ringraziamenti

Alla Prof.ssa Fabiani, per non averci abbandonato in uno dei periodi più duri della nostra vita professionale, per averci spronato e rincuorato, senza arrendersi mai.

Al Prof. Macchiarelli, per gli insegnamenti ricevuti, da oltre quindici anni, e per avermi concesso l'onore di essere una sua allieva.

Alla Dott.ssa Roberta Martinelli, alla sua tenacia ed al suo essere una donna, una guida, un'amica, straordinaria.

Agli amici di sempre, non so come avrei fatto senza di loro.

Ai miei Colleghi e Colleghe, per avermi sostenuto in questo tratto di strada percorso insieme.

A Matteo, a mamma e papà, a Cinzia e Stefano, che mi fanno sentire una persona migliore e che danno un senso a tutti i miei sforzi.