

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA A CICLO UNICO IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Sviluppo di strategie di chemioprolifassi contro
l'infezione da Covid-19**

Relatore: Prof. Alberto Izzotti

Candidata: Diletta Ottanelli

Anno accademico 2020/2021

Indice

1	Introduzione.....	4
2	Storia del Coronavirus.....	5
	2.1 Epidemiologia del Coronavirus.....	6
	2.1.1 Correlazione con la diffusione del PM.....	10
	2.2 Pandemia da SARS Covid-19.....	13
	2.3 Gestione precedenti Epidemie.....	18
3	Microbiologia SARS Covid-19.....	22
	3.1 Struttura del virus.....	22
	3.2 Meccanismi di virulenza.....	25
	3.3 Segni clinici.....	27
4	Opzioni terapeutiche.....	33
	4.1 Irraggiamento con raggi UV.....	33
	4.2 Utilizzo di perossido di idrogeno.....	34
	4.3 Utilizzo di ozonizzati ad alti ozonuri.....	35
	4.4 Utilizzo di lattoferrina.....	38
	4.5 Vitamina D ed alti integratori alimentari: evidenze scientifiche e limitazioni.....	40
	4.6 Altri studi.....	42
5	Parte sperimentale.....	47

5.1 Scopi.....	47
5.2 Disegno dello studio.....	49
5.3 Materiali e metodi.....	50
5.4 Studio clinico.....	54
6 Risultati.....	56
6.1 Studio preclinico.....	56
6.2 Studio clinico.....	59
7 Conclusioni.....	70
8 Bibliografia.....	77
9 Ringraziamenti.....	88

Introduzione

Il notevole aumento dei casi di SARS Covid-19 ha reso necessario lo sviluppo di nuovi approcci preventivi e terapeutici per limitare lo sviluppo della pandemia mondiale. Lo studio in oggetto propone nuove strategie di chemioprolissi e chemioterapia di applicazione immediata per prevenire ed intervenire sull'infezione.

Data la nota capacità disinfettante dell'ozono si è ipotizzato di sfruttarlo per bloccare la penetrazione e replicazione del virus direttamente nel citoplasma della cellula. Per far ciò, si è resa necessaria la creazione di un nuovo vettore per il trasporto dell'ozono: un ausilio lipidico, olio ozonizzato ad alti ozonuri (HOO), che è stato testato per verificare sia la sua penetrazione all'interno della cellula sia controllato per evitare effetti tossici avversi sia in vivo che in vitro. Inoltre, sono stati confrontati i risultati con altri approcci terapeutici quali l'utilizzo dello stesso olio in soluzione nasale idrosolubile (HOOws), raggi UV e perossido di idrogeno.

La sicurezza dell'utilizzo di HOO è stata comprovata con la sua somministrazione a 77 pazienti senza conseguenze. 52 pazienti oncologici e 21 soggetti sani hanno ricevuto il trattamento e nessuno di essi ha sviluppato infezione da SARS Covid-19 nonostante fossero previsti un minimo di 11 casi. Inoltre, l'efficacia antivirale degli HOO è stata dimostrata in 4 pazienti infetti rilevando la scomparsa dei loro sintomi e la negativizzazione del test molecolare.

Gli studi sperimentali hanno dimostrato che la combinazione di HOO e HOOws per il trattamento chemioprolattico possono essere somministrati a dosi standard in soggetti sani per prevenire l'insorgenza del Covid-19 e ad alte dosi in soggetti infetti per intervenire sul virus. Gli HOO possono essere assunti per via orale mentre gli HOOws come spray nasale.

2 Storia del coronavirus

L'origine del SARS Covid-19 è stato oggetto di diversi studi e controversie. Nel dicembre 2019, una serie di casi di polmonite di origine sconosciuta si sono presentati a Wuhan in Cina con dati clinici rassomiglianti la polmonite virale. Un'analisi di sequenziamento profondo del tratto respiratorio inferiore ha mostrato che si trattava di un nuovo coronavirus, nominato appunto 2019 novel-coronavirus (2019-nCoV).

Le ipotesi attualmente più accreditate propendono per una eziopatogenesi a carattere zoonotico come le precedenti SARS e MERS. Si ritiene che la trasmissione sia avvenuta nel mercato umido di Wuhan dove vengono venduti animali selvatici ed i ricercatori hanno trovato una forte somiglianza con il codice proteico presente nei serpenti, in particolare nel *Bungarus multicinctus*. Si ipotizza una ricombinazione di origine sconosciuta degli spike della glicoproteina del 2019-nCoV che potrebbe spiegare la trasmissione cross-specie e la diffusione individuo-individuo.

Altri studi propendono per una selezione naturale del virus a seguito del trasferimento zoonotico, ovvero che dei progenitori dell'attuale coronavirus abbiano acquisito in maniera adattiva le caratteristiche genomiche tali da renderlo infettivo e pericoloso per l'uomo.

Sono state utilizzate cellule epiteliali delle vie respiratorie per isolare il nuovo coronavirus, chiamato SARS-CoV-2 il 12 gennaio 2020 e si tratta del settimo membro della famiglia dei Coronavirus ad essere infettivo per l'uomo. L'analisi filogenetica mostra la sua somiglianza con il coronavirus causante sindrome respiratoria acuta (SARS-CoV) ed utilizza come ingresso lo stesso recettore ACE2.

2.1 Epidemiologia Coronavirus

Si ipotizza che il virus si diffonda da persona a persona quando esse si trovano a stretto contatto includendo coloro che si trovano in un raggio di circa 2 metri. Le persone infette ma che non mostrano nessun sintomo possono essere contagiose.

La trasmissione del virus avviene tramite droplets respiratori se inalati o se si depositano sulla mucosa delle membrane, quando una persona parla, starnutisce, tossisce o respira. Il virus è stato anche isolato dalle feci di casi infetti, indicando che anche la trasmissione fecale-orale potrebbe essere una via di infezione. Le goccioline possono essere inalate o possono poggiarsi su superfici, con cui altri vengono a contatto e vengono, quindi, infettate toccandosi il naso, la bocca o gli occhi. Il virus può sopravvivere su superfici per poche ore (rame, cartone) fino a un certo numero di giorni (plastica e acciaio inossidabile). Tuttavia, la quantità di virus vitale diminuisce nel tempo e potrebbe non essere sempre presente in quantità sufficiente da causare l'infezione.

Il periodo di incubazione per COVID-19 è attualmente stimato tra uno e 14 giorni.

È noto che il virus può essere trasmesso quando le persone infette presentano sintomi come la tosse. Una persona infetta può anche trasmettere il virus fino a due giorni prima che si manifestino i sintomi; la portata con cui tali infezioni asintomatiche contribuiscono alla trasmissione non è attualmente chiara.

Secondo lo stato attuale delle conoscenze scientifiche si presume un rischio particolare solo per gli adulti. Sono considerati particolarmente a rischio gli adulti affetti da una o più delle malattie seguenti:

- ipertensione arteriosa (ipertensione arteriosa con danno agli organi bersaglio; ipertensione arteriosa resistente alla terapia);

- malattie cardiovascolari (pazienti con dispnea della classe funzionale NYHA II–IV e NT-Pro BNP > 125 pg/ml; pazienti con almeno 2 fattori di rischio cardiovascolare; ictus cerebrale pregresso e/o vasculopatia sintomatica; insufficienza renale cronica; cardiomiopatie di tutte le eziologie; ipertensione arteriosa polmonare; aritmie cardiache; fibrillazione atriale con un punteggio CHA2DS2-VASc pari ad almeno 2; precedente impianto di un pacemaker cardiaco in aggiunta a un criterio generale; cardiopatie congenite dell’adulto; cardiopatia congenita dopo valutazione individuale da parte del cardiologo curante);
- diabete (diabete mellito, con complicanze tardive o con un valore di HbA1c uguale o superiore all’8%);
- malattie croniche dei polmoni e delle vie respiratorie (malattie polmonari ostruttive croniche allo stadio GOLD II-IV; enfisema polmonare; forme di asma bronchiale particolarmente severe e non controllate; pneumopatie interstiziali / fibrosi polmonare; cancro attivo ai polmoni; ipertensione arteriosa polmonare; malattia vascolare polmonare; sarcoidosi attiva; fibrosi cistica; infezioni polmonari croniche; pazienti sottoposti a respirazione artificiale; malattie che riducono gravemente la capacità polmonare);
- malattie o terapie che indeboliscono il sistema immunitario (immunosoppressione grave; neutropenia; linfomi aggressivi; Leucemia linfatica acuta; leucemia mieloide acuta; leucemia promielocitica acuta; leucemia prolinfocitica a cellule T; linfomi primari del sistema nervoso centrale; trapianto di cellule staminali; amiloidosi; leucemia linfatica cronica; mieloma multiplo; anemia falciforme; trapianto di midollo osseo; trapianto di organi; persone in lista d’attesa per un trapianto);
- cancro;
- obesità (pazienti con un indice di massa corporea pari o superiore a 35 kg/m²);

- epatopatia;
- nefropatia (insufficienza renale cronica, a partire da GFR < 60 ml/min).

Per quanto riportato dai dati ISTAT congiuntamente al ISS nell'anno 2020 il totale dei decessi per il complesso delle cause è stato il più alto mai registrato nel nostro Paese dal secondo dopoguerra: 746.146 decessi, 100.526 decessi in più rispetto alla media 2015-2019 (15,6% di eccesso). In tale valutazione occorre tener conto che nei mesi di gennaio e febbraio 2020 i decessi per il complesso delle cause sono stati inferiori di circa 7.600 unità a quelli della media dello stesso bimestre del 2015-2019 e che i primi decessi di persone positive al Covid19 risalgono all'ultima settimana di febbraio. Pertanto, volendo stimare l'impatto dell'epidemia Covid19 sulla mortalità totale, è più appropriato considerare l'eccesso di mortalità verificatosi tra marzo e dicembre 2020. In questo periodo si sono osservati 108.178 decessi in più rispetto alla media dello stesso periodo degli anni 2015-2019 (21% di eccesso). Guardando alle classi di età, il contributo più rilevante all'eccesso dei decessi dell'anno 2020, rispetto alla media degli anni 2015-2019, è dovuto all'incremento delle morti della popolazione con 80 anni e più che spiega il 76,3% dell'eccesso di mortalità complessivo; in totale sono decedute 486.255 persone di 80 anni e oltre (76.708 in più rispetto al quinquennio precedente). L'incremento della mortalità nella classe di età 65-79 anni spiega un altro 20% dell'eccesso di decessi; in termini assoluti l'incremento per questa classe di età, rispetto al dato medio degli anni 2015-2019, è di oltre 20 mila decessi (per un totale di 184.708 morti nel 2020). Dall'inizio dell'epidemia e fino al 31 dicembre 2020 il contributo dei decessi Covid-19 alla mortalità per il complesso delle cause è stato, del 10,2%, con differenze fra le varie ripartizioni geografiche (14,5% del Nord, al 6,8% del Centro e al 5,2% del Mezzogiorno) e fasce di età (4,6% del totale nella classe 0-49 anni, 9,2% in quella 50-64 anni, 12,4% in quella 65-79 anni e 9,6% in quella di ottanta anni o più).

Lo scenario di diffusione epidemica può essere sintetizzato in tre fasi. Il periodo da febbraio alla fine di maggio 2020 (Prima ondata) si è caratterizzato per una rapidissima diffusione dei casi e dei decessi e per una forte concentrazione territoriale prevalentemente nel Nord del Paese. Nella stagione estiva, da giugno a metà settembre (Fase di transizione), la diffusione è stata inizialmente molto contenuta. A partire dalla fine di settembre 2020 (Seconda ondata) i casi sono di nuovo aumentati rapidamente fino alla prima metà di novembre, per poi diminuire. Rispetto alla prima ondata epidemica la situazione della diffusione in Italia è notevolmente mutata sia in termini quantitativi che di distribuzione geografica. L'eccesso di mortalità osservato nel 2020, a livello medio nazionale, aumenta al crescere dell'età ed è più accentuato negli uomini rispetto alle donne. Considerando la classe di età con 80 anni e più, si passa da una flessione della mortalità del 3,5% del periodo gennaio-febbraio a un aumento di circa il 40% nelle due ondate epidemiche. Per le donne della stessa classe di età la variazione dei decessi, rispetto alla media 2015-2019, va dal -7,4% del bimestre gennaio-febbraio ad un incremento del 33% circa nelle due ondate. In generale nel trimestre marzo-maggio e nell'ultimo trimestre dell'anno non cambia di molto il profilo dell'eccesso di mortalità per genere ed età a livello medio nazionale. Importanti incrementi del numero di decessi si osservano anche per gli uomini di 65-79 anni (+67,6% nella prima ondata e +38,3% nell'ultimo trimestre del 2020 al Nord); nel Mezzogiorno nel trimestre ottobre-dicembre questa è risultata la classe di età con il maggior eccesso di mortalità tanto per gli uomini quanto per le donne (+34,6% e +29,8% rispettivamente). Considerando le caratteristiche demografiche dei casi nell'intero anno 2020 si rileva come vi sia un numero leggermente più elevato di persone di sesso femminile (52%); per quanto riguarda l'età, l'8% dei casi ha meno di 14 anni, il 29% ha una età compresa tra i 15 e i 39 anni, il 40% tra i 40 e i 64 anni, il 13% tra i 65 e i 79 anni e il 10% 80 anni o più. La classe di età mediana dei casi confermati di infezione da SARS-CoV-2 segnalati al 31 dicembre 2020 è 45-49 anni, leggermente maggiore nel sesso maschile (50-54 anni); se nella prima fase dell'epidemia la classe

mediana è stata per entrambi i generi pari a 60-64 anni, nella seconda ondata è scesa alla classe 45-49 anni. A partire dalla fase di transizione, infatti, si documenta un aumento dei contagi nella fascia di età più giovane e un calo in termini percentuali dei contagi registrati nella popolazione molto anziana (80 anni e più). Questo è un segnale di come le raccomandazioni e la prevenzione messa in atto a partire dal secondo periodo di osservazione abbiano dato esiti positivi nel ridurre la trasmissione di malattia nella fascia anziana della popolazione, ma è anche una conseguenza dell'aumentata capacità diagnostica che ha facilitato l'identificazione di casi tra la popolazione più giovane, più frequentemente paucisintomatici o asintomatici.

I dati Eurostat consentono di valutare l'impatto dell'epidemia di Covid-19 sull'eccesso di mortalità totale nei diversi Paesi, confrontando i decessi settimanali del 2020 con quelli del quadriennio 2016-2019 (anziché il quinquennio 2015-2019 che viene considerato come riferimento nel presente Rapporto). A partire dal mese di marzo 2020 l'eccesso di mortalità è stato in Italia del 20,4%, inferiore a quello della Spagna (23,6%), del Belgio (20,8%) e della Polonia (23,2%) ma superiore a quello della Francia (13,2%), della Germania (7%), dell'Olanda (14,7%) e del Portogallo (13,9%). Queste differenze tra i Paesi possono essere in parte spiegate dalla rapidità di diffusione della prima ondata in alcuni Paesi, dalla velocità di diffusione e dalle diverse misure di contenimento e mitigazione intraprese. Resta tuttavia importante anche la struttura per età delle popolazioni, con i Paesi più "anziani" maggiormente penalizzati.

2.1.1 Correlazione con la diffusione del PM

È stata osservata una correlazione positiva tra la diffusione del virus e l'inquinamento atmosferico, il Covid-19 ha una trasmissione aerea ed il particolato atmosferico (PM) potrebbe avere un ruolo determinante per il suo trasporto a grandi distanze. Inoltre, il PM induce infiammazione nelle cellule

respiratorie e l'esposizione allo stesso potrebbe aggravare l'intensità dei sintomi dei pazienti infetti, perciò nelle aree ad elevato inquinamento potrebbe aumentare la mortalità e l'incidenza della malattia.

Il particolato include un misto di composti suddivisibili in 5 categorie: solfati, nitrati, carbone elementale, carbone organico, materiali misti (terra e cenere). Per definizione dell'EPA (Environmental Protection Agency) comprende una serie di particelle disperse in aria per un tempo sufficiente per essere diffuse e trasportate.

A seconda della dimensione delle particelle, il PM viene suddiviso in PM10 (diametro minore di 10 micrometri) o PM2.5 (diametro minore di 2.5 micrometri). Se queste particelle vengono inalate, possono causare diversi danni all'apparato respiratorio e numerosi studi epidemiologici hanno mostrato gli effetti dell'inquinamento sull'apparato respiratorio e cardiovascolare.

Al momento ci sono tre grandi aree geografiche che mostrano un elevato e rapido aumento di contagi correlato ad un'aria fortemente inquinata e sono Cina, Stati Uniti d'America ed Italia. Ciò potrebbe essere dovuto a due ragioni: l'alto livello di inquinamento negli anni passati causando una maggiore predisposizione della popolazione oppure la maggiore sensibilità virale collegata al livello di inquinamento nel momento in cui il virus stesso è apparso.

Va considerato che le aree dove il virus ha evidenziato l'impatto più elevato, sono le aree italiane sia ad elevata densità di popolazione sia a più alta produttività del Paese. In questi territori sono presenti il maggior numero di aziende con vocazione e crescita internazionale che hanno continui e frequenti rapporti con Paesi stranieri (in particolare Stati Uniti, Cina e Federazione Russa), con conseguente alta mobilità dei lavoratori. Infatti, molti approfondimenti epidemiologici in corso per studiare e comprendere come il virus sia entrato e si sia diffuso nell'area evidenziano l'importanza della componente legata ai rapporti di lavoro internazionali e il conseguente contagio diretto tra

persone, oltre all'iniziale diffusione del contagio in strutture sanitarie, che ha agito quale forte moltiplicatore dell'infezione. Le misure di minimizzazione degli spostamenti e di distanziamento sociale che sono state adottate stanno mostrando tutta la loro efficacia, evidenziando ancora una volta il meccanismo preferenziale di contagio della malattia COVID-19.

Lo studio di eventuali relazioni di causalità tra la diffusione del virus e l'inquinamento atmosferico, in particolare di PM, necessita quindi di essere attentamente analizzato, approfondendo la conoscenza di eventuali fattori confondenti che possono suggerire spurie associazioni causa-effetto.

In sintesi, la complessità del fenomeno, insieme alla parziale conoscenza di alcuni fattori che possono giocare o aver giocato un ruolo nella trasmissione e diffusione dell'infezione da SARS-CoV-2, rende al momento molto incerta una valutazione di associazione diretta tra elevati livelli di inquinamento atmosferico e la diffusione dell'epidemia da COVID-19, o del suo ruolo di amplificazione dell'infezione. Appare dunque necessario pianificare e realizzare studi caratterizzati da adeguati disegni e protocolli di indagine, e corredati da modelli di analisi che consentano di comprendere il ruolo giocato dalle molteplici variabili coinvolte nel fenomeno, effettuando anche un'analisi comparativa su scala più ampia quale quella europea e internazionale.

Un elemento di sicuro approfondimento potrà essere rappresentato dal ruolo dell'ambiente indoor/outdoor nel suo complesso nel determinare lo stato di salute generale della popolazione, in particolare quella residente nelle aree urbane, e come questo possa aver influito sulla gravità degli esiti dell'infezione da SARS-CoV-2. Per esempio, l'analisi dei decessi su un ampio campione di casi effettuato dall'ISS ha mostrato come la mortalità per COVID-19 sia stata elevata in soggetti che già presentavano una o più patologie (malattie respiratorie, cardiocircolatorie, obesità, diabete,

malattie renali, eccetera), sulle quali la qualità ambientale *indoor* e *outdoor* e gli stili di vita, in ambiente urbano, possono aver giocato un ruolo.

2.2 Pandemia da SARS Covid-19

L'11 marzo 2020 il direttore generale dell'organizzazione mondiale della sanità Tedros Adhanom Ghebreyesus ha dichiarato in conferenza stampa la pandemia con queste parole:

“In the past two weeks, the number of cases of COVID-19 outside China has increased 13-fold, and the number of affected countries has tripled. There are now more than 118,000 cases in 114 countries, and 4,291 people have lost their lives. Thousands more are fighting for their lives in hospitals. In the days and weeks ahead, we expect to see the number of cases, the number of deaths, and the number of affected countries climb even higher.

WHO has been assessing this outbreak around the clock and we are deeply concerned both by the alarming levels of spread and severity, and by the alarming levels of inaction. We have therefore made the assessment that COVID-19 can be characterized as a pandemic. Pandemic is not a word to use lightly or carelessly. It is a word that, if misused, can cause unreasonable fear, or unjustified acceptance that the fight is over, leading to unnecessary suffering and death.

Describing the situation as a pandemic does not change WHO's assessment of the threat posed by this virus. It does not change what WHO is doing, and it does not change what countries should do.

We have never before seen a pandemic sparked by a coronavirus. This is the first pandemic caused by a coronavirus. And we have never before seen a pandemic that can be controlled, at the same

time. WHO has been in full response mode since we were notified of the first cases. And we have called every day for countries to take urgent and aggressive action.

We have rung the alarm bell loud and clear.

As I said on Monday, just looking at the number of cases and the number of countries affected does not tell the full story. Of the 118,000 cases reported globally in 114 countries, more than 90 percent of cases are in just four countries, and two of those – China and the Republic of Korea - have significantly declining epidemics. 81 countries have not reported any cases, and 57 countries have reported 10 cases or less.

We cannot say this loudly enough, or clearly enough, or often enough: all countries can still change the course of this pandemic. If countries detect, test, treat, isolate, trace, and mobilize their people in the response, those with a handful of cases can prevent those cases becoming clusters, and those clusters becoming community transmission. Even those countries with community transmission or large clusters can turn the tide on this virus. Several countries have demonstrated that this virus can be suppressed and controlled.

The challenge for many countries who are now dealing with large clusters or community transmission is not whether they can do the same – it is whether they will.

Some countries are struggling with a lack of capacity. Some countries are struggling with a lack of resources. Some countries are struggling with a lack of resolve.

We are grateful for the measures being taken in Iran, Italy and the Republic of Korea to slow the virus and control their epidemics. We know that these measures are taking a heavy toll on societies and economies, just as they did in China.

All countries must strike a fine balance between protecting health, minimizing economic and social disruption, and respecting human rights.

WHO's mandate is public health. But we are working with many partners across all sectors to mitigate the social and economic consequences of this pandemic.

This is not just a public health crisis; it is a crisis that will touch every sector – so every sector and every individual must be involved in the fight.

I have said from the beginning that countries must take a whole-of-government, whole-of-society approach, built around a comprehensive strategy to prevent infections, save lives and minimize impact.

Let me summarize it in four key areas.

First, prepare and be ready. Second, detect, protect and treat. Third, reduce transmission. Fourth, innovate and learn.

I remind all countries that we are calling on you to activate and scale up your emergency response mechanisms; Communicate with your people about the risks and how they can protect themselves – this is everybody's business; Find, isolate, test and treat every case and trace every contact; Ready your hospitals; Protect and train your health workers.

And let us all look out for each other, because we need each other. There has been so much attention on one word. Let me give you some other words that matter much more, and that are much more actionable.

Prevention. Preparedness. Public health. Political leadership. And most of all, people.

We are in this together, to do the right things with calm and protect the citizens of the world. It is doable.

I thank you.”

Al 20 gennaio 2021, solo 7 nazioni non hanno alcun caso confermato di COVID-19. Due in Asia: Corea del Nord e Turkmenistan; 5 in Oceania: Kiribati, Tonga, Palau, Tuvalu e Nauru.

Inoltre, 9 territori dipendenti permanentemente abitati non hanno alcun caso confermato: 3 della Nuova Zelanda (Niue, isole Cook e Tokelau), 3 dell'Australia (isola di Natale, isola Norfolk e isole Cocos), 2 del Regno Unito (Sant'Elena, Ascensione e Tristan da Cunha e Isole Pitcairn) e 1 della Norvegia (Svalbard e Jan Mayen).

Per tentare di arginare la diffusione del virus, sono state introdotte diverse misure di confinamento nel mondo, sono le misure come coprifuochi, quarantene e restrizioni agli spostamenti imposte da diversi Stati del mondo.

Alcune misure includono il controllo totale del movimento, mentre altri Stati hanno imposto restrizioni basate sul tempo. Principalmente, solo le imprese essenziali potevano rimanere aperte. Scuole, università e college hanno chiuso a livello nazionale o locale in 172 paesi, colpendo circa il 98,5 per cento della popolazione studentesca del mondo.

Quasi la totalità degli stati ha imposto l'adozione di dispositivi di protezione individuale come le mascherine e raccomandato il distanziamento sociale per prevenire l'aumento dei casi.

Sono stati fatti grandi sforzi per tentare di contrastare lo sviluppo della pandemia primo tra tutti la creazione di vaccini per arginare la rapidità di contagio e diminuire la percentuale di complicanze gravi per alleggerire l'impatto sul sistema sanitario, lo sviluppo del vaccino COVID-19 è stato accelerato grazie a una collaborazione senza precedenti nell'industria farmaceutica internazionale

e tra i governi. L'urgenza di creare un vaccino per la COVID-19 ha portato a programmi compressi che hanno abbreviato la tempistica standard di sviluppo del vaccino, in alcuni casi combinando le fasi della sperimentazione clinica nell'arco di mesi, un processo tipicamente condotto sequenzialmente nel corso degli anni. Sono stati valutati più passaggi lungo l'intero percorso di sviluppo, compreso il livello di tossicità accettabile del vaccino (la sua sicurezza), se rivolgerlo a popolazioni vulnerabili, la necessità di scoperte di efficacia del vaccino, la durata della protezione vaccinale, sistemi di somministrazione speciali (come orale o nasale, piuttosto che per iniezione), regime posologico, caratteristiche di stabilità e conservazione, autorizzazione all'uso di emergenza prima della licenza formale, produzione ottimale per il ridimensionamento a miliardi di dosi e diffusione del vaccino autorizzato.

A marzo 2021, dodici vaccini erano stati autorizzati da almeno un'autorità nazionale di regolamentazione per l'uso pubblico: due vaccini a RNA (il vaccino Pfizer-BioNTech - il primo approvato per l'uso regolare - e il vaccino Moderna), quattro vaccini inattivati convenzionali (BBIBP-CorV di Sinopharm, BBV152 di Bharat Biotech, CoronaVac di Sinovac e CoviVac), quattro vaccini a vettore virale (Sputnik V dell'Istituto di ricerca Gamaleya, il vaccino Oxford-AstraZeneca, Ad5-nCoV della CanSino e il vaccino Johnson & Johnson) e due vaccini a subunità proteiche (EpiVacCorona dell'Istituto Vektor e ZF2001).

2.3 Gestione delle precedenti epidemie

Le linee guida dell'OMS del 2009 hanno dato la descrizione delle 6 fasi caratterizzanti una pandemia:

Periodo interpandemico	Fase 1	Nessun sottotipo di virus è stato riscontrato negli esseri umani. Un virus che ha causato influenza in qualcuno può essere presente negli animali. Se presente negli animali, il rischio di contagio per gli umani è considerato basso.
	Fase 2	Nessun sottotipo di virus è stato riscontrato negli esseri umani. Tuttavia, un sottotipo di virus presente negli animali potrebbe essere potenzialmente pericoloso in caso di salto di specie.
Periodo di allerta	Fase 3	Infezioni di esseri umani con un nuovo sottotipo di virus, ma nessuna diffusione fra umani stessi, o al massimo soltanto rare istanze causate da stretto contatto.
	Fase 4	Limitata trasmissione tra umano e umano ma la diffusione è altamente localizzata, il che suggerisce che il virus non è ancora adattato agli esseri umani.
	Fase 5	Trasmissione da umano a umano ancora localizzata ma più semplice, il che suggerisce che il virus si sta adattando agli esseri umani, ma potrebbe non essere ancora pienamente trasmissibile (rischio sostanziale di pandemia).
Periodo pandemico	Fase 6	Pandemia: trasmissione aumentata e continua fra la popolazione.

Dalla fine del 2003, da quando cioè i focolai di influenza aviaria da virus A/H5N1 sono divenuti endemici nei volatili nell'area estremo orientale, ed il virus ha causato infezioni gravi anche negli uomini, è diventato più concreto e persistente il rischio di una pandemia influenzale. Per questo motivo l'OMS ha raccomandato a tutti i Paesi di mettere a punto un Piano Pandemico e di aggiornarlo costantemente seguendo linee guida concordate.

Sono stati fatti molti confronti fra le precedenti pandemie ed il COVID-19, dalla SARS del 2002 e MERS del 2012 alla peste bubbonica del XIV secolo. Può essere difficile avere dei raffronti diretti in quanto ciascuna pandemia si sviluppa all'interno di circostanze specifiche, con differente natura della malattia stessa, differente contesto sociale e politico. Per esempio, la pandemia di influenza del 1918, H1N1 (comunemente chiamata influenza spagnola) si è presentata durante la Prima guerra mondiale, ed è stato significativo che i militari si spostassero in tutto il mondo favorendo la propagazione del virus.

Con il SARS-CoV-2, si è agito rapidamente imponendo coprifuochi, chiusure e quarantene, limitando la diffusione della malattia anche all'interno delle città. Inoltre, il progresso scientifico e medico e la conoscenza ed esperienza delle pandemie precedenti permettono di capire, gestire e fermare le pandemie stesse. Per esempio, è possibile identificare più facilmente nuove malattie e grazie alla codifica di procedure igieniche limitarne la diffusione.

Tuttavia, a seconda della gravità dei sintomi, della rapidità e modalità di contagio, non è garantito che le epidemie, le pandemie, o le morti possano essere evitate interamente. Il tempo necessario per la creazione di un vaccino sicuro ed efficace può aumentare la durata di una pandemia.

Alcuni esempi storici di epidemie e loro modalità di trasmissione sono:

- **influenza del 1918 e del 2009 (H1N1):** virus dell'influenza zoonotico trasmesso dai suini nel 1918 e nel 2009 via droplets e superfici infette
- **Influenza aviaria A (H5N1 e H7N9):** virus dell'influenza zoonotico trasmesso dagli uccelli e dal pollame tramite il contatto o più raramente con gli esseri umani infettati;
- **Peste bubbonica:** *Yersinia Pestis*, batteri zoonotici trovati in pulci e piccoli mammiferi a causa del morso della pulce

- **Ebola:** virus di Ebola zoonotico trasmesso da un pipistrello, si diffonde con sangue infetto o liquidi organici
- **MERS-CoV:** coronavirus zoonotico si presume che sia originario dei pipistrelli, trasmesso agli esseri umani per mezzo dei cammelli e dromedari, si diffonde via droplets
- **SARS-CoV:** coronavirus zoonotico trasmesso da un pipistrello, si diffonde via droplets

Per quanto riguarda la diffusione di una malattia, se lo scoppio dell'epidemia avviene in una città, la trasmissione è molto rapida a causa dell'alta densità di popolazione. Questo è il caso della pandemia di SARS verificatasi in Hong Kong nel 2003 e con la pandemia di Ebola a Conacry, Freetown e Monrovia dal 2014 al 2016.

SARS-CoV-2 si è sparsa molto rapidamente da Wuhan in tutta la Cina in parte perché Wuhan è uno degli hub di traffico più importanti in Cina centrale.

La globalizzazione, che ha portato ad un grande aumento della mobilità delle persone, egualmente ha permesso che il virus SARS-CoV-2 si spargesse rapidamente e sono stati necessari soltanto pochi mesi per raggiungere quasi tutto il mondo.

Per dare la misura di quanti siano i fattori da considerare, già nel 2006 il nostro ministero della salute aveva diffuso un lungo documento su come preparare una risposta nazionale a una pandemia virale. Le fasi chiave dell'azione consistono dapprima nell'identificazione dei casi, poi nell'attivazione di misure che riducano i contagi, quindi nella creazione di procedure per garantire il funzionamento dei servizi sanitari essenziali anche in un'eventuale fase critica e infine nel continuo monitoraggio dell'evoluzione dell'epidemia.

Ciascuna di queste fasi è a sua volta un insieme di azioni combinate. L'identificazione, per esempio, passa attraverso l'isolamento dell'agente patogeno, lo studio delle sue caratteristiche, l'analisi dei sintomi peculiari che fa insorgere e la messa a punto di un sistema di diagnosi accurato e rapido. Ciò è essenziale non solo per identificare le persone contagiate e predisporre misure di contenimento, ma anche per capire quali trattamenti o farmaci possano essere sviluppati e impiegati per arginare o bloccare l'epidemia.

La storia ci insegna che la probabilità di avere un vaccino disponibile in tempi rapidi è piuttosto remota. Se si dovesse idearlo da zero, infatti, sarebbero necessari anni di studi e sperimentazioni, e l'unica speranza concreta è che si possano sfruttare i risultati ottenuti nella produzione di altri vaccini per virus simili. In Cina, infatti, si è ancora al lavoro dopo anni di ricerche per ottimizzare un vaccino contro la SARS, e il tipo di azione che questo trattamento dovrebbe garantire (ossia il blocco dei recettori usati del virus per infettare le cellule) potrebbe in linea teorica funzionare anche per il nuovo coronavirus. Fino a che non si ha disponibilità di vaccini, le opzioni sono somministrazione di farmaci che contrastino e attenuino i singoli sintomi dell'infezione (senza però fornire una vera cura) e soprattutto la riduzione più possibile di occasioni di trasmissione da persona a persona, confidando che il sistema immunitario di sani e malati possa fare il resto.

3 Microbiologia SARS Covid 19

3.1 Struttura del virus

I coronavirus hanno un virione pleomorfo, in genere rotondeggiante, con peplomeri ben evidenti di forma tozza che formano una evidente corona intorno al virione che racchiude un nucleocapside elicoidale di 10-20 nm di diametro. Nel virione sono presenti quattro proteine strutturali principali note come: proteina S (spike), E (involucro), M (membrana) e N (nucleocapside); la proteina N contiene il genoma dell'RNA mentre le proteine S, E ed M creano insieme il capsido virale. La proteina spike è quella che permette al virus di attaccarsi alla membrana di una cellula ospite.

La replicazione avviene nel citoplasma ed il virione si forma per gemmazione attraverso membrane intracitoplasmatiche. La liberazione del virione all'esterno avviene per la fusione successiva con la membrana cellulare esterna o per lisi della cellula infetta.

Fino a poco tempo fa erano noti soltanto i virus 229E ed OC43 che sono ubiquitari ed univocamente accettati come causa del raffreddore, con una trasmissione prevalente per via aerea ed un picco di morbosità nel periodo invernale-primaverile.

Ad oggi, i coronavirus infettanti l'uomo noti sono sette, oltre i due già citati sono stati identificati i virus NL63, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2.

Il Covid-19 appartiene al genere betacoronavirus, che è un tipo di virus incapsulato a singolo filamento di RNA che infetta uomini ed animali, che spesso si diffonde senza alcun sintomo.

Partendo dallo strato più esterno e procedendo via via verso l'interno del virus, è possibile notare diverse componenti:

Glicoproteina S (“*spike*”): il virus mostra delle proiezioni sulla propria superficie, della lunghezza di circa 20 nm. Tali proiezioni sono formate dalla glicoproteina S. Tre glicoproteine S unite compongono un trimero; i trimeri di questa proteina formano le strutture che, nel loro insieme, somigliano a una corona che circonda il virione. Le differenze principali di questo nuovo Coronavirus rispetto al virus della SARS sembrano essere localizzate proprio in questa proteina spike. La glicoproteina S è quella che determina la specificità del virus per le cellule epiteliali del tratto respiratorio: il SARS-CoV-2 è infatti in grado di legare il recettore ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*), espresso dalle cellule dei capillari dei polmoni. Spike è formata da due componenti amminoacidiche maggiori, chiamate subunità S1 e subunità S2:

- La subunità S1 ospita una sequenza di aminoacidi nota come RBD (*Receptor Binding Domain*), la quale è fondamentale per legare il virus alle cellule dell'ospite (ossia l'essere umano).
- La subunità S2, invece, è la sede di sequenze amminoacidiche, la cui funzione finale è favorire la fusione e l'ingresso del virus nelle cellule dell'ospite.

Proteina M: la proteina di membrana (M) attraversa il rivestimento (envelope) interagendo all'interno del virione con il complesso RNA-proteina. La proteina M di SARS-CoV-2 ricopre varie funzioni:

- Definisce la forma del pericapside;
- Interagendo con le proteine E, N ed S, organizza l'assemblaggio dei virioni.

La ricerca ha dimostrato che senza la proteina M, ma con tutte le altre proteine strutturali a disposizione, SARS-CoV-2 è incapace di assemblare nuovi virioni all'interno dell'ospite; questo significa che le proteine M hanno un ruolo chiave nel suddetto processo. D'altro canto, le evidenze suggeriscono che:

- L'interazione tra la proteina M e la proteina S assicura l'incorporazione di quest'ultima nei nuovi virioni;
- L'interazione tra la proteina M e la proteina N stabilizza il nucleocapside (ossia il complesso RNA – proteina N) e promuove l'assemblaggio finale dei virioni.
- Assieme alla proteina E, contribuisce alla formazione del pericapside.

Dimero emagglutinina-esterasi (HE): questa proteina del rivestimento, più piccola della glicoproteina S, svolge una funzione importante durante la fase di rilascio del virus all'interno della cellula ospite

Proteina E: l'espressione di questa proteina aiuta la glicoproteina S (e quindi il virus) ad attaccarsi alla membrana della cellula bersaglio. Esse costituiscono un gruppo di proteine molto piccole, formate soltanto da 75-109 aminoacidi.

Nonostante le loro dimensioni ridotte, le proteine E hanno un ruolo funzionale estremamente significativo: esse, infatti, sono di supporto all'assemblaggio e al rilascio dei virioni.

Gli studi a riguardo hanno evidenziato che la proteina E di SARS-CoV-2 sia una viroporina, che, una volta nella cellula ospite, va a localizzarsi sulla membrana dell'apparato di Golgi e del reticolo endoplasmatico, per favorire l'assemblaggio e il rilascio dei virioni. La proteina E di SARS-CoV-2 è molto simile a quella di SARS-CoV-1, mentre presenta alcune differenze rispetto a quella di MERS-CoV.

Envelope: è il rivestimento del virus, costituito da una membrana che il virus "eredita" dalla cellula ospite dopo averla infettata.

RNA e proteina N: il genoma dei Coronavirus è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva di grande taglia (da 27 a 32 kb nei diversi virus); non sono noti virus a RNA di taglia maggiore. L'RNA dà origine a sette proteine virali ed è associato alla proteina N, che ne aumenta la stabilità. La proteina N, o proteina del nucleocapside, è l'unica proteina di SARS-CoV-2 in grado di legarsi al genoma virale. Non a caso, grazie a questa proprietà, ha un ruolo chiave nel processo di confezionamento dell'RNA virale all'interno dei nuovi virioni.

Come anticipato, a mediare l'azione della proteina N è la proteina M: l'interazione tra queste due proteine, infatti, stabilizza il nucleocapside e promuove l'assemblaggio finale dei virioni. È da segnalare che dagli studi sulla proteina N è emerso che quest'ultima sia coinvolta anche nella trascrizione e nella replicazione dell'RNA virale. In seguito a tale scoperta, gli esperti hanno cominciato a considerare la proteina N un possibile bersaglio di nuovi farmaci specifici contro SARS-CoV-2. La proteina N è altamente conservata nei coronavirus: per esempio, quella di SARS-CoV-2 presenta una sequenza amminoacidica sovrapponibile per il 90% a quella di SARS-CoV-1.

3.2 Meccanismi di virulenza

Allo stato nativo (cioè quando il virus non sta infettando nessuno), la proteina spike è in forma di precursore inattivo. Nel momento in cui il virus incontra un potenziale organismo da infettare, però, passa immediatamente a una forma attiva: a innescare il processo di attivazione sono le proteasi delle cellule bersaglio (quindi è l'ospite stesso ad attivarla!), le quali "spezzano" la spike e formano le subunità S1 e S2. La proteina spike è fondamentale per avviare il processo di infezione dell'ospite; in altre parole, è l'arma che il Nuovo Coronavirus utilizza per provocare l'infezione nota come COVID-19.

Il processo d'infezione condotto da spike può suddividersi in due momenti:

- Il legame alla cellula ospite. È la fase in cui il virus aggredisce e si lega alle cellule dell'organismo che poi infetterà.
- La fusione della membrana virale (in sostanza del virus) con la membrana della cellula ospite. È la fase che permette al virus di introdursi nelle cellule dell'organismo aggredito e diffondervi il suo genoma.

La proteina spike effettua il legame alle cellule dell'ospite attraverso la sequenza RBD della subunità S1. Gli studi scientifici hanno osservato che la sequenza RBD si lega alle cellule ospiti per mezzo di un'interazione con il recettore ACE2 posto sulla superficie della membrana plasmatica delle cellule stesse. Una volta che la subunità S1 si è legata ad ACE2, la proteina S comincia a cambiare conformazione; questo evento serve a favorire la fase di fusione e l'ingresso del virus nella cellula ospite.

La proteina spike attua la fusione del virus alla cellula ospite attraverso le sequenze amminoacidiche della subunità S2. Il processo di fusione del virus avviene sull'onda del cambio conformazionale della proteina S indotto dal legame tra RBD e il recettore ACE2 dell'ospite: il cambio di conformazione di spike, infatti, avvicina la membrana virale alla membrana plasmatica della cellula ospite, fino all'interazione, alla fusione tra membrane e, infine, all'inglobamento del virus infettante. Una volta che il genoma virale è all'interno della cellula ospite, il virus inizia la sua replicazione e il processo d'infezione può considerarsi completato.

A ingresso avvenuto, SARS-CoV-2 si "appropria" dei ribosomi dell'ospite e li sfrutta per tradurre il proprio genoma a RNA e creare le proteine necessarie alla replicazione dello stesso materiale genetico e all'assemblaggio di nuovi virioni.

Con la trascrizione e la replicazione del genoma virale, SARS-CoV-2 comincia a diffondersi nell'ospite, dando il via alla malattia infettiva vera e propria.

In questa fase, il virus agisce sull'organismo ospite sia con un'attività citocida sia con meccanismi immuno-mediati.

Per quanto concerne l'attività citocida, le evidenze suggeriscono che SARS-CoV-2 induca apoptosi e lisi cellulare; più nel dettaglio, è emerso che il virus produca dei sincizi all'interno della cellula infettata e causi la rottura dell'apparato di Golgi, a replicazione avvenuta.

Per quanto riguarda invece i meccanismi immuno-mediati, le ricerche hanno dimostrato che SARS-CoV-2 coinvolge sia il sistema immunitario innato, sia quello adattativo (anticorpi e linfociti T).

3.3 Segni clinici

Dopo un tempo medio di incubazione di circa 5 giorni (range: 2-14 giorni), una tipica infezione da COVID-19 inizia con tosse secca e febbre a basso grado (38,1-39°C), spesso accompagnata da una diminuzione dell'odore e del gusto. Nella maggior parte dei pazienti, la Covid-19 rimane lieve o moderata e i sintomi si risolvono entro una settimana e i pazienti in genere guariscono a casa. Circa il 10% dei pazienti rimane sintomatico fino alla seconda settimana. Più i sintomi persistono a lungo, maggiore è il rischio di sviluppare sintomi più gravi, che richiedono il ricovero in ospedale, la terapia intensiva e la ventilazione invasiva. L'esito dell'infezione da SARS-CoV-2 è spesso imprevedibile, soprattutto nei pazienti anziani con comorbidità. Il quadro clinico varia da un decorso completamente asintomatico ad un decorso rapidamente devastante.

Una pletera di sintomi è stata descritta negli ultimi mesi, indicando chiaramente che la COVID-19 è una malattia complessa, che in nessun modo consiste solo in un'infezione respiratoria. Molti sintomi non sono specifici, cosicché la diagnosi differenziale comprende una vasta gamma di infezioni,

malattie respiratorie e altre malattie. Tuttavia, in COVID-19 si possono distinguere diversi cluster. Il cluster di sintomi più comune comprende il sistema respiratorio: tosse, espettorato, respiro corto e febbre. Altri cluster comprendono sintomi muscoloscheletrici (mialgia, dolori articolari, cefalea e affaticamento), sintomi enterici (dolori addominali, vomito e diarrea); e meno comunemente, un cluster muco cutaneo.

Nei primi studi condotti in Cina, la febbre era il sintomo più comune, con un massimo mediano di 38,3 °C; solo pochi avevano una temperatura superiore a 39 °C. L'assenza di febbre sembra essere un po' più frequente rispetto alla SARS o al MERS; la febbre da sola potrebbe quindi non essere sufficiente per rilevare i casi nella sorveglianza pubblica. Il secondo sintomo più comune è stato la tosse, che si è manifestata in circa due terzi dei pazienti. Febbre e tosse non distinguono tra casi lievi e gravi, né prevedono il decorso di COVID-19. Al contrario, la mancanza di respiro è stata identificata come un forte predittore di malattia grave in studi più ampi.

L'insieme dei sintomi muscoloscheletrici comprende mialgia, dolori articolari, cefalea e affaticamento. Si tratta di sintomi frequenti, che si verificano ciascuno nel 15-40% dei pazienti. Anche se soggettivamente molto inquietanti e a volte soprattutto nella percezione del paziente, questi sintomi non ci dicono nulla sulla gravità del quadro clinico. Tuttavia, sono spesso trascurati nella pratica clinica, e il mal di testa merita un'attenzione particolare.

Caratteristiche significative sono la cefalea bilaterale moderatamente grave, con qualità pulsante o pressante nella regione temporo-parietale, fronte o periorbitale. Le caratteristiche più evidenti sono l'insorgenza da improvvisa a graduale e la scarsa risposta ai comuni analgesici. Possibili meccanismi fisiopatologici includono l'attivazione delle terminazioni nervose del trigemino periferico da parte della SARS-CoV-2 direttamente o attraverso la vasculopatia e / o l'aumento delle citochine pro-infiammatorie/infiammatorie circolanti e l'ipossia.

Esperimenti cellulari hanno dimostrato che la SARS-CoV e la SARS-CoV-2 sono in grado di infettare gli enterociti. La calprotectina fecale come biomarcatore fecale affidabile che permette di individuare l'infiammazione intestinale nelle malattie infiammatorie intestinali e nella colite infettiva, è stata trovata in alcuni pazienti, fornendo la prova che l'infezione da SARS-CoV-2 provoca una risposta infiammatoria nell'intestino. Questi risultati spiegano perché i sintomi gastrointestinali sono osservati in un sottoinsieme di pazienti e perché l'RNA virale può essere trovato in tamponi rettali, anche dopo che il test nasofaringeo è diventato negativo. Nei pazienti con diarrea, l'RNA virale è stato rilevato ad alta frequenza nelle feci.

Anche se i sintomi del tratto respiratorio superiore come la rinorrea, la congestione nasale, gli starnuti e il mal di gola sono relativamente insoliti, è diventato chiaro nel giro di poche settimane che l'anosmia e l'iposmia sono segni importanti della malattia. È interessante notare che questi sintomi otorinolaringoiatrici sembrano essere molto più comuni in Europa che in Asia. Il più grande studio finora ha rilevato che l'87% dei pazienti hanno riferito di aver perso l'olfatto, mentre il 56% hanno riferito di avere disfunzioni del gusto. La maggior parte dei pazienti ha avuto perdita di odore dopo altri sintomi generali e otorinolaringoiatrici. La durata media della disfunzione olfattiva è stata di 8,4 giorni. Le femmine sembrano essere più colpite rispetto ai maschi. La prevalenza di disfunzioni olfattive e gustative auto-riferite è stata più alta di quanto riportato in precedenza e può essere caratterizzata da diverse forme cliniche. L'anosmia non può essere correlata ad ostruzione nasale o infiammazione. Da notare che solo due terzi dei pazienti che hanno riportato sintomi olfattivi e che hanno avuto test olfattivi oggettivi hanno avuto risultati anomali.

Vi è una crescente evidenza di effetti diretti e indiretti della SARS-CoV-2 sul cuore, soprattutto nei pazienti con malattie cardiache preesistenti. La SARS-CoV-2 ha il potenziale di infettare i cardiomiociti, i periciti e i fibroblasti attraverso il percorso ACE2 che porta a una lesione diretta del miocardio, ma la sequenza fisiopatologica rimane non dimostrata. Una seconda ipotesi per spiegare

i centri di lesioni del miocardio legati alla COVID-19 sulla citochina in eccesso e/o meccanismi anticorpali mediati.

Clinicamente, COVID-19 può manifestarsi con una sindrome cardiovascolare acuta (chiamata "ACovCS", per la sindrome cardiovascolare acuta COVID-19). Sono stati descritti numerosi casi con ACovCS, non solo con i tipici disturbi toracici, ma anche con manifestazioni cardiovascolari molto diverse.

Oltre all'ACovCS, è possibile una vasta gamma di manifestazioni cardiovascolari, tra cui scompenso cardiaco, shock cardiogeno, aritmia e miocardite.

Le anomalie della coagulazione si verificano frequentemente in associazione con COVID-19, complicando la gestione clinica. Numerosi studi hanno riportato un numero incredibilmente elevato di tromboembolismo venoso (TEV), specialmente in quelli con COVID-19 grave. La coagulopatia iniziale di COVID-19 presenta un'elevazione preminente del D-dimero e dei prodotti di degradazione della fibrina/fibrinogeno, mentre le anomalie nel tempo di protrombina, nel tempo di tromboplastina parziale e nella conta piastrinica sono relativamente rare.

La propensione neuroinvasiva è stata dimostrata come una caratteristica comune dei coronavirus umani. Per quanto riguarda la SARS-CoV-2, occorrenze precoci come i sintomi olfattivi dovrebbero essere ulteriormente valutate per il coinvolgimento del SNC.

Soprattutto nei pazienti con COVID-19 grave, i sintomi neurologici sono comuni. I pazienti con COVID-19 potrebbero manifestare delirio, confusione, agitazione e coscienza alterata, così come i sintomi di depressione, ansia e insonnia. Non è ancora chiaro quali di queste caratteristiche siano dovute a encefalopatia critica correlata a malattie, citochine, o all'effetto o al ritiro dei farmaci, e quali siano specifiche dell'infezione da SARS-CoV-2.

Da notare che non vi sono prove evidenti di danni al sistema nervoso centrale causati direttamente dalla SARS-CoV-2.

Numerosi studi hanno riferito di manifestazioni cutanee viste nel contesto di COVID-19. Il fenomeno più evidente, le cosiddette “dita dei piedi COVID”, sono lesioni simili al gelone che si verificano principalmente nelle aree acrali. Queste lesioni possono essere dolorose (a volte pruriginose, a volte asintomatiche) e possono rappresentare l’unico sintomo o le sole manifestazioni tardive dell’infezione da SARS-CoV-2. Da notare che nella maggior parte dei pazienti con “dita dei piedi COVID”, la malattia è solo da lieve a moderata. Si ipotizza che le lesioni siano causate da un’inflammatione delle pareti dei vasi sanguigni o da piccoli micro-coaguli nel sangue. Tuttavia, non è ancora noto se le “dita dei piedi COVID” rappresentino un disturbo della coagulazione o una reazione di ipersensibilità.

Tra gli altri casi segnalati vi sono l’eruzione digitata papulosquamosa, l’eruzione cutanea petecchiale. Tuttavia, va tenuto presente che non tutte le eruzioni cutanee o le manifestazioni cutanee viste in pazienti con COVID-19 possono essere attribuite al virus.

Esami completi della mucocutanea, analisi di altre caratteristiche cliniche sistemiche o caratteristiche dell’ospite e correlazione istopatologica saranno fondamentali per comprendere i meccanismi fisiopatologici di ciò che vediamo sulla pelle.

La SARS-CoV-2 ha un organotropismo che va oltre le vie respiratorie, compresi i reni e il fegato. I ricercatori hanno quantificato la carica virale della SARS-CoV-2 in compartimenti renali definiti con precisione, ottenuti con l’uso di micro-dissezione tissutale da 6 pazienti sottoposti ad autopsia. Tre di questi 6 pazienti hanno avuto una carica virale SARS-CoV-2 rilevabile in tutti i compartimenti renali esaminati, con targeting preferenziale di cellule glomerulari. Il tropismo renale è una potenziale spiegazione dei segni clinici comunemente riportati di lesioni renali in pazienti con COVID-19, anche in pazienti con infezione da SARS-CoV-2 che non sono gravemente malati.

Uno dei più grandi studi, che valuta il danno epatico in 2273 pazienti positivi alla SARS-CoV-2, ha rilevato che il 45% aveva un danno epatico lieve, il 21% moderato e il 6,4% grave. In un'analisi multivariata, il danno epatico acuto grave era significativamente associato a marcatori infiammatori elevati, tra cui ferritina e IL-6. La ALT di picco è stata associata in modo significativo alla morte o alla dimissione in hospice (OR 1,14, $p = 0,044$), controllando per età, indice di massa corporea, diabete, ipertensione, intubazione e terapia renale sostitutiva. In un'altra metanalisi di 9 studi con un totale di 2115 pazienti, i pazienti con COVID-19 con lesioni epatiche erano a rischio maggiore di gravità (OR 2,57) e di mortalità (1,66).

Anche le manifestazioni oculari sono comuni. In una serie di casi provenienti dalla Cina, 12/38 pazienti hanno avuto manifestazioni oculari coerenti con la congiuntivite, tra cui iperemia congiuntivale, epifora o aumento delle secrezioni. Due pazienti hanno avuto risultati positivi alla PCR da tamponi congiuntivali. Anche la retina può essere interessata, come è stato dimostrato utilizzando la tomografia a coerenza ottica, una tecnica di imaging non invasiva che è utile per dimostrare i cambiamenti subclinici della retina. Dodici pazienti adulti hanno mostrato lesioni iper-riflettenti a livello della cellula gangliare e strati plexiformi interni più prominenti a livello del fascio papillomaculare in entrambi gli occhi. Dal loro rapporto iniziale, gli autori hanno esteso le loro scoperte a più di 150 pazienti, dimostrando un'assenza di flusso sanguigno all'interno delle lesioni retiniche di "molti" pazienti. Tuttavia, in un altro studio su 25 pazienti con malattia grave o critica in questo studio dal Brasile, solo tre (12%) hanno manifestato cambiamenti retinici convincenti (microemorragie, emorragia a forma di fiamma e infarti dello strato di fibre nervose). Questi cambiamenti retinici erano probabilmente secondari alle intercorrenze cliniche o alle co-morbilità.

4 Opzioni terapeutiche

4.1 Irraggiamento con raggi UV

Diversi studi hanno valutato sperimentalmente la possibilità di eliminare il virus Covid-19 esponendolo a raggi UV-A, UV-B o UV-C. La radiazione UV-C ha la capacità di modificare il DNA o l'RNA dei microorganismi impedendo loro di riprodursi e quindi di essere dannosi. Per tale motivo viene utilizzata in diverse applicazioni, quali la disinfezione di alimenti, acqua e aria. Studi in vitro hanno dimostrato chiaramente che la luce UV-C è in grado di inattivare il 99,99% del virus dell'influenza in aerosol. L'azione virucida e battericida, dei raggi UV-C è stata dimostrata in studi sul virus MHV-A59, un analogo murino di MERS-CoV e SARS-CoV-1. L'applicazione a goccioline (droplet) contenenti MERS-CoV ha comportato livelli non rilevabili del virus MERS-CoV dopo soli 5 minuti di esposizione all'emettitore UV-C (una riduzione percentuale superiore al 99,99%) e sono risultati efficaci anche nella sterilizzazione di campioni di sangue. In particolare, è stata dimostrata l'inattivazione di oltre il 95% del virus dell'influenza H1N1 aerosolizzato mediante un nebulizzatore in grado di produrre goccioline di aerosol di dimensioni simili a quelle generate dalla tosse e dalla respirazione umana.

Sono stati effettuati dei test a diversa esposizione ai raggi ed a diversa concentrazione virale, investigando sia l'inattivazione del virus che la sua capacità di replicazione. Una irradiazione di 16.9 mJ/cm² ha portato ad una completa inibizione di tutte le concentrazioni virali in oggetto. Questi risultati possono essere utili a spiegare le tendenze epidemiologiche del SARS-CoV-2 e per sviluppare nuovi metodi di sterilizzazione.

Si è osservato che l'infezione da Coronavirus è sensibile a fattori stagionali incluse temperatura ed umidità, tuttavia questi parametri non hanno correlazione con la distribuzione geografica dell'attuale pandemia da SARS-CoV-19. I dati disponibili mostrano però un minore impatto

dell'infezione nella stagione estiva e nei paesi con una maggiore esposizione solare, il che suggerisce la possibilità di un effetto dei raggi UV-A/B sull'evoluzione del contagio.

Un altro studio ha testato gli effetti della luce solare simulata e dell'umidità relativa sulla stabilità del Covid-19 negli aerosol generati dal virus sospesi nella saliva o in cultura a temperatura di 20° C. La luce solare simulata ha rapidamente inattivato il virus dimezzandone l'attività in 6 minuti e diminuendone la stessa del 90% in meno di 20 minuti per tutti i livelli di irraggiamento testati. Sono state notate anche delle differenze nella sua stabilità a seconda della matrice nella quale il virus era sospeso, il che potrebbe essere un importante fattore da considerare quando si esamina la persistenza del Covid-19 negli aerosol.

4.2 Utilizzo di perossido di idrogeno

Il meccanismo d'azione del perossido d'idrogeno è legato alle sue proprietà ossidanti e alla denaturazione dei componenti essenziali di microrganismi quali membrane lipidiche, proteine ed acidi nucleici. L'attività antimicrobica scaturisce infatti dalla formazione di potenti ossidanti, quali i radicali 15 idrossilici e i "singlet" dell'ossigeno. Tali specie reattive causano danni irreversibili ai componenti cellulari e al DNA. A seconda del metodo di applicazione, può avere molteplici utilizzi. Esiste un tipico processo di decontaminazione basato su perossido d'idrogeno sotto forma di gas plasma con il quale un tasso prestabilito di perossido di idrogeno viene vaporizzato e iniettato in una camera di decontaminazione. L'obiettivo è quello di favorire il più rapidamente possibile la formazione di un film sottile di perossido di idrogeno sulle superfici esposte. Una volta erogata la quantità necessaria di perossido di idrogeno, si passa alla fase di aerazione dove il vapore di perossido di idrogeno viene convertito cataliticamente in ossigeno e acqua. Tale applicazione è

soprattutto utilizzata per sterilizzare componenti elettroniche e dispositivi medici (DM) riutilizzabili termolabili ma è un processo spazialmente limitato, in quanto deve essere effettuato in autoclave.

Per la disinfezione delle superfici o ambienti il perossido d'idrogeno può essere applicato mediante aerosol o vapore. La diffusione mediante aerosol, con apparecchiature in grado di produrre particelle nell'ordine di 0,3-0,5 μm , ne consente una diffusione uniforme nell'ambiente. Responsabili dell'azione biocida del prodotto sono i radicali ossidrilici $\text{OH}\cdot$, altamente ossidanti. Il perossido d'idrogeno si decompone rapidamente in acqua e ossigeno nei diversi distretti ambientali, quali acque di superficie, terreno e aria. Inoltre, si decompone già nei liquami prima di raggiungere il sistema fognario, con un basso impatto ambientale. In merito alla pericolosità, il perossido di idrogeno è classificato ustionante, incendiario e nocivo per ingestione e per inalazione. Considerata la classificazione del principio attivo, come anche il metodo di applicazione, l'utilizzo di perossido d'idrogeno vaporizzato o aerosolizzato è ristretto ai soli operatori professionali. Per i trattamenti andranno pertanto osservate le precauzioni del caso ed è inoltre necessario rispettare i tempi per l'accesso ai locali e i tempi di decadimento.

4.3 Utilizzo di ozonizzati ad alti ozonuri

Le proprietà terapeutiche dell'olio di oliva sono note da millenni ed è utilizzato attualmente come importante componente di formulazioni topiche per il trattamento di malattie infiammatorie e dermiche. È stato inoltre dimostrato che è possibile migliorare ulteriormente le proprietà degli olii aggiungendo ozono. Infatti, l'ozono ha mostrato grandi capacità battericide, antivirali, antifungine ed antiparassitarie ed è stato utilizzato empiricamente a scopo terapeutico o come disinfettante in impianti di purificazione dell'acqua.

Il meccanismo che consente all'ozono di avere questi effetti, si basa sulle sue proprietà ossidanti che inducono la distruzione delle pareti cellulari e della membrana citoplasmatica. Ciò aumenta la permeabilità e permette l'ingresso dell'ozono nelle cellule batteriche. Inoltre, l'ozono è anche in grado di stimolare il sistema immunitario innato per contrastare i microorganismi.

Infatti, in presenza di ozono si formano prodotti di ossidazione lipidica (LOP) che inducono un aumento dei livelli di H_2O_2 , con migliore attività battericida e batteriostatica.

L'ozono è la forma instabile dell'ossigeno, non è accumulabile poiché si decompone spontaneamente. La sua concentrazione di dimezza a 30° in 25 minuti, a 20° in 40 minuti e a -50° in 3 mesi. Quando decade si divide in O_2 e O^- , rilasciando calore.

Per aumentare la sua breve emivita, è stato fatto reagire con substrati instabili producendo derivati ozonati, in particolare olii o burri di origine vegetale o animale.

Sfruttando l'allungamento vitale degli ozonati, si riescono a raggiungere il sistema vascolare ed interagire con gli organi, come il fegato (nelle epatiti croniche), il sistema vascolare (nelle vasculopatie) e nel ristabilire la normale omeostasi degli altri organi.

È stato sottolineato il fatto che il corpo umano è in grado di produrre ozono per autoproteggersi da agenti infettivi. Questo accade per il coinvolgimento dei neutrofili ed anticorpi del sistema immunitario che producono ozono.

Infine, l'ozono aumenta le proprietà reologiche del sangue, migliorando la distribuzione di ossigeno, la produzione endoteliale di NO e la modulazione immunitaria per mezzo dell'induzione delle citochine. In tal senso, l'ozono è l'induttore ideale delle citochine.

Altri studi hanno mostrato che l'ozono permette l'inattivazione del virus influenzale sulle superfici, la diminuzione dell'infettività virale a seguito dell'esposizione all'ozono e la diminuzione del ciclo riproduttivo virale.

I Coronavirus, al pari del virus Ebola, hanno regioni ricche di cisteina e triptofano nella loro proteina di membrana S. Secondo alcuni studi, l'ozono sarebbe in grado di intervenire sulla proteina S in modo da bloccarne la fusione cellulare o alterandone la capacità riproduttiva.

L'ozono agisce ossidando la glicoproteina della sua membrana, trasformandola dalla sua forma ridotta (R-S-H) in quella ossidata (R-S-S-R); il virus solitamente necessita la sua forma ridotta per entrare nelle cellule dell'ospite ed infettarle.

Nel caso in cui l'ozono non riuscisse ad intervenire direttamente, i suoi messaggeri come gli LOP o le specie reagenti di ossigeno (ROS) riuscirebbero comunque ad avere il loro potere ossidante per contrastare il virus. Se l'ozono per mezzo del processo di perossidazione danneggiasse il capsido, il ciclo riproduttivo del virus verrebbe alterato, perciò l'ozono avrebbe un effetto terapeutico nelle fasi iniziali dell'infezione.

Per mezzo dei suoi messaggeri secondari (H_2O_2), l'immunità umorale e cellulare verrebbe stimolata attraverso il percorso delle cellule T a fattore nucleare attivato e della AP-1, i quali indurrebbero l'espressione genetica di rilascio delle citochine infiammatorie reclutando linfociti e macrofagi che agirebbero per limitare l'infezione a quel livello, eliminando i patogeni locali.

L'ozono a dosi terapeutiche modula il fattore eritroide nucleare di tipo 2 (Nrf2) e NF- κ B inducendo un ribilanciamento dell'ambiente antiossidante. È stato osservato che uno sbilanciamento dei percorsi di Nrf2 e NF- κ B è associato con un gran numero di patologie, incluse le complicanze del Covid-19. Perciò l'ozono può avere un ulteriore effetto nella fase di iperinfiammazione agendo sulla tempesta citochinica.

Inoltre, la terapia ad ozono stabilizza il metabolismo epatico ed i livelli del fibrinogeno e protrombinico plasmatico tendono a stabilizzarsi nei pazienti infetti, indicando un miglioramento della sintesi delle proteine epatiche. La ricerca scientifica ha dimostrato che l'effetto dell'ozono

previene danni ossidativi ai tessuti del cuore, del fegato, dei polmoni e dei reni; perciò, sarebbe utile nelle fasi infiammatorie e di danno multiorgano dell'infezione.

Per queste ragioni, l'ozono potrebbe avere un forte impatto nella terapia e prevenzione dell'infezione da SARS CoV-19.

4.4 Utilizzo di lattoferrina

La lattoferrina è una glicoproteina legante il ferro presente nel latte della maggioranza dei mammiferi che possiede un'attività antivirale ad ampio spettro e proprietà antinfiammatorie, antifettive ed immunoregolatorie. La lattoferrina ha una struttura a catena polipeptidica semplice assemblata in due lobi simmetrici. Ciascuno dei lobi contiene due settori in grado di legarsi ad un atomo metallico. È stato dimostrato che gli effetti antivirali della lattoferrina sono mediati dal legame con il ferro e non sono affetti dai livelli di ferro insaturo.

La lattoferrina è prodotta dalla mucosa delle cellule epiteliali in quantità differente tra mammiferi e pesci, ed è anche stata trovata nelle secrezioni mucose, nei fluidi corporei e nei granuli dei neutrofili secondari.

Le attività antinfiammatorie, antifungine ed antivirali sono mediate attraverso la capacità di legarsi al ferro e di interagire con i componenti dell'ospite e del patogeno.

La lattoferrina è positivamente caricata in vivo e può legarsi a grandi molecole caricate negativamente, come i liposaccaridi ed i glicosaminoglicani, meccanismo chiave della sua capacità antivirale.

Inoltre, la lattoferrina è in grado di stimolare la protezione antivirale modulando la risposta immunitaria, aumentando la fagocitosi ed inducendo l'apoptosi. Questo avviene per mezzo della sua interazione con le cellule immunitarie e le citochine. Questo permette di migliorare le difese

immunitarie contro le eccessive infiammazioni e le infezioni, esaltando l'abilità di espressione dell'antigene delle cellule B e regolando la funzione delle cellule T.

I recettori della lattoferrina si trovano sulla superficie di varie cellule immunitarie, come alcuni linfociti, macrofagi e cellule dendritiche. Inoltre, la lattoferrina stimola l'aggregazione dei neutrofili dove avviene l'infiammazione, attiva la fagocitosi per mezzo di leucociti e macrofagociti polimorfonucleari ed aumenta l'attività delle cellule natural killer.

La somministrazione orale della lattoferrina permette di aumentare l'attività delle cellule natural killer contro le cellule infettate da virus o tumori facilitando la produzione di (IL)-18.

È stato dimostrato che la lattoferrina permette di bilanciare le proteine portatrici di ferro a livello polmonare e di ridurre il sovraccarico di ferro bronco-alveolare, che è uno dei principali fattori causanti la progressione ed inasprimento delle infezioni.

L'attività della lattoferrina è stata osservata verso diverse famiglie virali, quali: Retroviridae, Papillomaviridae, Herpesviridae, Caliciviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Pneumoviridae, Paramixoviridae, Othomixoviridae, Hepadnaviridae, Picornaviridae, Togaviridae e Geminiviridae.

Globalmente, l'effetto antivirale della lattoferrina avviene nelle prime fasi dell'infezione, prevenendo l'ingresso delle particelle virali all'interno delle cellule dell'ospite, o bloccando i recettori cellulari e/o direttamente legandosi alle particelle virali.

È stato investigato il ruolo della lattoferrina nell'ingresso del SARS pseudovirus nelle cellule Myc, la lattoferrina è in grado di bloccare il legame della proteina spike della cellula ospite, indicando che agisce allo stadio di attaccamento virale. Tuttavia, la lattoferrina non blocca l'ingresso del virus tramite l'interazione diretta tra la proteina spike con l'ACE-2. Il modello comunemente accettato suggerisce che la lattoferrina potrebbe bloccarlo interagendo con il proteoglicano sulfato eparano

(HSPGs), che media il trasporto delle particelle virali extracellulari dai siti a bassa affinità all'ingresso ad alta affinità specifica ACE-2.

Questi risultati combinati suggeriscono che la lattoferrina potrebbe avere un ruolo difensivo contro l'infezione da SARS CoV-2.

4.5 Vitamina D ed altri integratori alimentari: evidenze scientifiche e limitazioni

La vitamina D ha proprietà immunomodulatorie, antinfiammatorie, anti-fibrotiche ed antiossidanti che includono la regolazione delle citochine pro-infiammatorie ed ha mostrato di poter attenuare l'infezione polmonare acuta indotta da lipopolisaccaridi nei topi bloccando gli effetti sul percorso del segnale angiopoietina e della renin-angiopoietina. La deficienza di vitamina D è associata alla progressione delle malattie ed all'incremento della mortalità nei pazienti con malattie epatiche autoimmuni. Questa sua proprietà ha suscitato un grande interesse nella vitamina D come fattore patogenico che può essere misurato, monitorato e manipolato.

I pazienti con immunodeficienza variabile e gli anziani con una deficienza di vitamina D medio alta costituiscono un gruppo, il quale può avere gravi complicanze in caso di infezione da Covid-19. Inoltre, la vitamina D ha un ruolo importante nelle malattie cardiovascolari e nel diabete mellito e la sua deficienza è comune nei pazienti obesi e nei fumatori.

La capacità di sintesi della vitamina D peggiora con l'età, a causa della minor esposizione ai raggi solari ed alla diminuzione della sua sintesi cutanea. È stato anche notato un minor livello di vitamina D nella popolazione abitante il Sud Europa a causa della minor esposizione solare (preferenza di luoghi ombrosi nelle giornate calde) ed una pigmentazione cutanea che diminuisce la sintesi della

vitamina D. La popolazione del Nord Europa ha invece livelli più alti per il maggior consumo di olio di fegato di merluzzo e per la sua aggiunta nel latte e derivati.

Tra gli altri fattori ambientali, la variazione nell'esposizione solare, latitudine geografica e inquinamento atmosferico influenzano la formazione della vitamina D in vitro per mezzo di luce solare. Studi recenti mostrano una correlazione tra la somiglianza di temperatura e latitudine nelle città maggiormente colpite da Covid-19, corroborando l'ipotesi di un legame con i livelli di vitamina D. Questo però non permette di generalizzare lo studio a causa della difformità delle popolazioni colpite dalla pandemia e dalla differente prevalenza della vitamina D tra le varie regioni geografiche di ciascuna regione.

Probabilmente gli effetti protettivi della vitamina D contro il Covid-19 sono legati alla soppressione della risposta citochinica e per la ridotta severità della sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), ma sono stati evidenziati effetti benefici per l'assunzione di vitamine D2/D3 giornaliera, soprattutto in pazienti con carenza di vitamina D.

Pare perciò plausibile che la profilassi con vitamina D possa ridurre le complicanze indotte dal SARS-CoV-2 e ciò potrebbe diventare ancora più importante nel caso in cui si opti per un lockdown, il quale diminuirebbe le possibilità di esposizione ai raggi solari.

Bassi valori di vitamina D sono stati associati con un aumento delle citochine infiammatorie ed un significativo aumento di polmonite ed infezioni delle vie aeree superiori. Inoltre, è associata ad un aumento degli episodi trombotici, che sono stati frequentemente osservati nel Covid-19.

Tuttavia, i livelli di vitamina D sono associabili ad un elevato numero di variabili, perciò le relazioni descritte precedentemente potrebbero non essere causali, non ci sono attualmente dimostrazioni della sua efficacia con studi completamente randomizzati. Uno studio genetico con randomizzazione

Mendeliana della vitamina D non mostra nessun legame tra l'assunzione della vitamina D e la prevenzione del Covid-19.

Le attuali ed emergenti guide di implementare l'assunzione di vitamina D nella popolazione più a rischio sono giustificate, anche se ancora non chiarite le motivazioni, in quanto gli anziani e le minoranze etniche hanno i rischi maggiori in caso di infezione da SARS-CoV-2. Bisogna tuttavia prestare attenzione nel caso di prescrizione su larga scala: gli effetti di ipervitaminosi possono essere gravi e quest'ultima si manifesta solo in caso di assunzione orale, piuttosto che il frutto di una dieta equilibrata e necessità fisiologiche.

Pertanto, consigliare una dieta adeguata e bilanciata a livello vitaminico è un consiglio applicabile e prudentiale, ma attualmente non è ancora stata ancora dimostrata la correlazione univoca tra vitamina D e prevenzione del Covid-19.

4.6 Altri studi

Attualmente non esiste nessuna terapia che si sia dimostrata sicuramente efficace nella cura dell'infezione da SARS-CoV-2. Dato che si tratta di un'infezione virale e che la fase avanzata di COVID-19 è legata anche alla risposta infiammatoria dell'organismo, le classi di farmaci attualmente utilizzate includono agenti antivirali, inibitori dell'infiammazione/farmaci antireumatici, eparine a basso peso molecolare, plasma e anticorpi terapeutici.

Le prime raccomandazioni delle linee guida OMS riguardano l'idrossiclorochina: gli studi suggeriscono che l'idrossiclorochina ha un effetto negativo o minimo sulla mortalità e sul ricovero ospedaliero insieme a un probabile aumento del rischio di effetti avversi. La raccomandazione contro l'utilizzo dell'idrossiclorochina è basata sui risultati di una revisione sistematica che ha raggruppato i dati di sei studi con 6059 partecipanti a rischio di sviluppare COVID-19, che hanno ricevuto idrossiclorochina, mentre tre studi hanno arruolato partecipanti che avevano

un'esposizione nota all'infezione da SARS-CoV-2. Il gruppo di esperti ha riconosciuto che l'idrossiclorochina non è in grado di prevenire la COVID-19 e pertanto quest'area non rappresenta più una priorità della ricerca clinica e le risorse dovrebbero piuttosto essere orientate a valutare altri interventi più promettenti.

Numerose evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato che una parte importante del danno provocato dal virus è legato ad un'alterata risposta infiammatoria e in alcuni pazienti a un abnorme rilascio di citochine pro-infiammatorie come interleuchina-6, interferone-gamma, tumor necrosis factor alfa.

Per questo, anche in base alla precedente esperienza dimostrata nei pazienti con SARS, vengono utilizzati nell'emergenza Covid-19 farmaci antinfiammatori (in particolare anticorpi monoclonali) che da alcuni anni vengono utilizzati in reumatologia al fine di inibire la risposta immunitaria: il Tocilizumab e l'Anakinra.

In particolare, il farmaco maggiormente utilizzato nell'ambito delle sperimentazioni cliniche per il trattamento della malattia è stato il Tocilizumab (anticorpo diretto contro il recettore dell'interleuchina-6).

L'efficacia e la sicurezza di Emapalumab, un anticorpo monoclonale anti-interferone gamma, e Anakinra, un antagonista del recettore per la interleuchina-1, sono in fase di valutazione in uno studio di fase 2/3, multicentrico, volto a ridurre l'iper-infiammazione e il distress respiratorio in pazienti con infezione da nuovo coronavirus.

I ricercatori stanno cercando di sintetizzare anticorpi monoclonali specifici per SARS-CoV-2 in modo tale da impedire al virus, attraverso meccanismi d'azione diversi, di attaccarsi al recettore ACE-2 della cellula ospite.

Attualmente, alcuni trial sono già nella fase tre della sperimentazione.

Gli anticorpi prelevati dal sangue dei pazienti guariti rappresentano un'opzione terapeutica attualmente in fase di studio. Si calcola che la dose di anticorpi necessaria per il trattamento di un paziente affetto da SARS-CoV-2 richieda il prelievo di anticorpi effettuato da almeno tre pazienti guariti dall'infezione da SARS-CoV-2.

Parlando di trattamenti per COVID-19, si è discusso, spesso, dell'immunoterapia passiva con plasma derivato da pazienti che sono guariti dall'infezione da SARS-CoV-2.

Diversi inibitori delle proteasi (e.g. darunavir, atazanavir) attualmente utilizzati per la terapia dell'HIV, potrebbero inibire la replicazione virale dei coronavirus inattivando le proteasi, che sono fondamentali per la replicazione.

Infatti, fra i principali farmaci che sono stati utilizzati nell'ambito del piano nazionale di gestione dell'emergenza COVID-19, troviamo il Lopinavir/Ritonavir (Kaletra).

Anche Remdesivir, appartenente alla classe degli analoghi nucleotidici e utilizzato in precedenza nell'epidemia da virus Ebola in Africa, è utilizzato in pazienti con malattia moderata e severa.

E' stata recentemente pubblicata su JAMA la metanalisi *Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19*. L'obiettivo di questa metanalisi è stato quello di stimare l'associazione tra la somministrazione di corticosteroidi, rispetto allo standard di cura, e la mortalità per tutte le cause a 28 giorni in pazienti ospedalizzati in condizioni critiche con COVID-19 sospetto o confermato. Gli autori dello studio concludono che questa metanalisi prospettica di studi clinici in pazienti con COVID-19 in condizioni critiche, dimostra che la somministrazione di corticosteroidi sistemici è associata ad una più bassa mortalità per tutte le cause a 28 giorni confrontata con la terapia standard.

Pur non essendo un farmaco specifico per il trattamento della malattia da SARS-CoV-2, l'Agenzia Italiana del Farmaco, in base a risultati evidenziati in alcuni studi scientifici, inserisce le eparine a

basso peso molecolare fra i farmaci utilizzabili nel trattamento di questa patologia fornendo elementi utili ad orientare i clinici nella prescrizione.

Nella fase avanzata da COVID-19 è stata osservata un'alterazione progressiva di alcuni parametri infiammatori e coagulativi tra cui aumentati livelli dei frammenti di degradazione della fibrina come il D-dimero, consumo di fattori della coagulazione, trombocitopenia, ecc. Pertanto, in tale fase l'obiettivo dovrebbe essere il contenimento dell'iperinfiammazione e delle sue conseguenze (ad esempio con i farmaci biologici) e le EBPM o le eparine non frazionate a dosi terapeutiche sono note per le loro proprietà anticoagulanti. L'utilizzo delle EBPM si colloca: nella fase iniziale della malattia quando è presente una polmonite e si determina un'ipomobilità del paziente con allettamento, come profilassi del tromboembolismo venoso; nella fase più avanzata, in pazienti ricoverati per contenere i fenomeni trombotici a partenza dal circolo polmonare come conseguenza dell'iperinfiammazione.

Altre terapie essenziali sono le cosiddette terapie di supporto utilizzate per mantenere in vita il paziente in attesa che altri farmaci siano efficaci o che la malattia guarisca spontaneamente. Di questi fanno parte:

- ossigenoterapia a bassi o alti dosaggi
- ventilazione a pressione positiva non invasiva (NIV)
- ventilazione meccanica mediante intubazione
- extra corporeal membrane oxygenation (ECMO), che può essere attuata in casi estremi e che consiste nel sostituire l'azione polmonare di ossigenazione utilizzando una procedura di circolazione extracorporea aumentando, così, l'ossigenazione del sangue.

Un'altra misura terapeutica di supporto consiste nel mobilizzare il malato dal letto alla poltrona e di fargli assumere la posizione prona, quando disteso, al fine di ottenere una migliore espansione polmonare.

5 Parte sperimentale

5.1 Scopi

Date le continue ondate di picchi infettivi del virus SARS-CoV-2 a livello mondiale, è necessario sviluppare programmi di intervento e prevenzione contro la pandemia il più rapidamente possibile.

Lo scopo del presente studio è perciò sviluppare un nuovo approccio chemio-profilattico che crei un'efficacia preventiva immediata e che abbia anche proprietà terapeutiche. È stata fatta un'indagine per verificare l'efficacia di olii ozonizzati nel neutralizzare il virus Covid-19. L'interesse in questa pratica è sorto dall'osservazione della mancanza di ricadute nei pazienti oncologici trattati con olii ozonizzati. Infatti, le cellule staminali cancerogene sono dipendenti dagli ossidanti, i quali le rendono capaci di sfuggire agli effetti terapeutici della radioterapia.

La sostanza terapeutica utilizzata è un olio ozonizzati (HOO) sviluppato per rilasciare l'ozono intracellularmente. L'ozono è stato scelto per molteplici ragioni. È noto, infatti, che l'ozono ha proprietà virucide come disinfettante, specialmente i virus a RNA. Inoltre, è stata dimostrata una vulnerabilità del virus COVID-19 all'ozono utilizzando una caratterizzazione multiomica. Il meccanismo terapeutico proposto include l'inibizione dell'infiammazione dovuta a $\text{NFK}\beta$ ed IL-1/6; il miglioramento dello scambio gassoso e della respirazione tessutale e la prevenzione dell'ipossiemia e del collasso multiorgano.

L'utilizzo raccomandato è stata l'auto-emo-trasfusione a seguito dell'ozonizzazione del sangue. Tuttavia, a causa dell'alta volatilità dell'ozono, la finestra temporale per l'efficacia antivirale sarebbe stata limitata. Inoltre, quest'approccio invasivo non è adatto a soggetti sani e neppure ad alcuni pazienti infetti.

HOO è un vettore di ozono a base olio, che è stato utilizzato da parecchio tempo in applicazioni topiche. Quando somministrato per via orale, viene smaltito a livello epatico e distribuito nel sistema circolatorio avendo i polmoni come primo obiettivo organico. D'altra parte, l'infezione da SARS-CoV-2 avviene attraverso l'epitelio respiratorio superiore e le mucose nasofaringee. Perciò, per contrastare l'infezione direttamente al livello d'ingresso del virus, è stata creata una soluzione idrofila di HOO che consenta la sua distribuzione in spray nasali ed aerosol. Questa soluzione è stata denominata olio ozonizzato ad alti ozonuri idrosolubili (HOOws). Pertanto, la somministrazione sistematica di HOO/HOOws per il rilascio intracellulare di ozono rappresenta un nuovo strumento profilattico per prevenire l'infezione da COVID-19 in pazienti sani e per combattere l'infezione nei pazienti colpiti. Essendo questo strumento aspecifico, esso è in grado di essere potenzialmente utile contro tutte le varianti indipendentemente dalla specificità antigenica del SARS-CoV-2.

Dal punto di vista del virus, il SARS-CoV-2 è altamente sensibile all'ossidazione. Questa sensibilità è correlata alla vulnerabilità del rivestimento lipidico del virus, che è privo di difese antiossidanti. Perciò, è opportuno sfruttare questa debolezza per eliminare il virus intracellularmente, come è stato fatto con l'utilizzo di HOO/HOOws.

L'efficacia di questo approccio è stata testata inizialmente in vitro con cellule sensibili all'infezione da COVID-19 utilizzando il test standard qPCR per stabilire la penetrazione virale all'interno delle cellule. Anche se i test attuali sono validi, hanno delle limitazioni. Ad esempio, i test rapidi antigenici sono veloci ma non possiedono capacità interamente specifiche o sensibili. L'analisi PCR per porzioni di RNA virale potrebbe identificare prodotti degradati piuttosto che infezioni attive. Inoltre, non tutti i pazienti con una diagnosi di COVID-19 hanno una qPCR positiva dopo due mesi per la stessa diagnosi. Conseguentemente, la potenziale infettività di soggetti asintomatici può essere sottostimata dai test attuali, il che contribuirebbe alla continua diffusione del virus. Pertanto, per aumentare l'efficacia di determinazione, è stato creato un test biologico per identificare la presenza

di infettività virale (o la sua assenza) piuttosto che la presenza o assenza di RNA virale. Questo test può essere utilizzato anche per identificare la capacità biologica del SARS-CoV-2 di infettare altri soggetti e diffondere il virus, come i paucisintomatici.

5.2 Disegno dello studio

Lo studio in vivo è stato effettuato su 77 soggetti i quali includono pazienti oncologici non infetti (gruppo di controllo 1), soggetti sani non infetti ma a rischio di infezione da SARS-CoV-2 (gruppo di controllo 2) ed individui infetti (gruppo di intervento).

Sotto protocollo approvato, i tre gruppi di soggetti aventi le specifiche richieste sono stati scelti casualmente dalla nostra comunità. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso a partecipare, si sono sottoposti a test standard per verificare l'eventuale infezione da COVID-19 ed hanno risposto a domande standard sull'età, genere, condizioni di salute, eccetera. Sono stati prelevati tamponi naso-faringei da tutti i pazienti, i quali sono stati collocati in fiale individuali, posti in freezer a -20° C ed utilizzati entro due settimane.

Il gruppo di controllo 1 include 52 pazienti oncologici trattati con HOO come supporto integrativo per terapie antitumorali; i criteri di inclusione sono: la diagnosi di tumore, entrambi i generi, buona salute, età tra i 18 ed i 70 anni, esclusione da altri trial clinici; i criteri di esclusione sono: crescita incontrollata della massa tumorale con una prognosi di sopravvivenza inferiore ai 6 mesi, ospedalizzazione, cachessia, condizione clinica grave, collasso del midollo spinale e collasso epatico.

T0 PRE-TREATMENT TEST	VO2 Max (mL/kg/min)	VO2 (L/min)	VO2 Threshold (mL/kg/min)	VO2 Threshold (L/min)	% VO2 Max in Threshold
Subject 1	39.4	3.19	32.5	2.62	82
Subject 2	36.6	2.42	30.6	2.07	86
T1 POST-TREATMENT TEST					
Subject 1	40.9	3.27	35.6	2.94	90
Subject 2	38.9	2.63	33.4	2.08	87
T1-T0 delta after HOO TREATMENT					
Subject 1	+1.5	+0.08	+2.9	+0.32	+8
Subject 2	+2.3	+0.21	+2.8	+0.01	+1

Tabella 1. Valutazione dell'incremento dell'ossigeno polmonare a seguito dell'assunzione dell'HOO.

Il gruppo di controllo 2 include 21 soggetti sani trattati per il COVID-19 a scopo chemio-preventivo.

I criteri di inclusione sono: qualsiasi genere, buona salute, età tra i 18 ed i 70 anni, esclusione da altri trial clinici. I criteri di esclusione sono: gravidanza ed allattamento, BMI ≥ 35 kg/m², collasso epatico, epatite cronica, cirrosi, malattie epatiche colestatiche, qualsiasi condizione medica grave, abuso di alcool o droghe, casi di allergia ad arachidi nota.

Il gruppo di intervento include quattro pazienti infetti da COVID-19 trattati a scopo terapeutico. I criteri di inclusione (in aggiunta ai precedenti) sono: positività alla qPCR per SARS-CoV-2, punteggio di gravità del COVID-19 ≤ 5 ; i criteri di esclusione (in aggiunta ai precedenti) sono: polmonite acuta e critica da COVID-19, pazienti ventilati, saturazione ematica dell'ossigeno (SaO₂) inferiore all'80%.

Il consumo di HOO e HOOws per questi studi è stato approvato dal Ministero della Salute di Malta. Con una durata di tre mesi, l'HOO è stato somministrato oralmente (da una a tre capsule, tre volte al giorno); l'HOOws è stato somministrato con spray nasali, circa 100 μ L per narice ogni quattro ore.

5.3 Materiali e metodi

È stata sviluppata una coltura cellulare apposita utilizzando cellule epatiche di scimmia verde africana VERO C1008 certificate da ISZLER. Queste cellule possiedono sulla loro membrana esterna livelli di enzimi convertitori dell'angiotensina 2 più elevati della maggior parte degli altri tipi di cellule, come ad esempio le cellule bronchiali umane.

Queste cellule sono state conservate in colture semi-confluenti in laboratori standard. Il medio colturale utilizzato era un DMEM/siero fetale di vitello/tampone di HEPES, e la coltura è stata mantenuta all'interno di incubatori a 37°C con il 5% di CO₂.

Per gli esperimenti in oggetto, il medio colturale per le cellule Vero è stato cambiato in una versione modificata del DMEM/siero fetale di vitello/tampone di HEPES che ha consentito la crescita delle cellule senza CO₂ e le fiale della coltura sono state trasferite dal laboratorio di routine al laboratorio BLS3 del Centro di Ricerca dell'Ospedale San Martino. I tamponi orofaringei contenenti campioni di SARS-CoV-2 sono stati presi dal freezer, sciolti in un ambiente sicuro biologicamente in una stanza a pressione negativa ed utilizzati per lo studio nel laboratorio BLS3.

Una quota (0.5 ml) dei campioni contenenti SARS-CoV-2 è stata posta nel medio colturale Vero, ciascuna fiala è stata cautelativamente mescolata per un minuto e poi incubata per 12 ore a 37°C. È stata scelta una finestra temporale di 12 ore perché è stato osservato che il picco di maggior penetrazione virale nelle cellule avveniva dopo questo tempo. Campioni orofaringei di SARS-CoV-2 (negatività alla qPCR > 40 cicli amplificativi) sono stati utilizzati come controllo negativo.

Dopo 12 ore, le fiale sono state trasferite dall'incubatore ad un forno di ibridazione riscaldato a 60°C per trenta minuti in modo tale da inattivare l'infettività virale senza modificare l'integrità dell'RNA virale e per staccare le cellule dalla fiala. A seguito dell'inattivazione, ciascuna fiala è stata trasferita all'ambiente sicuro biologicamente dove il medio contenente le cellule (12ml) è stato prelevato e posto in tubicini sterili centrifugati a 3000xg per 15 minuti. Il soprannatante è stato scartato. Ciascun pellet cellulare è stato risospeso, lavato in una soluzione fisiologica a livello molecolare e centrifugato due volte. Per ciascun campione, la quantità di RNA in ogni pellet cellulare è stata quantificata con un'analisi di prova con una sonda fluorescente Qubit e una quantità standard di RNA equivalente ai campioni di riferimento positivi al COVID-19 è stata utilizzata per l'estrazione del RNA ed analisi qPCR. Ogni pellet è stato risospeso in acqua priva di RNAase a livello molecolare (1 ml) e congelato a -20°C fino al momento in cui è stato estratto l'RNA.

La presenza di RNA virale all'interno delle cellule di studio Vero è stata testata con qPCR utilizzando il kit SARS-CoV-2 RT- qPCR reagente. I campioni sono stati preparati utilizzando la postazione Janus G3. I campioni scongelati (300 µl), composti da cellule Vero risospese, sono stati mescolati con una soluzione contenente un tampone poli(A)RNA ed una soluzione di proteinase K (14 µl). L'estrazione dell'RNA è stata effettuata con la postazione automatica Chemagic ed il kit di estrazione a base di perline magnetiche Chemagic.

Tre sonde qPCR Taqman sono state utilizzate per testare un gene Ribonuclease P/MRP Subunit P30 [RPP30] come controllo interno ed il gene virale SARS-CoV-2 Orf1ab (etichettato Vic) ed N (etichettato FAM). RNA purificato è stato sottoposto ad amplificazione PCR secondo i seguenti cicli: 50 °C × 15 minuti, 95 °C × 2 minuti, 45 cicli a 95 °C × 3 secondi, e 60 °C × 30 secondi. Le reazioni PCR sono state eseguite da una macchina robotica Light Cycler 480II (Roche) in un volume finale di 20 µl.

Per prevenire l'infezione da SARS-CoV-2 nella coltura cellulare sono stati testati vari metodi antivirali per la loro abilità di ostacolare la penetrazione del SARS-CoV-2 nelle cellule Vero. Per ogni test, una quota (0.5 ml) dello stesso campione contenente SARS-CoV-2 che è stata utilizzata per il test è stata trattata in una delle seguenti condizioni:

1. Radiazione UV-C 254 nm generata a LED, alla potenza di 0.3 mW/cm² per 15 minuti, corrispondente ad una dose di 270 mJ/cm².
2. Perossido di idrogeno: perossido di idrogeno sterile a livello analitico è stato aggiunto ad una concentrazione finale dell'1% vol/vol ed incubato a temperatura ambiente per 15 minuti.
3. H₂O₂: sono stati aggiunti 0.5 ml alle colture ed incubati a temperatura ambiente per 15 minuti. Questo olio ozonizzato è stato scelto perché aveva il più alto livello di ozonuri

disponibili (>900 ozonuri) ed era l'unico olio ozonizzato capace di penetrare all'interno delle cellule polmonari A549 tra quelli testati

4. HOOws: contiene acqua, lecitina, polisorbato 20 e olio di arachidi ozonizzato. Inoltre, sono stati aggiunti 0.5 ml di HOOws alla coltura ed incubati a temperatura ambiente per 15 minuti.
5. HOO e HOOws combinati (in rapporto 1:1) incubati a temperatura ambiente per 15 minuti.

Dopo vari trattamenti (o non trattamenti), i campioni sono stati trasferiti all'interno di fiale contenenti le cellule Vero, incubati a 37°C per 12 ore e poi processati come precedentemente descritto per il test di prova.

Per questo esperimento, i campioni positivi e negativi erano cellule E6 Vero non trattate e medi non trattati contenenti i campioni orofaringei di COVID-19, rispettivamente. Tutti i test sono stati performati in tre riproduzioni indipendenti.

È stata inoltre valutata la capacità infiammatoria degli olii ozonizzati, I macrofagi degli alveoli polmonari possono essere attivati all'interno dei polmoni dei pazienti infetti innescando l'infiammazione. L'attivazione dei macrofagi può causare delle complicazioni, come ad esempio lo sviluppo di polmonite tromboembolica conseguente al rilascio di fattori protrombotici, in particolare il tromboxane A₂, da quelle cellule quando attivate. Poiché gli olii ozonizzati hanno capacità antinfiammatorie, sono stati testati utilizzando HOO in macrofagi murini immortalati. Queste cellule sono state coltivate per 24 giorni in DMEM 75% v/v e FCS 25% v/v, e poi attivate per mezzo dell'incubazione con 10 ug/m di antigene lipo-polisaccaridico dell'E. coli secondo la procedura. Le cellule sono state quindi esposte agli HOO (2 ore di pretrattamento, 10% v/v) o, come controllo, ad olio di semi di girasole (2 ore di pretrattamento, 10% v/v): L'attivazione dei macrofagi è stata determinata analizzando i cambiamenti morfologici utilizzando un microscopio standard.

Infine, è stata valutata la capacità penetrativa degli olii ozonizzati all'interno delle cellule coltivate. Dato che la replicazione del SARS-CoV-2 avviene intracellularmente, è importante determinare se anche gli HOO siano in grado di raggiungere lo stesso compartimento intracellulare. Questo tema è stato verificato tracciando gli HOO etichettati nelle cellule citoplasmatiche e visualizzato con microscopio a fluorescenza. In questo esperimento, le cellule umane A549 dell'epitelio basale alveolare (ATCC CCL-185) sono state conservate nel medio Dulbecco modificato Eagle/F12 contenente il 10% di siero bovino, penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 mg/ml) e trattate con olio di semi di girasole (come controllo 2 ore 10% v/v) oppure HOO etichettato (2 ore 10% v/v).

5.4 Studio clinico

Sono stati valutati gli effetti degli HOO sulla capacità respiratoria di due soggetti sani prima (T0) e dopo (T1) una settimana di somministrazione orale di HOO (3 capsule 2 volte al giorno). Per determinare i criteri di valutazione della disponibilità di ossigeno sono stati scelti il massimo assorbimento di ossigeno ($VO_2\max$), VO_2 alla soglia anaerobica ($VO_2@AT$), e la percentuale di $VO_2\max$ alla soglia anaerobica ($\%VO_2@AT$). I soggetti erano maschi sani di 56 e 57 anni, con uno stile di vita sedentario, non consumatori di droghe e non fumatori.

I soggetti hanno partecipato ad un esercizio di test cardiopolmonare (CPET) per determinare $VO_2\max$ (l/min e ml/kg/min; valori assoluti e relativi rispettivamente); $VO_2@AT$ (l/min e ml/kg/min); e $\%VO_2@AT$. Come esercizio di riscaldamento per il CPET, gli è stato chiesto di correre 5 minuti su un tapis-roulant a 7 km/h ed 1% di pendenza.

In seguito, viene eseguito un esercizio di fatica correndo a velocità incrementale, partendo da 8 km/h con aumenti di 1 km/h al minuto fino allo sfinimento. Inoltre, i soggetti hanno eseguito il CPET

con un ergo-spirometro calibrato per ottenere i parametri cardiorespiratori durante gli attacchi, dal riscaldamento al termine dell'esercizio. I campioni dei gas espirati sono stati analizzati respiro per respiro. Si è considerato il raggiungimento di VO_2 max nel momento in cui tre di questi quattro criteri erano stati raggiunti: un valore stabile di VO_2 nonostante l'aumento di velocità (cambiamenti nella $VO_2 \leq 150$ ml/min a VO_2 max); rapporto di scambio respiratorio finale (RER) superiore a 1.1; sfinimento evidente; battito cardiaco (HR) al termine dell'esercizio (HRmax) equivalente al valore massimo predetto ($210 - (0.65 \times \text{età})$). Il test della CPET è stato effettuato prima della somministrazione di H₂O₂ (T0) ed una settimana dopo (T1).

6 Risultati

6.1 Studio preclinico

Il rilevamento del gene di riordino tramite qPCR, che è stato utilizzato come controllo interno ed espressione standard, è stato consistente in tutte le colture Vero (non trattata, trattata con tamponi negativi al virus e trattata con campioni positivi al virus). Per i geni virali Orf1 ed N, i controlli negativi al virus non hanno mostrato alcuna amplificazione positiva, mentre invece le colture positive al virus hanno mostrato amplificazioni per entrambi i geni al ventiduesimo ed al ventiquattresimo ciclo (media ventitré) rispettivamente. I dati mostrano un'infezione da SARS-CoV-2 avvenuta nelle cellule Vero.

L'efficacia nel prevenire la penetrazione del virus SARS-CoV-2 all'interno delle cellule Vero del perossido di idrogeno, UV, HOO e HOOws è stata determinata calcolando la soglia di positività alla qPCR quantificando il carico intracellulare dell'RNA virale. Quest'efficacia è stata indicata con il ritardo nelle soglie di amplificazione della positività alla qPCR per entrambi i geni Orf1 ed N in comparazione alle colture positive al virus. Le differenze tra le soglie di rilevamento tra le colture positive al virus e quelle trattate con terapie antivirali sono state: quattro cicli per il perossido di idrogeno; cinque cicli per i raggi UV; otto cicli per HOO; nove cicli per HOOws; e ventitré cicli per HOO+HOOws. Secondo questi dati, la classifica di efficacia nella prevenzione dell'infezione, in ordine crescente, è: perossido di idrogeno, raggi UV, HOO, HOOws, pretrattamento con HOO e HOO+HOOws. Perciò l'utilizzo di HOO+HOOws è stato l'unico protocollo in grado di neutralizzare completamente il COVID-19. La significanza statistica delle differenze tra i cicli di qPCR è stata calcolata rispetto ad entrambi i controlli positivi e negativi. Poiché non è stata osservata alcuna differenza tra i campioni trattati ed i controlli positivi e negativi, l'efficacia dei trattamenti preventivi è completa. Questo risultato è stato raggiunto soltanto con l'utilizzo combinato di HOO ed HOOws.

Invece, tutti i trattamenti preventivi hanno significativamente diminuito il carico virale intracellulare rispetto al controllo positivo. Poiché non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra i risultati ottenuti per i geni Orf1 ed N, l'analisi statistica ha considerato la media di questi risultati per ogni condizione sperimentale.

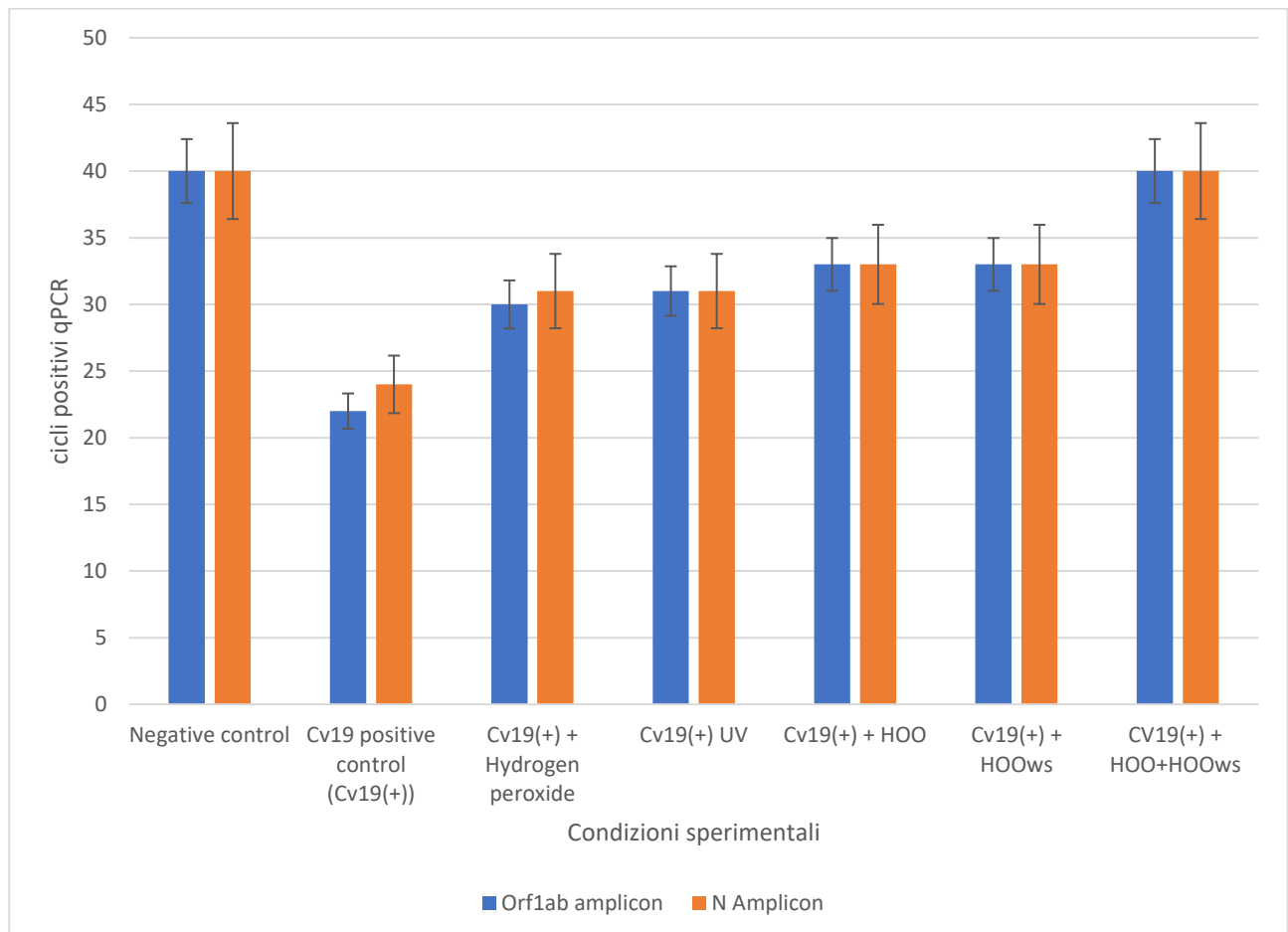


Fig. 1. Numero di cicli di amplificazione positive di qPCR per i due geni virali di SARS-CoV-2(N, Orf1) secondo diversi protocolli di trattamento. Le linee nere orizzontali indicano la soglia di positività; i campioni negativi al quarantesimo ciclo di qPCR erano negativi. L'altezza delle colonne è inversamente correlata alla quantità di SARS-CoV-2 penetrato all'interno delle cellule Vero. Tutti i trattamenti preventive testate hanno significativamente diminuito il carico virale intracellulare. L'unico trattamento in grado di ristabilire i soggetti, nonostante la presenza del SARS-CoV-2 nella coltura cellulare, è stato H₂O₂+H₂O₂s.

Si sono inoltre valutate le capacità antinfiammatorie degli olii ozonizzati. I macrofagi attivati dall'infiammazione nelle colture solitamente hanno una forma prismatica con pseudopodi (figura 2A). Tuttavia, questo non accade a seguito del trattamento dei macrofagi con HOO, nonostante l'elevata presenza (10 ug/ml) degli attivatori Lps. Infatti, i macrofagi trattati hanno mantenuto la loro forma tondeggiante senza l'emissione di pseudopodi (figura 2B).

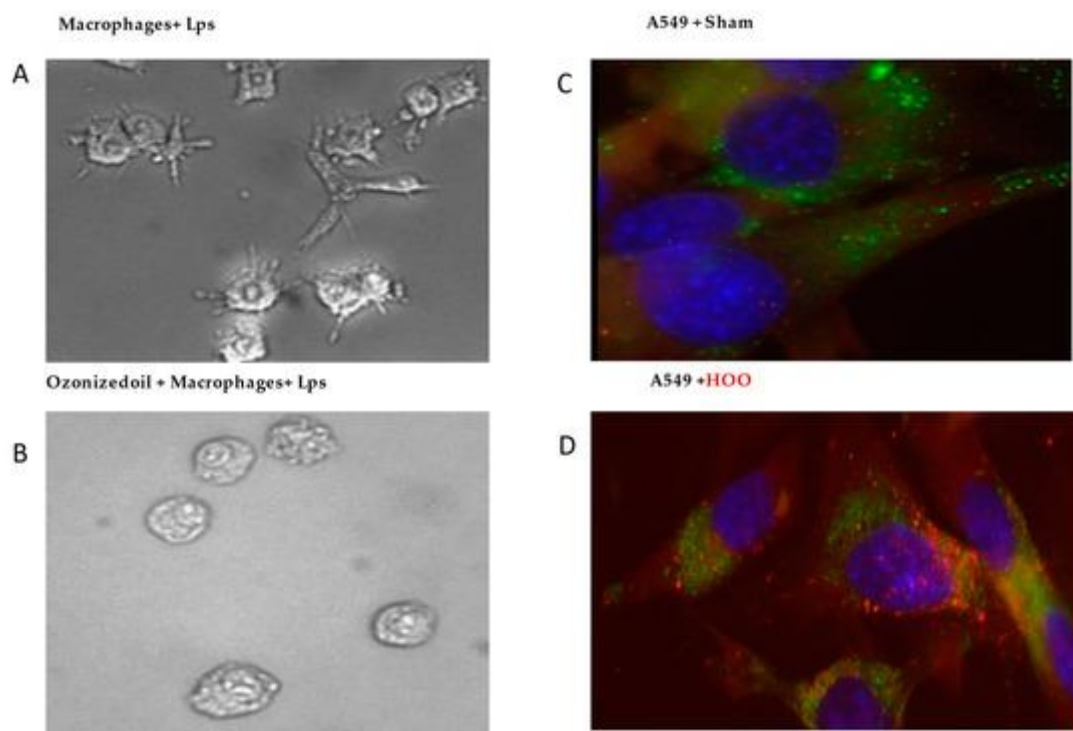


Fig. 2. Parte sinistra. Inibizione dell'attivazione dei macrofagi alveolari polmonari grazie agli HOO. Riquadro (A), I macrofagi sono attivati in presenza delle endotossine batteriche Lps modificando la loro forma ed emettendo pseudopodi. Riquadro (B), l'attivazione dei macrofagi non avviene quando le cellule sono pretrattate con HOO nonostante la presenza di Lps. Parte destra. Consegna intracellulare degli HOO (segnato in rosso) nelle cellule polmonari. Riquadro (C), non avviene nessuna penetrazione nelle cellule polmonari, segnate in blu per il nucleo ed in verde per la loro

membrana citoplasmatica, dell'olio di arachidi segnato in rosso. Riquadro (D), abbondante penetrazione nel citoplasma degli HOO, segnati in rosso, nelle cellule polmonari.

A seguito dell'esposizione delle cellule polmonari al non ozonizzato olio di arachidi, non è stata osservata alcuna penetrazione all'interno delle cellule stesse, come si nota dalla mancanza di zone rosse intracellularmente (figura 2C). Al contrario, un'elevata quantità di droplet rossi è visibile quando le cellule sono state trattate con HOO. I risultati indicano perciò l'elevata efficacia degli HOO nel raggiungimento dei compartimenti intracellulari (Figura 2D).

6.2 Studio clinico

Nei soggetti esaminati, si è valutato l'aumento di disponibilità di ossigeno a seguito dell'assunzione di HOO. I valori di $VO_2\text{max}$ mostrano un aumento (T0: 38 ± 1.98 ; T1: 39.9 ± 1.41 ml/kg/min) dopo una settimana di assunzione di HOO. Analogamente, i valori di VO_2 alla soglia anaerobica ($VO_2@AT$) sono aumentati del 3.4% (T0: 31.55 ± 1.34 ; T1: 34.50 ± 1.56 mL/kg/min). Infine, la percentuale di $VO_2\text{max}$ alla soglia anaerobica ($\%VO_2@AT$) è aumentata del 4%. I dati (medi \pm deviazione standard) sono riportati in tabella 1.

Negli ultimi sei mesi, 52 pazienti oncologici hanno ricevuto un trattamento orale di HOO come supporto integrativo alle loro terapie antitumorali. Durante il trattamento, sono stati monitorate le funzioni epatiche (transaminasi, bilirubina, eccetera) ed altri parametri standard ematochimici, e non sono stati riscontrati valori abnormi. Non è stato riportato od osservato nessun altro effetto collaterale ovvio. L'unico leggero effetto negativo riportato è stato un raro meteorismo durante i primi due giorni di trattamento in 4 pazienti. Il profilo infiammatorio è stato misurato analizzando la proteina C-reattiva e la velocità di sedimentazione dei globuli rossi dopo un'ora. Per la proteina

reattiva C, i valori misurati sono stati a T0 (prima del trattamento con HOO) 0.9 ± 0.5 ed a T1 (dopo il trattamento con HOO) 0.3 ± 0.2 mg/100 ml (valore massimo normale 0.5 mg/100 ml) (T1 vs. T0 $p < 0.01$). Per la velocità di sedimentazione dei globuli rossi dopo un'ora, i valori sono stati a T0 21.8 ± 3.1 ed a T1 12.0 ± 1.4 mm (valore massimo normale value 16 mm) (T1 vs. T0 $p < 0.01$). Questi risultati sono in linea con la stabilità capacità antinfiammatoria attesa dei derivati dell'ozono.

Negli stessi 52 pazienti oncologici, l'efficacia degli HOO nella prevenzione dell'infezione da COVID-19 è stata valutata retrospettivamente. Non è stata rilevata alcuna infezione nei sei mesi di follow-up seguenti (TAB.2). D'altro canto, era attesa un tasso d'infezione del 20%, corrispondente ad almeno 10 casi tra i pazienti oncologici. La frequenza attesa è stata stimata basandosi sul tasso di incidenza di infezioni da COVID-19 in Italia e l'alta sensibilità dei pazienti oncologici all'infezione. Questa differenza (0% rispetto al 20% in 52 soggetti) è statisticamente significativa ($p < 0,01$).

Genere	Età	Malattie pregresse	Infezione da Covid-19	Risultato clinico
Scopo terapeutico				
Femmina	22	Nessuno	Sì	Recupero
Maschio	55	COPD, Ischemia vascolare	Sì	Recupero
Femmina	54	Nessuno	Sì	Recupero
Femmina	52	Nessuno	Sì	Recupero
Scopo chemioprolattico. Pazienti oncologici				
Maschio	47	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19

Maschio	40	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	19	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	11	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	48	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	33	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	40	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	37	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	40	Tumore cerebrale (glioblastoma)	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	50	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	56	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	60	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19

Femmina	69	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	65	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	55	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	52	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	70	Tumore al seno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	57	Tumore al colon	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	61	Tumore al colon	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	53	Tumore al colon	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	57	Tumore al colon	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	78	Tumore renale	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	73	Tumore alla vescica	No	Nessuna infezione da COVID-19

Femmina	82	Linfoma non-Hodgkin	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	54	Linfoma non-Hodgkin	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	81	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	58	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	55	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	27	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	79	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	76	Tumore polmonare	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	74	Tumore alle ovaie	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	75	Tumore alle ovaie	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	66	Tumore alle ovaie	No	Nessuna infezione da COVID-19

Femmina	28	Tumore all'utero	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	62	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	78	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	72	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	58	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	63	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	79	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	60	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	67	Tumore al pancreas	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	71	Tumore alla prostata	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	80	Tumore alla prostata	No	Nessuna infezione da COVID-19

Maschio	83	Tumore alla prostata	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	58	Tumore alla prostata	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	61	Tumore alla prostata	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	92	Tumore della pelle	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	70	Tumore orale	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	89	Tumore della pelle	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	77	Tumore della pelle	No	Nessuna infezione da COVID-19
Scopi chemio-profilattici. Soggetti sani				
Femmina	32	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	12	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	18	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19

Maschio	72	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	45	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	32	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	38	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	45	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	59	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	64	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	49	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	93	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	61	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	52	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19

Maschio	34	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	36	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	48	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	62	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	46	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Femmina	51	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19
Maschio	80	Nessuno	No	Nessuna infezione da COVID-19

Tabella 2. Soggetti sottoposti al trattamento con HOO sia per chemioprolifassi (n=52 pazienti oncologici+ 21 soggetti sani) sia per scopi terapeutici (n=4 pazienti infetti) contro l'infezione da COVID-19.

L'efficacia degli HOO nella prevenzione dell'infezione da COVID-19 è stata valutata in 21 soggetti sani che hanno assunto HOO per 2 mesi come integratore alimentare, ed hanno svolto le loro solite attività giornaliere. A causa dell'incidenza dell'infezione da COVID-19 in Italia durante il periodo monitorato (15% di prevalenza ogni 100 test diagnostici), si prevedeva un minimo di 3 infezioni nella

finestra temporale dello studio in oggetto. Tuttavia, nessuno dei soggetti sottoposti al test si è infettato, come dimostrato dalla mancanza di qualsiasi sintomo (febbre, anosmia, ageusia, tosse, eccetera) e dai test antigenici e molecolare negativi per l'infezione da COVID-19. Questa differenza (0% rispetto al 15% in 21 soggetti) è statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tra gli stessi 21 soggetti sani, si è potuta osservare una forte evidenza dell'efficacia antivirale in un paziente fragile femmina novantatreenne. Era residente in una casa di cura dove è avvenuto il contagio. Tra gli altri residenti della casa di cura, una persona della stessa stanza è deceduta ed altre 3 hanno affrontato gravi polmoniti e complicazioni. Nonostante l'estensiva esposizione all'infezione da COVID-19 di questo paziente fragile non è stato riscontrato alcun sintomo, ed anche i test molecolari PCR settimanali erano negativi.

Infine, l'efficacia terapeutica degli HOO contro il SARS-CoV-2 è stata valutata in 4 pazienti ai quali era stata diagnosticata l'infezione sia per sintomi clinici che con test molecolari.

Il primo paziente era una femmina di 22 anni contagiata il 15 agosto 2020. I suoi sintomi clinici includevano febbre a 39°C, grave tosse, dolore toracico quando tossiva, anosmia e ageusia. I tamponi faringei hanno confermato la diagnosi con un'alta carica virale. Le sono state somministrate oralmente 4 compresse di HOO due volte al giorno. Dopo 5 giorni di trattamento, tutti i sintomi del ricovero sono scomparsi. Inoltre, l'RX al torace ha confermato l'assenza di complicanze polmonari. Il recupero tempestivo del senso del gusto e dell'olfatto è stato inaspettato, solitamente questi sintomi persistono per mesi dopo il recupero. Il secondo tampone faringeo è stato fatto 14 giorni dopo l'inizio del trattamento con HOO ed era negativo.

Il secondo paziente era un maschio fragile di 55 anni con complicanze correlate alla BPCO, obesità, malattie cardiovascolari gravi. È stato infettato ed ha sviluppato polmonite acuta, tosse, febbre a 38,7°C, e diminuzione della saturazione di O₂ all'84%. Dopo 4 giorni di trattamento con HOO, la

fatica e la febbre del paziente sono sparite ed ha recuperato il senso del gusto e dell'olfatto. Inoltre la saturazione di O₂ è tornata al 98%. I test per SARS-CoV-2 sono stati effettuati 7 e 14 giorni dopo l'inizio del trattamento con HOO ed erano entrambi negativi.

Il terzo paziente era una femmina di 54 anni, moglie del secondo paziente, pesantemente esposto al virus. Il trattamento con HOO è iniziato due giorni dopo la diagnosi di positività del marito. Anche se non aveva sintomi clinici evidenti in quel momento, RX toracici erano suggestivi di un'infezione polmonare, presumibilmente correlata al COVID-19. Dopo il trattamento con HOO il test molecolare era negativo e non è apparso alcun sintomo. Perciò la sua infezione da COVID-19 è stata probabilmente prevenuta.

Il quarto paziente era una femmina di 52 anni, impiegata nella casa di cura menzionata precedentemente, dove viveva la femmina novantatreenne e dove è avvenuto il focolaio. Aveva moderati sintomi dell'infezione che sono stati confermati da un test qPCR molecolare positivo. Il trattamento con HOO è stato iniziato immediatamente e dopo 5 giorni i sintomi sono scomparsi. Il test molecolare è stato effettuato nuovamente 10 giorni dopo l'inizio del trattamento con HOO ed è risultato negativo.

In sintesi, un totale di 77 soggetti ha ricevuto la somministrazione di HOO per chemioprolissi in soggetti non infetti (n=73, 52 pazienti oncologici e 21 soggetti sani) o per scopi terapeutici in pazienti infetti (n=4). I risultati mostrano che non c'è stata alcuna infezione da COVID-19 nei soggetti non infetti preventivamente trattati con HOO, ed un completo recupero con test molecolare negativo nei 4 pazienti infetti. I risultati sono schematizzati in Tabella 2.

7 Conclusioni

Con l'aggravarsi della pandemia di COVID-19, si stanno sviluppando una gran varietà di protocolli di intervento e prevenzione efficaci ed è urgente combattere la malattia. Il presente studio che ha utilizzato cellule colturali, pazienti oncologici, soggetti sani ed infetti, indica che gli olii ozonizzati possono essere utilizzati come nuova chemioprolifassi e terapia per combattere il SARS-CoV-2. Sono necessari studi controllati e trials clinici per supportare queste scoperte.

Per l'investigazione, è stato sviluppato un test diagnostico per il virus ed ha dimostrato di essere sensibile e specifico nell'individuazione dell'abilità del virus di infettare le cellule sensibili (ACE2). Quando utilizzata a scopo preventive, la combinazione di HOO e HOOws è stata più efficace dei comuni trattamenti antivirali. Il trattamento è stato così efficace che ha neutralizzato completamente l'infettività del SARS-CoV-2 poiché non è stato rilevato alcun virus all'interno delle cellule nonostante un'alta esposizione ad esso. Queste scoperte sono state ottenute nelle cellule polmonari, cioè l'obiettivo del virus COVID-19. Tuttavia, ciò può essere dimostrato anche con altri tipi di cellule per corroborare i risultati.

L'HOO è un vettore di ozono a base olio. Quando viene somministrato per via orale, viene coniugato con la lipoproteina nel fegato e poi distribuito tramite l'apparato cardiocircolatorio, avendo come primo obiettivo i polmoni. Tuttavia, l'infezione da COVID-19 avviene principalmente nell'epitelio respiratorio superiore. Infatti, il primo tessuto che viene infettato dal SARS-CoV-2 è la mucosa nasale. Per cercare di raggiungere direttamente questi tessuti di ingresso, è stata creata una nuova preparazione idrofila di HOO ed è stata chiamata olio ozonizzato ad alti ozonuri idrosolubile, HOOws. Nello specifico, questa preparazione consente di raggiungere i tessuti con aerosol e spray nasali.

Nonostante l'esiguo campione, i dati esposti forniscono una nuova valida prova che indica che la combinazione di HOO ed HOOws sono altamente efficaci nella prevenzione del COVID-19. Il meccanismo di prevenzione è mediato neutralizzando il virus in ambienti sia intracellulari che extracellulari, inibendo la replicazione virale intracellulare e bloccando la diffusione dei virioni extracellularmente, senza effetti collaterali evidenti.

L'efficacia osservata degli HOO è dovuta molto probabilmente alla morfologia, struttura e composizione unica del SARS-CoV-2. La sensibilità virale alla disinfezione con raggi UV è controversa in quanto i virus a RNA non contengono timina, che è il primo obiettivo dei raggi UV-C, ma uracile. Infatti, la genotossicità dei raggi UV-C è esercitata formando dimeri di ciclobutano T-T. Tuttavia, il SARS-CoV-2 è sensibile alle radiazioni comprese tra i 222 nm e 254 nm.

Bisogna notare che, oltre ad essere genotossica, la luce UV è anche un agente ossidante. I coronavirus umani sono sensibili alla disinfezione con perossido di idrogeno allo stesso livello della glutaraldeide. Una spiegazione della debolezza del SARS-CoV-2 agli agenti ossidanti è la mancanza di difese contro di essi. Un'altra è la presenza di strutture chimiche molto sensibili all'ossidazione nella parte terminale della proteina spike che si lega ai recettori ACE2. La parte terminale della proteina spike è costellata di amminoacidi ricchi di tiolo, come la cisteina, i quali siti solfidrili (-SH) sono molto sensibili all'ossidazione. Queste strutture della proteina spike virale possono essere neutralizzate da agenti ossidanti, come gli HOO. Questa neutralizzazione ostacolerebbe il legame virale con l'ACE2 e di conseguenza bloccando la penetrazione virale (figura 3 A).

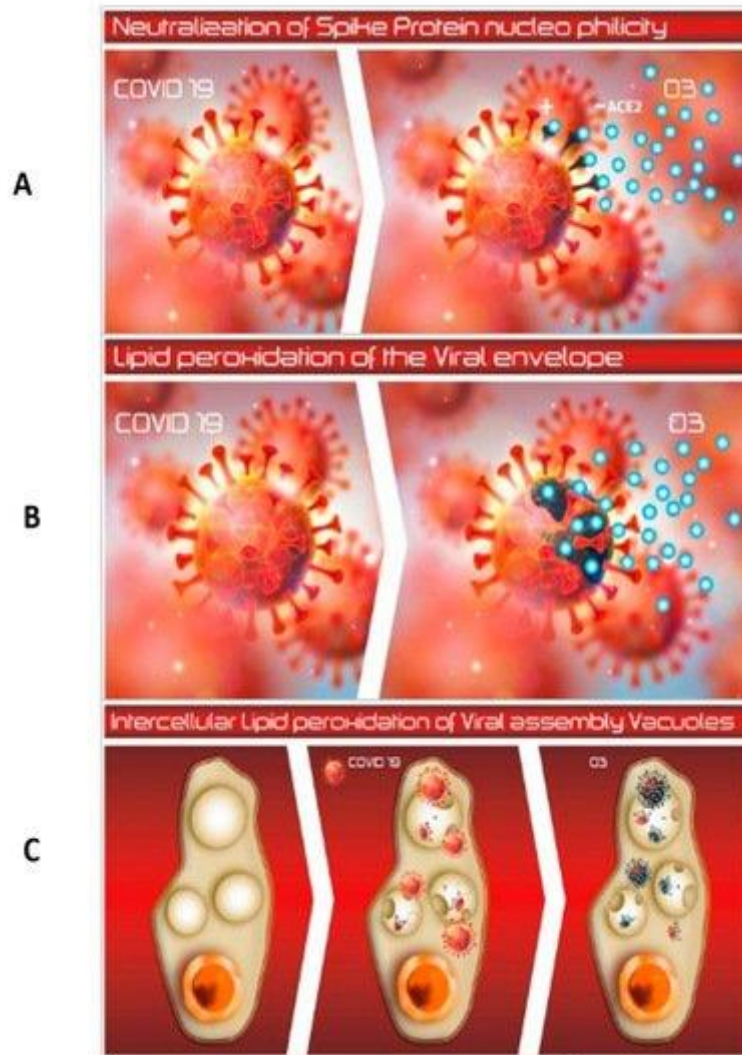


Figura 3. (A–C). Possibili meccanismi di sensibilità del SARS-CoV-2 19 agli HOO. Riquadro (A) Neutralizzazione delle proteine spike; l’ossidazione con HOO blocca il sito dove la proteina spike si lega ai recettori ACE2; questa situazione è evidenziata dallo scurirsi della proteina spike quando trattata con HOO (cerchi azzurri). Riquadro (B) Perossidazione del rivestimento lipidico virale; poiché si ha una bassa densità della proteina spike, ed una grande sezione del rivestimento lipidico del SARS-Cov-2 esposte all’interazione con gli HOO; si ha come risultato la perossidazione del rivestimento lipidico, come si può notare dallo scurirsi di questa struttura nel momento in cui interagisce con gli HOO (cerchi azzurri). Riquadro (C) gli HOO hanno l’abilità unica di penetrare all’interno delle cellule citoplasmatiche dove avviene il ciclo di replicazione virale all’oscuro dei

disinfettanti extracellulari; gli HOO sono capaci di neutralizzare i componenti virali ossidandoli all'interno dell'ambiente intracellulare (annerimento dei frammenti virali intracellulari quando interagiscono con i cerchi azzurri di HOO). Da sinistra a destra: cellula normale, cellula infetta da SARS-Cov-2, e cellula infetta da SARS-Cov-2 trattata con HOO.

Nelle condizioni dello studio, il perossido di idrogeno non è stato particolarmente efficace nel neutralizzare il SARS-CoV-2. La situazione è imputabile alle peculiari caratteristiche del virus ed alla sua elevata lipofilità, che lo rende un obiettivo difficile per gli ossidanti idrofili come il perossido di idrogeno. Infatti, il rapporto tra il contenuto proteico (proteina spike) ed il contenuto lipidico (rivestimento lipidico) è estremamente basso nel SARS-CoV-2 rispetto ad altri virus ad RNA. Inoltre, la proteina spike del SARS-CoV-2 è altamente flessibile e può piegarsi e spostarsi esponendo all'esterno una vasta sezione del rivestimento lipidico. Questa struttura spiega l'elevata lipofilità del SARS-CoV-2, che infatti interagisce prima e più rapidamente con nervi, neuroni e sistema nervoso centrale che sono tipicamente molto lipofili. Il rapido neurotropismo del SARS-CoV-2 causa i sintomi come anosmia ed ageusia relativi alla sua penetrazione all'interno del nervo olfattivo e della barriera emato-encefalica.

Poiché il SARS-CoV-2 espone una grande porzione del suo rivestimento lipidico all'esterno, senza uno schermo generato da un denso strato di proteine spike, esso diventa altamente sensibile ad i disinfettanti contenenti etanolo. Infatti, l'etanolo che solitamente fissa ma non uccide i virus grazie alla sua capacità lipido-solvente è il più efficace disinfettante contro il SARS-CoV-2.

La struttura unica del SARS-CoV-2, come precedentemente descritta, indica la sua alta sensibilità ai disinfettanti ossidanti che sono anch'essi lipofili. Questa situazione è chiaramente dimostrata dal presente utilizzo di HOO e HOOws. La loro efficacia è probabilmente dovuta al seguente

meccanismo: i loro componenti lipidici (acidi grassi saturi) raggiungono facilmente il rivestimento lipidico non protetto del virus. Quando l'obiettivo viene raggiunto, sia gli HOO che gli HOOws rilasciano ozono e specie di ossigeno reattivo che inducono la perossidazione lipidica nel virus. Questo meccanismo distrugge il rivestimento lipidico e neutralizza il virus, eliminando l'infettività e le conseguenze dell'infezione (figura 3 B).

Un'altra possibile spiegazione dell'efficacia anti SARS-CoV-2 degli HOO è la loro abilità di interferire con la formazione e la dinamica dei vacuoli lipidici che proteggono il virus durante la produzione intracellulare e l'assemblaggio di interi virioni. Come dimostrato nei nostri studi in vitro sopra riportati, gli HOO hanno una capacità unica di penetrare all'interno del citoplasma cellulare dove avviene il ciclo di replicazione virale nascosto dai disinfettanti extracellulari. Pertanto, gli HOO sono in grado di neutralizzare l'assemblaggio virale intracellulare ossidando i componenti virali all'interno dell'ambiente intracellulare. Questo meccanismo di azione è riassunto nella Figura 3C.

Questo meccanismo spiega anche gli effetti sinergici tra HOO e HOOws: con HOO che è lipofilo e prende di mira SARS-CoV-2 sia nei compartimenti extra che intracellulari; con HOOws che è idrofilo e prende di mira il virus SARS-CoV-2 nel compartimento extracellulare. In effetti, la somministrazione combinata di HOO e HOOws si è rivelata altamente efficace nel prevenire e attenuare l'infezione da COVID-19 nei 77 individui normali e nei pazienti senza effetti avversi o collaterali. È importante sottolineare che il nostro gruppo di soggetti è composto da molti individui ad alto rischio: quattro pazienti infetti da COVID, 52 malati di cancro suscettibili all'infezione e anziani in un ambiente infettivo.

Un'osservazione molto rilevante è la scomparsa dei sintomi in soli 5 giorni dopo il trattamento con HOO e dei risultati qPCR negativi dopo 7-10 giorni tra i quattro pazienti con infezione da COVID. Il

rapido recupero è stato incoraggiante ma inaspettato perché i pazienti con COVID-19 di solito mostrano risultati qPCR positivi fino a 60 giorni dopo il recupero. D'altra parte, la scomparsa precoce dei sintomi clinici era probabilmente dovuta agli effetti antinfiammatori e inibitori dei macrofagi di HOO, il che spiega anche la mancanza di complicanze tromboemboliche tra i nostri pazienti. Inoltre, la capacità di HOO di aumentare la disponibilità di ossigeno nei polmoni contrasterebbe il danno polmonare da COVID-19, come dimostrato nel paziente fragile. Un tale aumento dell'apporto di ossigeno sarebbe anche di grande beneficio per i pazienti COVID-19 che sono anche affetti da polmonite grave. Infatti, l'infezione da COVID-19 causa una polmonite interstiziale che ostacola l'assorbimento di ossigeno da parte dell'endotelio alveolare nonostante la somministrazione di ossigeno attraverso il sistema respiratorio, come avviene a scopo terapeutico. Di conseguenza, la possibilità di aumentare direttamente la disponibilità di ossigeno come eseguita da HOO è rilevante per migliorare la prognosi dei pazienti COVID-19. Il limite del nostro studio è che l'analisi della disponibilità di ossigeno e della soglia aerobica è stata eseguita in soggetti sani e non in pazienti COVID-19. Sfortunatamente, i pazienti COVID-19 non possono sottoporsi all'attività di resistenza fisica richiesta per eseguire l'analisi della soglia aerobica. Tuttavia, i risultati ottenuti nei pazienti COVID-19 indicano che la saturazione di ossigeno nel sangue è notevolmente aumentata dopo il trattamento con HOO. A nostra conoscenza, questo è il primo studio a sviluppare un vettore innovativo per l'ozono che rilascerebbe ozono a livello intracellulare e a valutarne le attività antivirali clinicamente rilevanti e l'efficacia.

Il nostro studio ha tuttavia dei limiti. I risultati non sono convalidati da uno studio clinico in doppio cieco ma solo da studio osservazionale. In questo studio gli sforzi si sono concentrati sulla dimostrazione dei meccanismi che spiegano l'efficacia antivirale degli oli ozonizzati contro il COVID-19. Sono necessari ulteriori studi clinici da altri centri clinici per convalidare i risultati clinici qui presentati. Per dimostrare o negare l'efficacia clinica dell'approccio proposto in un numero

adeguato di pazienti è necessaria la creazione di uno studio clinico randomizzato in doppio cieco, come eseguito nel reparto ospedaliero che assiste i pazienti COVID-19.

Il nostro nuovo ed efficace protocollo di trattamento con HOO e HOOws contro il COVID-19 è altamente incoraggiante. A causa del loro stato naturalmente non tossico, HOO e HOOws possono essere utilizzati come trattamento chemio-profilattico contro l'infezione da COVID-19 in diversi ambienti infettivi: condizioni professionali (medici, infermieri) o familiari (parenti o conviventi). Inoltre, per i pazienti infetti, gli HOO e HOOws possono essere utilizzati come trattamento terapeutico complementare per l'infezione da COVID-19, senza la necessità di alcuna modifica dei protocolli terapeutici standard stabiliti. Questo trattamento gratuito è potenzialmente utile per ridurre la gravità delle malattie, riducendo così il numero di pazienti che richiedono terapie ad alta intensità e per un recupero più rapido e diminuire il tempo trascorso negli ospedali. Pertanto, i medici possono adottare l'uso del nostro protocollo per la prevenzione e l'intervento dell'infezione da COVID. Saranno istituiti studi clinici controllati randomizzati per determinare in modo definitivo l'efficacia di questo trattamento nella prevenzione dell'infezione da SARS-Cov-2 e delle complicanze del COVID-19. Con la raccolta di ulteriori risultati clinici, l'efficacia del trattamento HOO/HOOws sarà compresa meglio e verrà utilizzato un protocollo migliorato contro la pandemia.

8. Bibliografia

1. Ahmad A. T. N., Kisa F., Taj M., Urooj F., Indrakant K. S., Archana S., Shaikh M. A., Gururao H., Gulam M. H., and Md. Imtaiyaz H. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*; 1866(10): 165878.
2. Andersen K., Rambaut A., Lipkin W., Holmes E. and Garry R. The proximal origin of SARS-CoV-2
Published online: 17 March 2020 <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Bedell, A. Buchaklian, S. Perlman Efficacy of an automated multi-emitter whole room UV-C disinfection system against Coronaviruses MHV and MERS-CoV. *Infect Control Hosp Epidemiol.* (2016) 37(5): 598–599.
3. Bianco A., Biasin M., Pareschi G., Cavalieri A., Cavatorta C., Fenizia C., Galli P., Lessio L., Lualdi M., Redaelli E., Saulle I., Trabattoni D., Zanutta A., Clerici M.; UV-C irradiation is highly effective in inactivating and inhibiting SARS-CoV-2 replication
4. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, Bullock TA, McGary HM, Khan JA, Razmpour R, Hale JF, Galie PA, Potula R, Andrews AM, Ramirez SH. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2020 Oct 11;146:105131. doi:10.1016/j.nbd.2020.105131. Epub ahead of print. PMID: 33053430; PMCID: PMC7547916.
5. Caldas LA, Carneiro FA, Hiha Im, Monteiro FL, da Silva GP, da Costa LJ, Durigon EL, Tanuri A, de Souza W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci. Reports*, 10(1): 16099 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73162-5>
6. Campione E., Cosio T., Rosa L., Lanna C., Di Girolamo S., Gaziano R., Valenti P. Bianchi L., Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation
7. Cao Y, Chen J, Ren G, Zhang Y, Tan X, Yang L. Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients.* 2019;11(11):2794. Published 2019 Nov 15. doi:10.3390/nu11112794

8. Cattell F, Giordano S, Bertiondo C, Lupia T, Corcione S, Scaldaferrì M, Angelone L, De Rosa FG. Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. *Virus Res.* 2020 Oct 25;291:198207. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198207. Epub ahead of print. PMID: 33115670; PMCID: PMC7585733.
9. Cento V, Colagrossi L, Nava A, Lamberti A, Senatore S, Travi G, Rossotti R, Vecchi M, Casati O, Matarazzo E, Bielli A, Casalicchio G, Antonietto M, Renica S, Costabile V, Scaglione F, Fumagalli R, Ughi N, Epis O, Puoti M, Vismara C, Faccini M, Fanti D, Alteri C, Perno CF. Persistent positivity and fluctuations of SARS-CoV2-RNA in clinically recovered Covid-19 patients. *J. Infection*, 81: 90-92 (2020).
10. Chaolin H., Yeming W., Xingwang L., Lili R., Jianping Z., Yi H., Li Z., Guohui F., Jiuyang X., Xiaoying G., Zhenshun C., Ting Y., Jiaan X., Yuan W., Wenjuan W., Xuelei X., Wen Y., Hui X., Min L., Yan X., Hong G., Li G., Jungang X., Guangfa W., Rongmeng J., Zhancheng G., Qi J., Jianwei W., Bin C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China
11. Cevik M., Kuppalli K., Kindrachuk J. and Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*; 371: m3862.
12. Comunian S., Dongo D., Milani C, and Palestrini P. Air Pollution and COVID-19: The Role of Particulate Matter in the Spread and Increase of COVID-19's Morbidity and Mortality
13. Fernández-Cuadros ME, Albaladejo-Florín MJ, Peña-Lora D, Álava-Rabasa S, Pérez-Moro OS. Ozone (O₃) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to COVID-19 Evolutionary Stage. *SN Compr Clin Med.* 2020 Jul 7:1-9. doi:10.1007/s42399-020-00328-7. Epub ahead of print. PMID: 32838159.
14. Fernández-Cuadros ME, Albaladejo-Florín MJ, Peña-Lora D, Álava-Rabasa S, Pérez-Moro OS. Ozone (O₃) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to COVID-19 Evolutionary Stage. *SN Compr Clin Med.* 2020 Jul 7:1-9. doi:10.1007/s42399-020-00328-7. Epub ahead of print. PMID: 32838159; PMCID: PMC7340747.
15. Gruppo di Lavoro ISS Biocidi COVID-19 Raccomandazioni *ad interim* sulla sanificazione di strutture non sanitarie nell'attuale emergenza COVID-19: superfici, ambienti interni e abbigliamento
16. Iadecola C, Anrather J, Kamel H. Effects of COVID-19 on the Nervous System. *Cell.* 2020 Oct 1;183(1):16-27.e1. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.028. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32882182; PMCID: PMC7437501.
17. ISTAT impatto dell'epidemia COVID-19 sulla mortalità totale della popolazione residente anno 2020

18. Izzotti A., Fracchia E., Au W., Pfeffer U., Colombo M., Emionite L., Pavan S., Miotto D, Lova P., Grasselli E., Faelli E., Tiso M., Pulliero A. Novel use of ozonized oils as chemo-prophylaxis and therapy against COVID-19 infection
19. Jensen MM. Inactivation of air-borne viruses by ultraviolet irradiation. *Appl Microbiol.* 1964;12:418–420
20. Ji W, Wang W, Zhao X, Zai J, Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol.* 2020;92: 433–440. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>
21. Jiang HJ, Chen N, Shen ZQ, Yin J, Qiu ZG, Miao J, Yang ZW, Shi DY, Wang HR, Wang XW, Li JW, Yang D, Jin M. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomed Environ Sci.* 2019 May;32(5):324-333. doi:10.3967/bes2019.044. PMID: 31217049.
22. Kam YW, Okumura Y, Kido H, Ng LF, Bruzzone R, Altmeyer R. Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PLoS One.* 2009;4(11):e7870. Published 2009 Nov 17. doi:10.1371/journal.pone.0007870
23. G. Kampf, D. Todt, S. Pfaender, E. Steinmann. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection* 104 (2020)246e251
24. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, Nakane T, Zivanov J, Neufeldt CJ, Cerikan B, Lu JM, Peukes J, Xiong X, Kräusslich HG, Scheres SHW, Bartenschlager R, Briggs JAG. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature.* 2020 Aug 17. doi: 10.1038/s41586-020-2665-2. Epub ahead of print. PMID: 32805734.
25. Kell D., Heyden E. and Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria
26. Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Neyts J, Van Ranst M. Growth kinetics of SARS-coronavirus in Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(3):1147-1151. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.085
27. Luo G (George), Gao S-J. Global health concerns stirred by emerging viral infections. *J Med Virol.* 2020;92:399–400. <https://doi.org/10.1002/jmv.25683>
28. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020 Jun 1;77(6):683-690. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1127. PMID: 32275288; PMCID: PMC7149362.
29. Martínez-Sánchez G, Schwartz A, Donna VD. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(5):389.

30. Martínez-Sánchez G, Schwartz A, Donna VD. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020 May 6;9(5):389. doi:10.3390/antiox9050389. PMID: 32384798; PMCID: PMC7278582.
31. McDevitt et al., Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light Applied and Environmental Microbiology Feb 2012, 78 (6) 1666-1669; DOI: 10.1128/AEM.06960-1
32. Nicastro F., Sironi G., Antonello E., Bianco A., Biasin M., Brucato J. R., Ermolli M., Pareschi G., Salvati M., Tozzi P., Trabattoni D., Clerici M.; Modulation of COVID-19 Epidemiology by UV-B and – A Photons from the Sun
33. Oh WK. COVID-19 infection in cancer patients: early observations and unanswered questions. *Ann Oncol*. 2020 Jul;31(7):838-839. doi: 10.1016/j.annonc.2020.03.297. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32243894; PMCID: PMC7270512.
34. Pandemic Influenza Risk Management: A WHO guide to inform and harmonize national and international pandemic preparedness and response. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
35. Setti L., Passarini F., De Gennaro G, Barbieri P., Licen S., Perrone M.G., Piazzalunga A., Borelli M., Palmisani J., Di Gilio A., Rizzo E., Colao A., Piscitelli P., Miani A. Potential role of particulate matter in the spreading of COVID-19 in Northern Italy: first observational study based on initial epidemic diffusion
36. Petre C., Stefanescu S., Smith L., The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality
37. Ranaldi GT, Villani ER, Franza L. Rationale for ozone-therapy as an adjuvant therapy in COVID-19: a narrative review. *Med Gas Res*. 2020 Jul-Sep;10(3):134-138. doi:10.4103/2045-9912.289462. PMID: 33004712.
38. Shang J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221-224 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
39. Shi Dan Yang, Wang Hua Ran, Wang Xin Wei, Li Jun Wen, Yang Dong, And Jin Min. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomed Environ Sci*, 2019; 32(5): 324-333

- 40.Schuit M., Ratnesar-Shumate S., Yolitz J., Williams G., Weaver W., Green B., Miller D., Krause M., Beck K., Wood S., Holland B., Bohannon J., Freeburger D., Hooper I., Biryukov J., Altamura L.A., Wahl V., Hevey M., and Dabisch P. Airborne SARS-CoV-2 Is Rapidly Inactivated by Simulated Sunlight
- 41.Torrey J, von Gunten U, Kohn T. Differences in Viral Disinfection Mechanisms as Revealed by Quantitative Transfection of Echovirus 11 Genomes. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Jul 1;85(14):e00961-19. doi: 10.1128/AEM.00961-19. PMID: 31076437; PMCID:PMC6606871.
- 42.Tartari APS, Moreira FF, Pereira MCDS, Carraro E, Cidral-Filho FJ, Salgado AI, Kerppers II. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* 2020 Jun;43(3):985-993. doi: 10.1007/s10753-020-01184-2. PMID:32382842.
- 43.Turunova B, Sikora M, Schurman C, Hagen WJ, Welsch S, Blanc FEC, von Bülow S, Gecht M, Bagola K, Hörner C, van Zandbergen G, Mosalaganti S, Schwarz A, Mühlebach RCM, Hummer G, Locker JK, Beck M. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science* doi: 10.1126/science.abd5223. Epub ahead of print.
- 44.Ufficio federale della sanità pubblica UFSP Categorie di persone particolarmente a rischio
- 45.Ugazio E., Tullio V., Binello A., Tagliapietra S. and Dosio F. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their characterization, Current Applications, and Advances in improved Delivery Techniques
- 46.Valdenassi L, Franzini M, Ricevuti G, Rinaldi L, Galoforo AC, Tirelli U. Potential mechanisms by which the oxygen-ozone (O₂-O₃) therapy could contribute to the treatment against the coronavirus COVID-19. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*2020 Apr;24(8):4059-4061. doi: 10.26355/eurrev_202004_20976. PMID: 32374009.
- 47.Walls AC et al. Structure, function and antigenicity of the SARS-CoV-2- Spike glycoprotein. *Cell* 181, 281-292 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- 48.Weiss et al. Disrupting the Transmission of Influenza A: Face Masks and Ultraviolet Light as Control Measures. *American Journal of Public Health | Supplement 1, 2007, Vol 97, No. S1*
- 49.Williams JG, Maier RV. Ketoconazole inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in acute lung injury (adult respiratory distress syndrome). *Surgery.* 1992 Aug;112(2):270-7. PMID: 1322565.
- 50.Wrapp D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>

51. Xintian X., Ping C., Jingfang W., Jiannan F., Hui Z., Xuan L., Wu Z. & Pei H. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission
52. Yuan H., Chan Y., Xin-feng X., Wei X. and Shu-wen L. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* volume 41, pages 1141–1149.
53. Zheng Z, Dong M, Hu K. A preliminary evaluation on the efficacy of ozone therapy in the treatment of COVID-19. *J Med Virol.* 2020 May 21;10.1002/jmv.26040. doi: 10.1002/jmv.26040. Epub ahead of print. PMID: 32437014; PMCID: PMC7280732.
54. Butler-Laporte G, Nakanishi T, Mooser V, Morrison DR, Abdullah T, Adeleye O, et al. (2021) Vitamin D and COVID-19 susceptibility and severity in the COVID-19 Host Genetics Initiative: A Mendelian randomization study. *PLoS Med* 18(6): e1003605. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003605>
55. Jovic T., Ali S., Ibrahim N., Jessop Z., Tarassoli S., Dobbs T., Holford P., Thornton C. and Whitaker I. Could Vitamins Help in the Fight Against COVID-19? Received: 3 August 2020; Accepted: 20 August 2020; Published: 23 August 2020
1. Ahmad A. T. N., Kisa F., Taj M., Urooj F., Indrakant K. S., Archana S., Shaikh M. A., Gururao H., Gulam M. H., and Md. Imtaiyaz H. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866(10): 165878.
2. Andersen K., Rambaut A., Lipkin W., Holmes E. and Garry R. The proximal origin of SARS-CoV-2 Published online: 17 March 2020 <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Bedell, A. Buchaklian, S. Perlman Efficacy of an automated multi-emitter whole room UV-C disinfection system against Coronaviruses MHV and MERS-CoV. *Infect Control Hosp Epidemiol.* (2016) 37(5): 598–599.
3. Bianco A., Biasin M., Pareschi G., Cavalieri A., Cavatorta C., Fenizia C., Galli P., Lessio L., Lualdi M., Redaelli E., Saulle I., Trabattoni D., Zanutta A., Clerici M.; UV-C irradiation is highly effective in inactivating and inhibiting SARS-CoV-2 replication
4. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, Bullock TA, McGary HM, Khan JA, Razmpour R, Hale JF, Galie PA, Potula R, Andrews AM, Ramirez SH. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function

in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2020 Oct 11;146:105131. doi:10.1016/j.nbd.2020.105131. Epub ahead of print. PMID: 33053430; PMCID: PMC7547916.

5.Caldas LA, Carneiro FA, Hiha Im, Monteiro FL, da Silva GP, da Costa LJ, Durigon EL, Tanuri A, de Souza W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci. Reports*, 10(1): 16099 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73162-5>

6.Campione E., Cosio T., Rosa L., Lanna C., Di Girolamo S., Gaziano R., Valenti P. Bianchi L., Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation

7.Cao Y, Chen J, Ren G, Zhang Y, Tan X, Yang L. Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients*. 2019;11(11):2794. Published 2019 Nov 15. doi:10.3390/nu11112794

8.Cattel F, Giordano S, Bertiond C, Lupia T, Corcione S, Scaldaferrri M, Angelone L, De Rosa FG. Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. *Virus Res.* 2020 Oct 25;291:198207. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198207. Epub ahead of print. PMID: 33115670; PMCID:PMC7585733.

9.Cento V, Colagrossi L, Nava A, Lamberti A, Senatore S, Travi G, Rossotti R, Vecchi M, Casati O, Matarazzo E, Bielli A, Casalicchio G, Antoniello M, Renica S, Costabile V, Scaglione F, Fumagalli R, Ughi N, Epis O, Puoti M, Vismara C, Faccini M, Fanti D, Alteri C, Perno CF. Persistent positivity and fluctuations of SARS-CoV2-RNA in clinically recovered Covid-19 patients. *J. Infection*, 81: 90-92 (2020).

10.Chaolin H., Yeming W., Xingwang L., Lili R., Jianping Z., Yi H., Li Z., Guohui F., Jiuyang X., Xiaoying G., Zhenshun C., Ting Y., Jiaan X., Yuan W., Wenjuan W., Xuelei X., Wen Y., Hui X., Min L., Yan X., Hong G., Li G., Jungang X., Guangfa W., Rongmeng J., Zhancheng G., Qi J., Jianwei W., Bin C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China

11.Cevik M., Kuppalli K., Kindrachuk J. and Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*; 371: m3862.

12.Comunian S., Dongo D., Milani C, and Palestrini P. Air Pollution and COVID-19: The Role of Particulate Matter in the Spread and Increase of COVID-19's Morbidity and Mortality

13.Fernández-Cuadros ME, Albaladejo-Florín MJ, Peña-Lora D, Álava-Rabasa S, Pérez-Moro OS. Ozone (O₃) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to

- COVID-19 Evolutionary Stage. *SN Compr Clin Med*. 2020 Jul 7:1-9. doi:10.1007/s42399-020-00328-7. Epub ahead of print. PMID: 32838159.
14. Fernández-Cuadros ME, Albaladejo-Florín MJ, Peña-Lora D, Álava-Rabasa S, Pérez-Moro OS. Ozone (O₃) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to COVID-19 Evolutionary Stage. *SN Compr Clin Med*. 2020 Jul 7:1-9. doi:10.1007/s42399-020-00328-7. Epub ahead of print. PMID: 32838159; PMCID: PMC7340747.
15. Gruppo di Lavoro ISS Biocidi COVID-19 Raccomandazioni *ad interim* sulla sanificazione di strutture non sanitarie nell'attuale emergenza COVID-19: superfici, ambienti interni e abbigliamento
16. Iadecola C, Anrather J, Kamel H. Effects of COVID-19 on the Nervous System. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):16-27.e1. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.028. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32882182; PMCID: PMC7437501.
17. ISTAT impatto dell'epidemia COVID-19 sulla mortalità totale della popolazione residente anno 2020
18. Izzotti A., Fracchia E., Au W., Pfeffer U., Colombo M., Emionite L., Pavan S., Miotto D, Lova P., Grasselli E., Faelli E., Tiso M., Pulliero A. Novel use of ozonized oils as chemo-prophylaxis and therapy against COVID-19 infection
19. Jensen MM. Inactivation of air-borne viruses by ultraviolet irradiation. *Appl Microbiol*. 1964;12:418–420
20. Ji W, Wang W, Zhao X, Zai J, Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol*. 2020;92: 433–440. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>
21. Jiang HJ, Chen N, Shen ZQ, Yin J, Qiu ZG, Miao J, Yang ZW, Shi DY, Wang HR, Wang XW, Li JW, Yang D, Jin M. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomed Environ Sci*. 2019 May;32(5):324-333. doi:10.3967/bes2019.044. PMID: 31217049.
22. Kam YW, Okumura Y, Kido H, Ng LF, Bruzzone R, Altmeyer R. Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PLoS One*. 2009;4(11):e7870. Published 2009 Nov 17. doi:10.1371/journal.pone.0007870
23. G. Kampf, D. Todt, S. Pfaender, E. Steinmann. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection* 104 (2020)246e251
24. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, Nakane T, Zivanov J, Neufeldt CJ, Cerikan B, Lu JM, Peukes J, Xiong X, Kräusslich HG, Scheres SHW, Bartenschlager R, Briggs JAG. Structures and

- distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*. 2020 Aug 17. doi: 10.1038/s41586-020-2665-2. Epub ahead of print. PMID: 32805734.
- 25.Kell D., Heyden E. and Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria
- 26.Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Neyts J, Van Ranst M. Growth kinetics of SARS-coronavirus in Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(3):1147-1151. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.085
- 27.Luo G (George), Gao S-J. Global health concerns stirred by emerging viral infections. *J Med Virol*. 2020;92:399–400. <https://doi.org/10.1002/jmv.25683>
- 28.Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. 2020 Jun 1;77(6):683-690. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1127. PMID: 32275288; PMCID: PMC7149362.
- 29.Martínez-Sánchez G, Schwartz A, Donna VD. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(5):389.
- 30.Martínez-Sánchez G, Schwartz A, Donna VD. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020 May 6;9(5):389. doi:10.3390/antiox9050389. PMID: 32384798; PMCID: PMC7278582.
- 31.McDevitt et al., Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light Applied and Environmental Microbiology Feb 2012, 78 (6) 1666-1669; DOI: 10.1128/AEM.06960-1
- 32.Nicastro F., Sironi G., Antonello E., Bianco A., Biasin M., Brucato J. R., Ermolli M., Pareschi G., Salvati M., Tozzi P., Trabattoni D., Clerici M.; Modulation of COVID-19 Epidemiology by UV-B and – A Photons from the Sun
- 33.Oh WK. COVID-19 infection in cancer patients: early observations and unanswered questions. *Ann Oncol*. 2020 Jul;31(7):838-839. doi: 10.1016/j.annonc.2020.03.297. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32243894; PMCID: PMC7270512.
- 34.Pandemic Influenza Risk Management: A WHO guide to inform and harmonize national and international pandemic preparedness and response. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 35.Setti L, Passarini F., De Gennaro G, Barbieri P., Licen S., Perrone M.G., Piazzalunga A., Borelli M., Palmisani J., Di Gilio A., Rizzo E., Colao A., Piscitelli P., Miani A. Potential role of particulate matter in the spreading of COVID-19 in Northern Italy: first observational study based on initial epidemic diffusion

36. Petre C., Stefanescu S., Smith L., The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality
37. Ranaldi GT, Villani ER, Franza L. Rationale for ozone-therapy as an adjuvant therapy in COVID-19: a narrative review. *Med Gas Res.* 2020 Jul-Sep;10(3):134-138. doi:10.4103/2045-9912.289462. PMID: 33004712.
38. Shang J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221-224 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
39. Shi Dan Yang, Wang Hua Ran, Wang Xin Wei, Li Jun Wen, Yang Dong, And Jin Min. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomed Environ Sci*, 2019; 32(5): 324-333
40. Schuit M., Ratnesar-Shumate S., Yolitz J., Williams G., Weaver W., Green B., Miller D., Krause M., Beck K., Wood S., Holland B., Bohannon J., Freeburger D., Hooper I., Biryukov J., Altamura L.A., Wahl V., Hevey M., and Dabisch P. Airborne SARS-CoV-2 Is Rapidly Inactivated by Simulated Sunlight
41. Torrey J, von Gunten U, Kohn T. Differences in Viral Disinfection Mechanisms as Revealed by Quantitative Transfection of Echovirus 11 Genomes. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Jul 1;85(14):e00961-19. doi: 10.1128/AEM.00961-19. PMID: 31076437; PMCID:PMC6606871.
42. Tartari APS, Moreira FF, Pereira MCDS, Carraro E, Cidral-Filho FJ, Salgado AI, Kerppers II. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* 2020 Jun;43(3):985-993. doi: 10.1007/s10753-020-01184-2. PMID:32382842.
43. Turunova B, Sikora M, Schurman C, Hagen WJ, Welsch S, Blanc FEC, von Bülow S, Gecht M, Bagola K, Hörner C, van Zandbergen G, Mosalaganti S, Schwarz A, Mühlebach RCM, Hummer G, Locker JK, Beck M. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science* doi: 10.1126/science.abd5223. Epub ahead of print.
44. Ufficio federale della sanità pubblica UFSP Categorie di persone particolarmente a rischio
45. Ugazio E., Tullio V., Binello A., Tagliapietra S. and Dosio F. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their characterization, Current Applications, and Advances in improved Delivery Techniques
46. Valdenassi L, Franzini M, Ricevuti G, Rinaldi L, Galoforo AC, Tirelli U. Potential mechanisms by which the oxygen-ozone (O₂-O₃) therapy could contribute to the treatment against the coronavirus COVID-19. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*2020 Apr;24(8):4059-4061. doi: 10.26355/eurrev_202004_20976. PMID: 32374009.

47. Walls AC et al. Structure, function and antigenicity of the SARS-CoV-2- Spike glycoprotein. *Cell* 181, 281-292 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
48. Weiss et al. Disrupting the Transmission of Influenza A: Face Masks and Ultraviolet Light as Control Measures. *American Journal of Public Health* | Supplement 1, 2007, Vol 97, No. S1
49. Williams JG, Maier RV. Ketoconazole inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in acute lung injury (adult respiratory distress syndrome). *Surgery*. 1992 Aug;112(2):270-7. PMID: 1322565.
50. Wrapp D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
51. Xintian X., Ping C., Jingfang W., Jiannan F., Hui Z., Xuan L., Wu Z. & Pei H. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission
52. Yuan H., Chan Y., Xin-feng X., Wei X. and Shu-wen L. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* volume 41, pages1141–1149.
53. Zheng Z, Dong M, Hu K. A preliminary evaluation on the efficacy of ozone therapy in the treatment of COVID-19. *J Med Virol*. 2020 May 21:10.1002/jmv.26040. doi: 10.1002/jmv.26040. Epub ahead of print. PMID: 32437014; PMCID: PMC7280732.
54. Butler-Laporte G, Nakanishi T, Mooser V, Morrison DR, Abdullah T, Adeleye O, et al. (2021) Vitamin D and COVID-19 susceptibility and severity in the COVID-19 Host Genetics Initiative: A Mendelian randomization study. *PLoS Med* 18(6): e1003605. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003605>
55. Jovic T., Ali S., Ibrahim N., Jessop Z., Tarassoli S., Dobbs T., Holford P., Thornton C. and Whitaker I. Could Vitamins Help in the Fight Against COVID-19? Received: 3 August 2020; Accepted: 20 August 2020; Published: 23 August 2020

9. Ringraziamenti

Guardandomi indietro, in questi anni sono cambiate parecchie situazioni, il mio modo di vedere la vita, le persone ed il lavoro sono mutati. Un primo pensiero va a chi mi guarda da lassù, Sergio, Cesarina e Guido, mi mancate. C'è chi nel frattempo è diventata bisnonna, Anna.

Volevo ringraziare la mia famiglia, babbo e mamma per il supporto in questi anni e l'aver creduto in me. Emma e Zaira due sorelle lontane ma sempre più vicine, abbiamo imparato a conoscerci ed apprezzarci ogni giorno di più, avete preso la vostra strada inseguendo i vostri sogni, lottate sempre per quello in cui credete.

Vale e Fex, abbiamo condiviso tanti anni insieme scegliendo anche la stessa Università, mi siete sempre stati a fianco soprattutto nei momenti difficili aiutandomi a superarli, i vostri consigli sono sempre tesori preziosi.

Angi e gli n-mila esami preparati insieme, Macchia e Matte per il supporto pre e durante gli esami e per i meme partoriti dalle vostre menti.

Elisa, Giulia e Grazia, le nostre strade si sono incrociate forse per caso, ma oltre essere state delle compagne ed amiche, so che sarete anche delle grandi colleghe.

Nidal, non è neanche un anno che ti ho incontrato, ma sei stato subito presente e di gran supporto, il nostro polemizzare su tutto e tutti in maniera comica mi ha alleggerito giornate storte e mi ha spronato per questo ultimo tour de force di esami.

Dottoressa Ferroni, grazie per avermi dato gli strumenti per affrontare la complessità della vita, capire che persona volevo diventare ed accettare quella che sono, non so se mi sarei mai laureata se non l'avessi incontrata.

Andrea, non ho parole per ringraziarti, se non mi fossi stato accanto non avrei avuto la forza di fare tutto quello che ho fatto, mi hai ascoltato in tutte le forme, ogni giorno benedico la volta che ti ho incontrato e sono orgogliosa di tutto ciò che stiamo costruendo e costruiremo insieme. Tra queste quel dittatore in pannolino di nostro figlio Nico Adelchi, sei arrivato insieme ad una pandemia mondiale e mi hai scombussolata tutto, allo stesso tempo, però, sei stato la scintilla che ha accelerato la conclusione di questo percorso.

Grazie a tutti gli amici che hanno portato nuove esperienze e idee nella mia vita.