

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



Dipartimento di scienze della terra, dell'ambiente e della vita

Corso di Laurea Magistrale in:

**BIOLOGIA APPLICATA E SPERIMENTALE
(Curriculum BIOSANTARIO)**

Titolo

**Ruolo dell'autoimmunità nella patogenesi
dell'infezione da SARS-CoV-2 e nello sviluppo di rari effetti avversi
associati alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2.**

Candidato: Taglieri Martina

Relatori: Pesce Giampaola, Bozzano Federica Maria

Correlatori: Bassi Anna Maria

**Anno accademico:
2021-2022**

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	I Coronavirus e le infezioni da Coronavirus	3
1.2	Struttura e genoma	4
1.3	Passaggio di specie e diffusione dei coronavirus	8
1.4	Malattie causate da Coronavirus	9
1.5	SARS-CoV-2	11
1.6	Le origini di SARS-CoV-2	12
1.7	Manifestazioni cliniche a seguito di infezione da SARS-CoV-2	15
1.8	Vaccini anti-SARS-CoV-2	16
1.9	La teoria del network idiotipico e l'infezione da SARS-CoV-2	18
2	LA PRODUZIONE DI AUTOANTICORPI A SEGUITO DI INFEZIONE DA SARS-CoV-2 E A SEGUITO DI VACCINAZIONE ANTI-SARS-CoV-2	21
2.1	Anticorpi anti-ACE2	21
2.2	Anticorpi anti-fattore piastrinico 4	22
3	SCOPO DEL LAVORO	25
4	MATERIALI E METODI	26
4.1	Pazienti	26
4.2	Valutazione anticorpi anti-PF4	28
4.3	Test di funzionalità per conferma VITT	30
4.4	Valutazione anticopi anti ACE2.	31
4.5	Statistica	31
5	RISULTATI	32
5.1	Analisi della presenza di anticorpi anti-PF4 in pazienti con sospetto di VITT	32
5.2	Studio della presenza degli anticorpi anti-ACE2 in siero di pazienti dopo infezione da SARS-CoV-2.	36
6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	38
7	BIBLIOGRAFIA	41

1 INTRODUZIONE

1.1 I coronavirus e le infezioni da coronavirus

I coronavirus sono virus a RNA a singolo filamento con polarità positiva provvisti di un involucro pericapsidico morfologicamente peculiare (1). Si pensa siano emersi tra il 2400 e il 3000 a.C. e tendono ad infettare diversi gruppi di animali (Tabella 1), ma il primo coronavirus isolato in embrioni di pollo risale al 1937 (2). Si trovano in molte specie animali e sono in grado di sviluppare, nell'ospite, diversi sintomi di malattia (3-6). I coronavirus, sulla base della loro caratterizzazione genomica e sierologica sono divisi in 4 distinti generi chiamati: Alphacoronavirus (alpha-CoV), Betacoronavirus (beta-CoV), Gammacoronavirus (gamma-CoV) e Deltacoronavirus (delta-CoV) (3-5-7). Alphacoronavirus e Betacoronavirus sono stati identificati principalmente nei mammiferi, mentre Gammacoronavirus e Deltacoronavirus infettano principalmente gli uccelli. I Gammacoronavirus sono in grado di infettare anche i cetacei inclusi i beluga, le balene e i delfini (8-11).

I coronavirus fino ad ora conosciuti sono suddivisi in 3 gruppi e in diversi sottogruppi. I gruppi 1 e 2 includono i virus isolati dall'uomo, anche se risulta evidente dall'analisi filogenetica una certa distanza tra molti di loro. Il sottogruppo 1b include il coronavirus umano 229E (HCoV-229E) e il coronavirus umano NL63 (HCoV-NL63). Il primo è principalmente coinvolto in infezioni delle prime vie aeree (riniti), il secondo può essere l'agente eziologico d'infezioni anche delle basse vie (bronchioliti e polmoniti) specie nella prima infanzia. Il sottogruppo 2b include il SARS-CoV, mentre il MERS-CoV appartiene, sulla base di questa classificazione genetica, al sottogruppo 2c. Nel sottogruppo 2a sono presenti altri due virus umani, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, agenti eziologici d'infezioni delle prime vie aeree e di broncopolmoniti infantili. È interessante notare come in quasi tutti i gruppi siano presenti coronavirus identificati con il prefisso Bt; si tratta di coronavirus isolati dai pipistrelli (bat); vedremo in seguito il ruolo centrale che questi animali giocano nella diffusione dei coronavirus.

La diversità dei coronavirus è il risultato di molteplici ragioni, prima fra tutte l'infedeltà dell'RNA-polimerasi che fa sì che il tasso di mutazioni sia nell'ordine di 1x1000 a 10000 nucleotidi replicati, il che rende i coronavirus estremamente plastici (12). I coronavirus posseggono il genoma più grande dei virus ad RNA (26.4-31.7 Kb) permettendo ulteriore

plasticità nell'accomodare e modificare il loro genoma. In campioni di cellule umane infettate da coronavirus circa il 60% del trascrittoma è rappresentato da proteine virali, a dimostrazione dell'alterazione biologica subita a seguito dell'infezione con formazione di trascritti non canonici dati da trascritti parziali o fusione di trascritti, la cui funzione non è ancora chiara ma supporta l'osservazione che il virus è portato a frequenti eventi di ricombinazione nell'ospite (13-14).

Questo particolare aspetto comporta non solo la generazione di nuovi genotipi ma anche di nuove specie che sono abili ad adattarsi a nuovi ospiti e nicchie ecologiche, causando la comparsa di zoonosi con conseguenze anche potenzialmente disastrose (15).

1.2 Struttura e genoma

I coronavirus, nella loro forma extracellulare, appaiono rotondeggianti con un diametro di 100-150 nm. Sulla superficie dell'envelope presentano delle strutture della lunghezza di circa 20 nm che sono formate dalla glicoproteina S (Spike). I trimeri di questa proteina, disposti sulla superficie esterna al virione fanno sì che assumano l'aspetto di una corona che va a caratterizzare il virione (Figura 1, Pannello A e B) da cui deriva il loro nome (16). Le proteine strutturali che lo caratterizzano, oltre alla già citata proteina S, sono: la proteina dell'Envelope (E), la proteina di Membrana (M) e la proteina del Nucleocapside (N). Alcuni coronavirus possiedono anche un'ulteriore proteina dell'envelope più piccola della proteina S, denominata Hemoagglutinin-Esterase protein (HE), che svolge la sua attività nella fase di rilascio del virus dalla cellula infettata. La proteina S è coinvolta nell'ingresso e nell'interazione con il recettore della cellula target e pertanto guida la specificità d'ospite e tissutale del virus. Gli anticorpi neutralizzanti si legano alla proteina S. La proteina di membrana (M) attraversa tre volte l'envelope virale, interagendo all'interno del virione con il complesso costituito dall'RNA genomico e dalla nucleoproteina (proteina N). La proteina N ha la funzione di stabilizzare l'RNA a polarità positiva che costituisce il genoma dei coronavirus. Come altri virus a RNA a polarità positiva, il virione dei coronavirus non include una polimerasi, pur essendo questi virus capaci di sintetizzarla nel corso del loro ciclo replicativo (Figura 2). Il genoma dei coronavirus è di grande taglia (da 27 a 32 Kb, nei diversi virus); non sono noti virus a RNA di taglia maggiore. Esso è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva, con un cap e un sito di poliadenilazione. L'organizzazione genica è simile in

tutti i coronavirus, con un'ampia regione relativa ai geni funzionali all'estremità 5' e una successiva sequenza di regioni codificanti le proteine strutturali. A seguito dell'ingresso del virus nella cellula ospite viene trascritto, ma solo la porzione 5' dell'mRNA viene tradotta. Vengono prodotti 7 mRNA: il più corto codifica per la nucleoproteina (N), mentre gli altri dirigono la sintesi di altri segmenti di genoma. Le proteine vengono poi assemblate sulla membrana del virione. L'RNA genomico viene incorporato nelle particelle virali mature in formazione, le quali vengono liberate per gemmazione dalla membrana cellulare interna.

L'RNA virale include inoltre almeno 6 ORFs (Open Reading Frames); il primo ORF (ORF a/b) occupa circa 2/3 dell'intero genoma e codifica proteine coinvolte nel processo replicativo. Ciò avviene attraverso la traduzione di una singola poliproteina che viene processata sia da una proteasi virale (detta main protease), sia da papain-like proteases. Il risultato è la disponibilità di 15 o 16 proteine non strutturali (Non-Structural Proteins, NSP) delle quali conosciamo oggi gran parte delle funzioni (Tabella 2). In ultima analisi, vi sono da 1 a 8 geni codificanti proteine accessorie diverse, in relazione al ceppo virale.

Tabella 1.

Gruppo	Coronavirus	Specie animale infettata
1a	FCoV	Felini
	TGEV	Maiale
1b	HCoV-229E	Uomo
	HCoV-NL63	Uomo
	BtCoV-HKU2	Pipistrello
	BtCoV-1A-AFCD62	Pipistrello
	BtCoV-1B-AFCD307	Pipistrello
	BtCoV-HKU8-AFCD77	Pipistrello
	BtCoV-512-2005	Pipistrello
2a	HCoV-OC43	Uomo
	HCoV-HKU1	Uomo
	BCoV-VENT	Bovino
2b	SARS-CoV	Uomo
	BtSARS-HKU3	Pipistrello
	BtSARS-Rm1	Pipistrello
	BtSARS-229-2005	Pipistrello
	BtCoV273-2005	Pipistrello
2c	MERS-CoV	Uomo
	BtCoV-HKU4	Pipistrello
	BtCoV-HKU5	Pipistrello
	BtCoV-133-2005	Pipistrello
2d	BtCoV-HKU9.4	Pipistrello
	BtCoV-HKU9.1	Pipistrello
	BtCoV-HKU9.2	Pipistrello
	BtCoV-HKU9.3	Pipistrello
3	IBV	Pollo

Estratto da Microbiologia Medica III edizione aggiornata (Clementi M.)

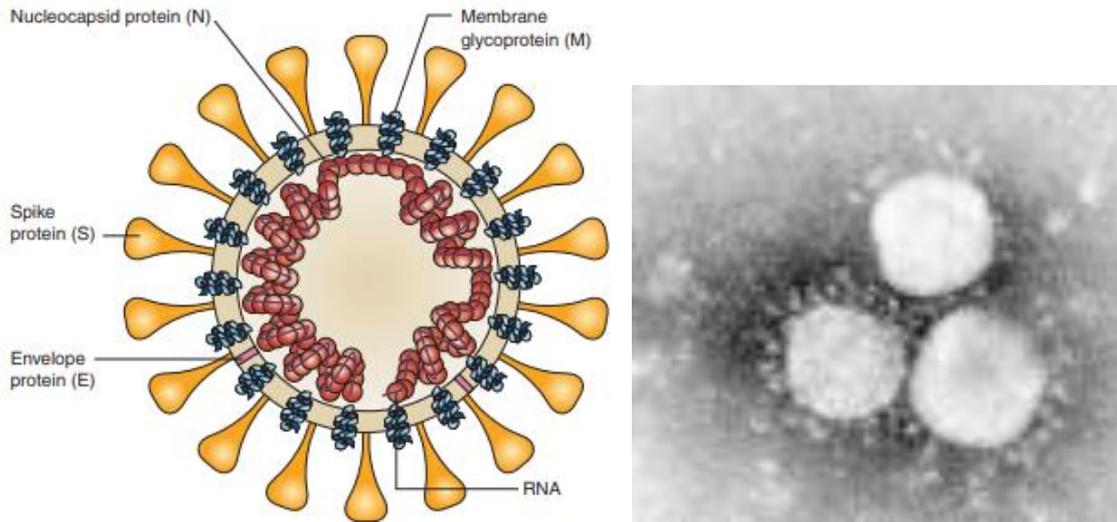


Figura 1. Pannello A: Struttura del Coronavirus (SARS). Caratteristica che contraddistingue il SARS-CoV dai coronavirus del Gruppo 2 è il fatto di non possedere la glicoproteina emoagglutinina esterasi. Il genoma, ad RNA virale con polarità positiva a singolo filamento, è associato alla proteina del nucleocapside. **Pannello B:** Human Coronavirus 229E. Bar, 100 nm (S. Sikotra, Leicester Royal Infirmary, Leicester, England.)

Figura 53.2 Tappe della replicazione di coronavirus. Caratteristico è il processo di trascrizione (una sequenza leader comune copiata dall'estremità 3' del *minus strand* su ciascuno dei trascritti di differente taglia). Successivamente all'assemblaggio avviene la gemmazione intracellulare, tipica dei coronavirus.

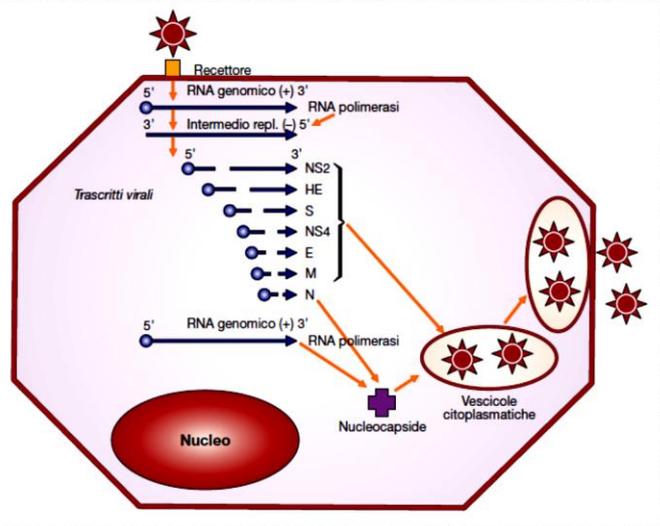


Figura 2. Tappe della replicazione di Coronavirus.
Estratto da *Microbiologia Medica III edizione aggiornata* (Clementi M.)

Tabella 2.

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

Estratto da Microbiologia Medica III edizione aggiornata (Clementi M.)

Studi *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che i coronavirus crescono in cellule epiteliali respiratorie differenziate. Le cellule infettate divengono vacuolate, le ciglia vengono danneggiate e sono in grado di formare dei sincizi. *In vivo*, si è osservato che il danno cellulare locale induce il rilascio di mediatori dell'infiammazione con aumento delle secrezioni nasali e locale infiammazione. I coronavirus colonizzano il tratto respiratorio attraverso il naso, preferenzialmente il tratto respiratorio alto, solo ultimamente anche le basse vie respiratorie. Dopo un'incubazione di circa 3 giorni causano sintomi comuni da raffreddamento, incluse ostruzione nasale e occasionalmente tosse. La patologia, in genere, si risolve nel giro di pochi giorni durante i quali il virus viene liberato nelle secrezioni nasali. I coronavirus che hanno causato le recenti pandemie (SARS, MERSe COVID-19) nell'uomo appartengono ad un sottogruppo dei Betacoronavirus conosciuto come Sarbecovirus (17).

1.3 Passaggio di specie e diffusione dei coronavirus

La capacità dei coronavirus di adattarsi alla replicazione in specie diverse è conosciuta da tempo; dal punto di vista molecolare questo evento si realizza attraverso mutazioni o ricombinazioni geniche. Esempi di tale plasticità genica sono il coronavirus bovino (*Bovine Coronavirus*, BCoV) e quello umano HCoV-OC43, geneticamente molto simili, per cui si stima, attraverso studi di filogenesi, che ci possa essere stato un salto di specie circa 100 anni fa. Coronavirus del cane (Canine-CoV; CCoV), dei felini (FCoV) e del maiale hanno dimostrato segni di ricombinazione che hanno dato origine a due nuovi virus, rispettivamente del cane e dei felini (CCoV-II e FCoV-II). Il coronavirus *Transmissible Gastroenteritis Virus* (TGEV) si suppone sia emerso come trasmissione dal cane al maiale di CCoV-II. Infine, studi molecolari condotti in tutti i continenti hanno documentato l'esistenza di oltre 60 distinti tipi di coronavirus dei pipistrelli, filogeneticamente derivanti da comuni antenati che, nel tempo, si sono adattati alle diverse specie di pipistrello. Molti coronavirus dei mammiferi e dell'uomo sono vicini ai virus dei pipistrelli e, ad oggi, è stato infatti descritto come questi ultimi abbiano un ruolo importantissimo nella diffusione dei coronavirus (e non solo) a specie animali selvatiche o domestiche e che, da esse, con un successivo step, passi all'uomo.

Nell'epidemia di SARS del 2002-2003 fu presto evidente che i primi casi si erano sviluppati in mercati dove avveniva la macellazione di alcuni piccoli animali selvatici che erano utilizzati nella gastronomia locale: zibetto o *Himalayan palm civets* (*Paguma larvata*), *Raccoon dogs* (*Nyctereutes procyonoides*) e *Chinese ferret badgers* (*Melogale moschata*). È oggi ipotizzato che queste specie selvatiche siano state infettate da un virus del pipistrello, geneticamente molto vicino a SARS-CoV.

Per quanto riguarda MERS-CoV, il ruolo di ospite intermedio per l'infezione umana è stato svolto dai dromedari, animali nei quali è stato isolato il virus e sono stati identificati frequentemente anticorpi neutralizzanti sierici, a testimonianza di un'infezione pregressa. È ritenuto, tuttavia, molto probabile che alcune decine di anni fa, i dromedari siano stati infettati da un virus dei pipistrelli in modo analogo a quanto osservato per la SARS.

1.4 Malattie causate da coronavirus

HCov-OC43 e HCov-229E sono due coronavirus noti come causa di infezione del tratto respiratorio superiore e, solo occasionalmente, sono in grado di indurre forme di polmonite severa in neonati, anziani o soggetti immunodepressi. A partire dal 2002-2003, a seguito dell'epidemia di SARS-CoV che ha colpito le regioni meridionali della Cina causando 8000 casi nel mondo, si inizia ad osservare una malattia sistemica con coinvolgimento multiorgano nelle sue forme severe.

Nel 2004 si arriva all'isolamento di due coronavirus umani HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, isolati da pazienti ospedalizzati. HCoV-NL63 è un virus che infetta da molto tempo (secoli) il genere umano, poiché studi filogenetici hanno mostrato che si è differenziato da HCoV-229E circa 1000 anni fa, ha una distribuzione vastissima in tutto il mondo e generalmente è coinvolto in infezioni di modesta gravità clinica.

Nel 2012 viene registrata nella penisola arabica una nuova epidemia di malattia respiratoria severa: *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV). Il coronavirus responsabile risulterà diverso da quello associato all'epidemia di SARS, con una mortalità del 33%.

Il decorso clinico di SARS e MERS è molto simile. La proteina S di SARS-CoV utilizza il recettore ACE2 presente nelle cellule dell'albero respiratorio per l'ingresso nella cellula. La down-regolazione dei recettori ACE2 porta a un'eccessiva produzione di angiotensina II da parte dell'enzima correlato ACE e ciò induce un'eccessiva permeabilità vascolare polmonare. In particolare un'alterata regolazione di citochine e chemochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, IL-6, CXC-chemokine ligand 10, CXCL10, e CC-chemokine ligand 2, CCL2) contribuisce alla severità clinica delle infezioni da SARS-CoV e MERS-CoV. SARS-CoV e MERS-CoV, come descritto in letteratura, utilizzano diverse strategie per evadere la risposta immune innata. Tra queste le più osservate sono la replicazione all'interno di cellule che mancano di *Pattern Recognition Receptors* (PRR), la produzione di proteine virali non strutturali (NSP) che interagiscono con la via metabolica dei PRR, l'inibizione della produzione di interferone di tipo 1 (IFN-1) e, attraverso altre NSP, l'antagonismo verso IFN.

I coronavirus non infettano soltanto l'uomo; TGEV causa diarrea nei maiali, l'*Infectious Bronchitis Virus* (IBV) causa una severa infezione del tratto respiratorio e malattia renale nei polli, BCoV causa malattia respiratoria ed enterica nei bovini. Si tratta in tutti i casi

di infezioni, che hanno un'importanza economica notevole negli allevamenti e sottolineano come i coronavirus siano diffusi tra le diverse specie animali (uomo incluso) sia di allevamento sia, soprattutto, selvatiche (Tabella 3, Figura 3).

Tabella 3. Confronto dei principali coronavirus patogenetici. I diversi CoV mostrano una diversa gamma di ospiti e differenti tropismi tissutali, generalmente Alfacoronavirus e Betacoronavirus infettano i mammiferi mentre Gammacoronavirus e Deltacoronavirus infettano uccelli e pesci, anche se alcuni di essi potrebbero infettare anche i mammiferi. Si riportano in tabella le differenti sintomatologie causate dal virus, il genere e l'ospite principalmente colpito.

Virus	Genus	Host	Symptoms
Human CoV-229E	Alpha	Human	Mild respiratory tract infections
Human CoV-NL63	Alpha	Human	Mild respiratory tract infections
PRCV/ISU-1	Alpha	Pig	Mild respiratory tract infections
TGEV/PUR46-MAD	Alpha	Pig	Diarrhea, with 100% mortality in piglets less than 2-wk-old
PEDV/ZJU-G1-2013	Alpha	Pig	Severe watery diarrhea
SeACoV-CH/GD-01	Alpha	Pig	Severe and acute diarrhea and acute vomiting
Canine CoV/TU336/F/2008	Alpha	Dog	Mild clinical signs, diarrhea
Camel alphacoronavirus isolate camel/Riyadh	Alpha	Camel	Asymptomatic
Feline infectious peritonitis virus	Alpha	Cat	Fever, vasculitis, and serositis, with or without effusions
Human CoV-HKU1	Beta	Human	Pneumonia
Human CoV-OC43	Beta	Human	Mild respiratory tract infections
SARS-CoV	Beta	Human	Severe acute respiratory syndrome, 10% mortality rate
MERS-CoV	Beta	Human	Severe acute respiratory syndrome, 37% mortality rate
Bovine CoV/ENT	Beta	Cow	Diarrhea
Equine CoV/Obihiro12-1	Beta	Horse	Fever, anorexia, leucopenia
MHV-A59	Beta	Mouse	Central nervous system disease and hepatitis
Beluga Whale CoV/SW1	Gamma	Whale	Pulmonary disease, terminal acute liver failure
IBV	Gamma	Chicken	Severe respiratory disease
Bulbul coronavirus HKU11	Delta	Bulbul	Respiratory disease (collected from respiratory tract of dead wild birds)
Sparrow coronavirus HKU17	Delta	Sparrow	Respiratory disease (collected from respiratory tract of dead wild birds)

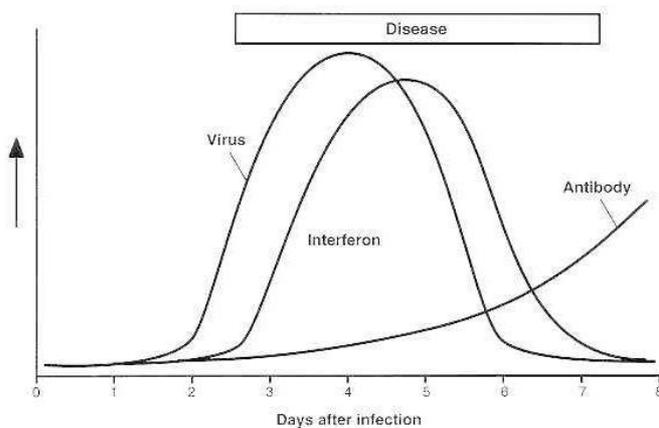


Figura 3: Andamento della risposta immunitaria a seguito dell'infezione da coronavirus.

1.5 SARS-CoV-2

SARS-CoV2, appartiene al gruppo dei Betacoronavirus, in modo simile agli altri coronavirus possiede un genoma a RNA a polarità positiva da 30Kb (18-20). Il suo genoma codifica per le già citate 4 proteine strutturali: la proteina spike (S), la proteina dell'envelope (E), la proteina di membrana (M) e la proteina del nucleocapside (N) (Figura 4). Sono inoltre prodotte numerose proteine strutturali definite come “open reading frame” (ORF) (21).

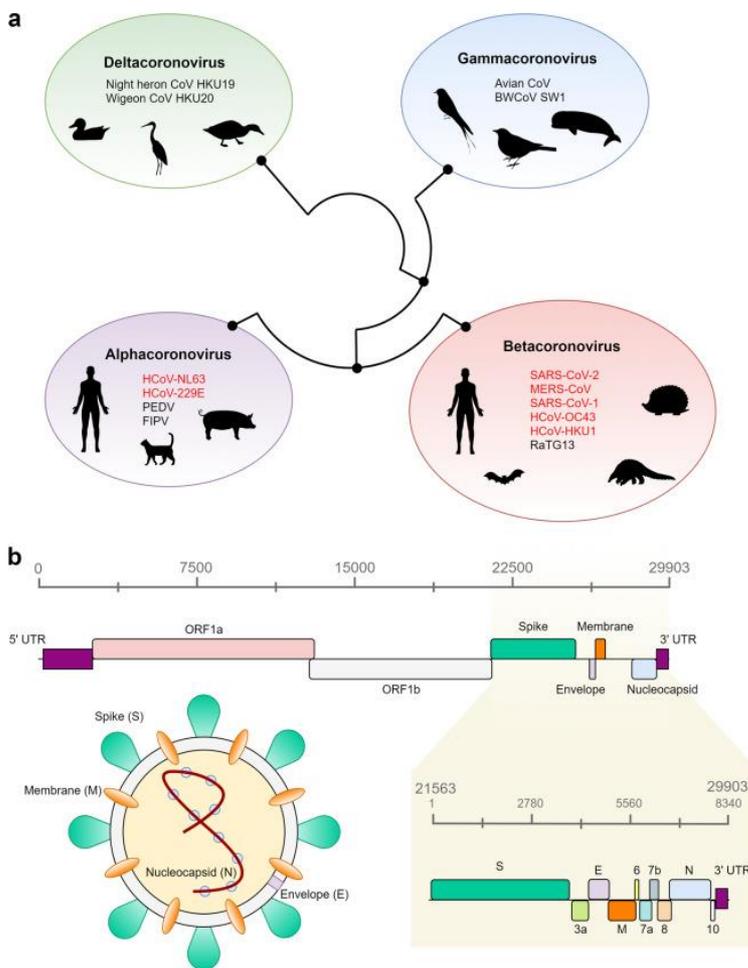


Figura 4. SARS-CoV-2: Filogenesi e struttura del genoma. Pannello A: i 4 gruppi principali in cui sono racchiusi i coronavirus, SARS-CoV-2 entra a far parte del gruppo dei Betacoronavirus. **Pannello B:** Rappresentazione schematica del genoma di SARS-CoV-2 (21).

1.6 Le origini di SARS-CoV-2

I coronavirus sono ben conosciuti per presentare un alto rischio pandemico. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) è il nono coronavirus documentato che infetta l'uomo e il settimo identificato nel corso degli ultimi 20 anni (22-23). Tutti i precedenti coronavirus hanno origine zoonotica. SARS-CoV-2 porta con sé tracce dei precedenti eventi zoonotici. SARS-CoV-2 mostra similarità chiare a SARS-CoV che infettò gli umani in Foshan, provincia di Guangdong, in Cina nel novembre 2002, poi nuovamente nelle province di Guangzhou, Guangdong nel 2003 (24). La comparsa di entrambi i virus SARS-CoV e SARS-CoV-2 fu associata alla vendita di animali vivi, in particolare civette e procioni (25), gli stessi che erano venduti al mercato di Wuhan nel dicembre 2019 diventato poi l'epicentro dell'infezione da SARS-CoV-2 (26-27). SARS-CoV-2, in breve tempo, diede origine a due lineage A e B che all'inizio circolarono contemporaneamente. Il lineage B sarà quello che dominerà a livello globale (Figura 5).

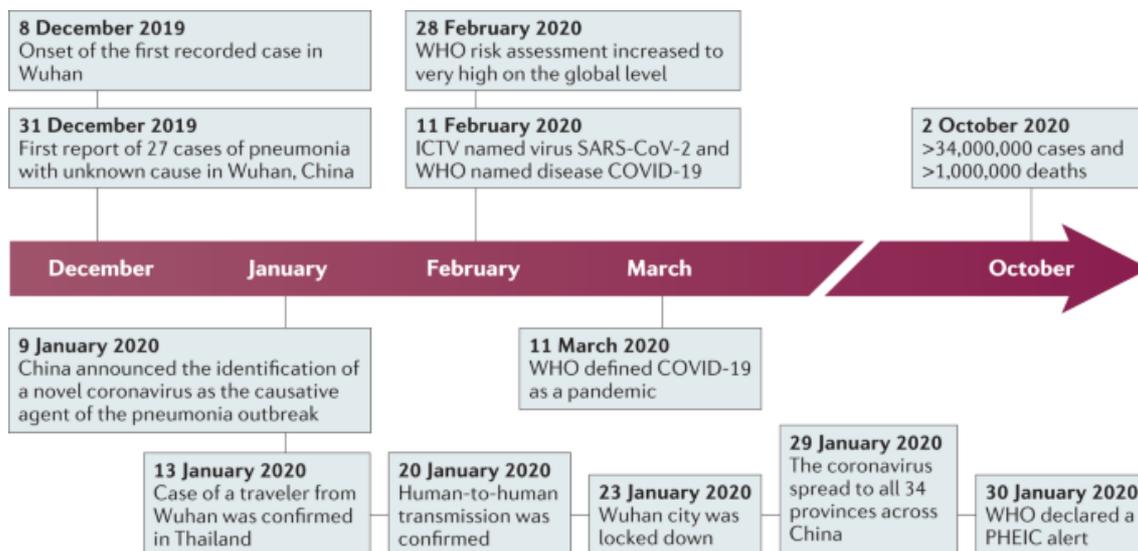


Figura 5. Timeline dai primi casi di infezione da SARS-COV2 all'ottobre 2020. I primi casi furono registrati a dicembre 2019 nella città di Wuhan in Cina. Nei 10 mesi successivi, nel mondo sono stati registrati più di 30 milioni di casi. COVID-19, Coronavirus Disease 2019; ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses; PHEIC, Public Health Emergency of International Concern; SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; WHO, World Health Organization. (27)

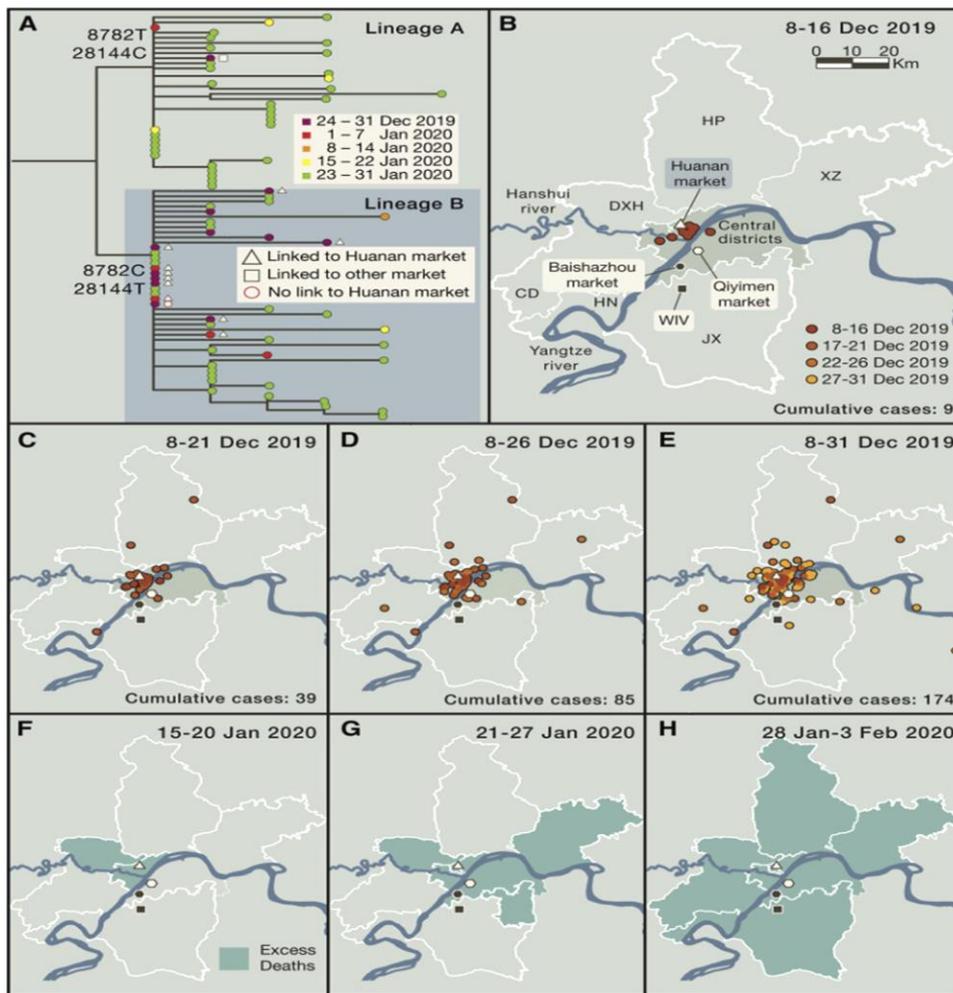


Figura 6. Filogenesi ed epidemiologia dei primi casi registrati di COVID-19 a Wuhan.

Pannello A. Albero filogenetico del genoma dei primi campioni di SARS-CoV-2 raccolti a Wuhan durante il periodo intercorso tra dicembre 2019 ed il gennaio 2020. La divisione tra il lineage A e B è indicato con le coordinate, la base invece indica i nucleotidi mutati. I casi di cui si ha conoscenza della stretta associazione con mercato di Huanan o altri mercati sono indicati da simboli (World Health Organization, 2021).

Pannello B. Mappa dei distretti di Wuhan che mostra la localizzazione dei mercati, del Wuhan National Biosafety Laboratory presso il Zhengdian Scientific Park of the Wuhan Institute of Virology (denoted WIV), dove è avvenuto l'isolamento e la coltura in vitro ad opera del Dr. Shi Zhengli.

Pannelli C–E. Indicano la localizzazione dei casi di COVID-19 registrati a Wuhan nel periodo tra l'8 ed il 31 dicembre 2019.

Pannelli F–H. Mappa dei distretti di Wuhan dove si sono registrati i primi casi di decesso dovuto a polmoniti dal 15 gennaio 2020. I casi inseriti nella mappa sono stati estratti dai dati di World Health Organization (2021) (28).

Da un punto di vista genomico condivide il 79% della sua sequenza con SARS-CoV ed il 50% con MERS-CoV (26). L'organizzazione genomica ricalca quella degli altri Betacoronavirus. La maggior parte delle proteine codificate hanno una lunghezza simile a quella di SARS-CoV. Per quanto riguarda invece i geni correlati alle proteine strutturali, hanno il 90% di omologia con SARS-CoV tranne che per la proteina S per cui il gene diverge (29). L'analisi filogenetica dell'intero genoma ha mostrato che SARS-CoV-2 risulta clusterizzato con SARS e relativi coronavirus identificati nei pipistrelli facendolo, quindi, rientrare nel sottogenere dei Sarbecovirus del genere Betacoronavirus (Figura 7).

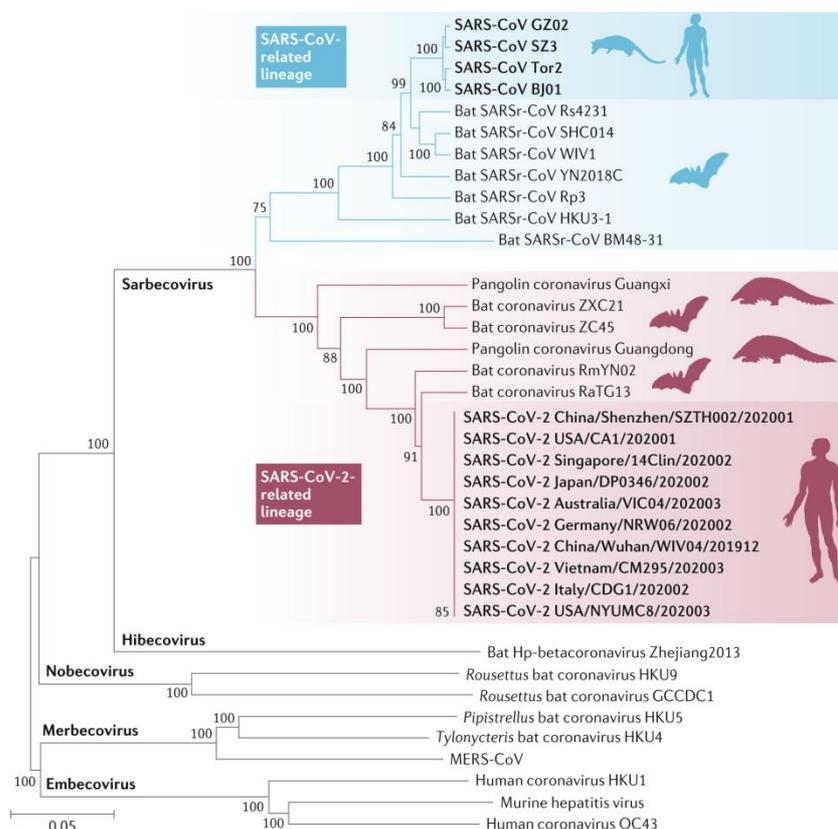


Figura 7. Albero filogenetico dei coronavirus con inclusione di SARS-CoV-2. Ben Hu et al. (27) hanno proceduto alla costruzione dell'albero utilizzando il metodo di "neighbour joining" con l'uso del programma MEGA6. Le sequenze sono state scaricate dal database GISAID database and GenBank. MERS-CoV, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus.

La proteina S di SARS-CoV-2 presenta una lunghezza 1273 amminoacidi, più lunga di SARS-CoV umano e dei pipistrelli. Si distingue dalle proteine S appartenenti a membri

del genere Sarbecovirus condividendo il 77% di similarità con SARS-CoV delle civette e umani, il 75% con coronavirus dei pipistrelli e 90% con quello dei pangolini.

Nel dominio legante il recettore (Receptor Binding Protein, RBD) della proteina S, la similarità tra SARS-CoV-2 e SARS-CoV è di solo il 73%. Un altro aspetto genomico che caratterizza SARS-CoV-2 è l'inserzione di 4 residui amminoacidici (PRRA) alla giunzione delle subunità S1 e S2 del trimero della proteina S. Questo genera un sito di clivaggio definito come sito di clivaggio polibasico (RRAR) che rende inefficace il clivaggio da parte della furina e di altre proteasi. Ulteriori studi sono ancora necessari per chiarire se da questo sito sia dipendente l'alta trasmissibilità di SARS-CoV-2 (30).

1.7 Manifestazioni cliniche a seguito di infezione da SARS-CoV-2

Il nuovo coronavirus, denominato SARS-CoV-2, determina la malattia identificata come COVID-19 (**CO**rona**VI**rus **D**isease-**19**).

L'infezione da SARS-CoV-2 avviene tramite l'inalazione di "droplets", goccioline emesse a seguito di un eccesso di tosse, l'azione del parlare o starnutire. Le goccioline contenenti le particelle virali depositate su superfici od oggetti sono ancora in grado di contaminare ed infettare un soggetto che ne venga in contatto anche a distanza di ore.

La diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2 dell'uomo viene eseguita attraverso la ricerca dell'RNA genomico del virus nel tampone orofaringeo o nasale o nel liquido di lavaggio broncoalveolare. Si tratta, al momento, di un'amplificazione qualitativa di tre diverse regioni del genoma del virus. È possibile la ricerca di immunoglobuline sieriche di classe IgG e IgM per scopi epidemiologici.

Nei casi clinicamente più gravi è presente una concentrazione di virus particolarmente elevata a livello alveolare e interstiziale. Per infettare le cellule dell'albero respiratorio il virus usa lo stesso recettore di SARS-CoV, ACE2, espresso a livello alveolare. L'affinità tra ACE2 e la proteina S di SARS-CoV-2 è da 10 a 20 volte più elevata di quella osservata in SARS-CoV.

I sintomi clinici più comuni sono rappresentati da febbre, dolori muscolari, tosse secca, perdita di gusto ed olfatto. Nelle forme più severe evolve a polmonite e si assiste alla cosiddetta "tempesta citochinica" dove si rilevano alte concentrazioni di citochine infiammatorie nel siero dei pazienti (es. IL-6) con conseguente interessamento

multiorgano. L'evoluzione clinica del paziente può essere anche rapida. Numerosi farmaci sono stati testati nel tentativo di bloccare la replicazione virale (27).

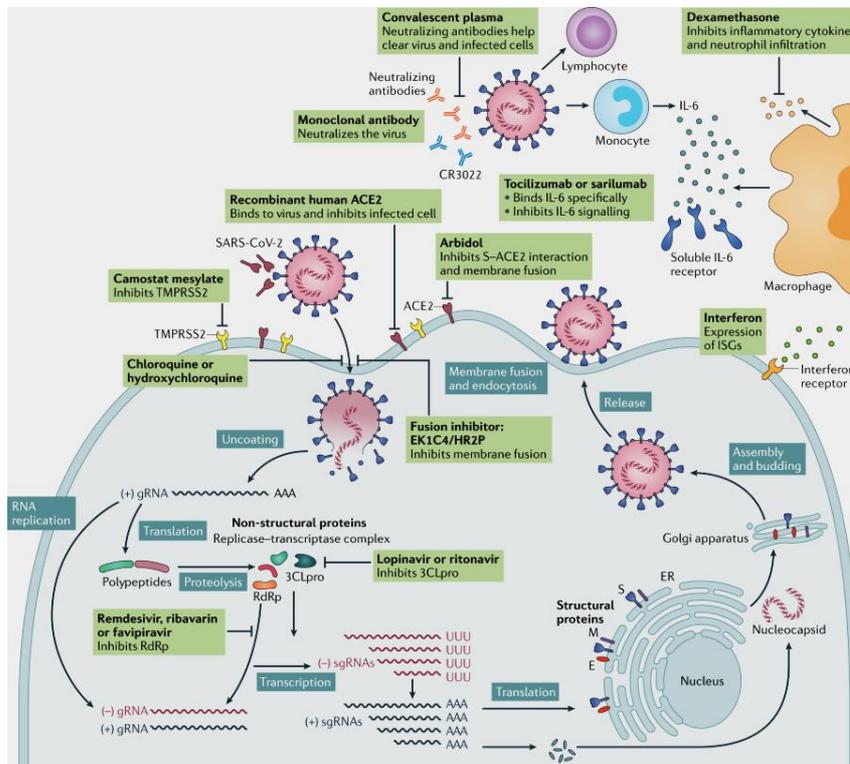


Figura 8. Differenti step di replicazione di SARS-CoV-2: dal legame con il recettore alla replicazione, sono target di potenziali farmaci antivirali. Inoltre, sono anche indicate come potenziali antivirali farmaci immunomodulatori o basati sull'uso di immunoglobuline. 3CLpro, 3C-like protease; ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; CR3022, un anticorpo monoclonale specifico per SARS-CoV; E, proteina dell'Envelope; EK1C4, lipopeptide derivato da EK1 che è un inibitore di fusione pan-coronavirus che riconosce il dominio HR1 della proteina Spike; ER, reticolo endoplasmatico; gRNA, RNA genomico; HR2P, peptide derivato dalla proteina Spike di SARS-CoV-2; IL-6, interleuchina 6; ISG, gene stimolato da interferone; M, proteina di Membrana; RdRp, RNA polimerasi dipendente da RNA; sgRNA, RNA subgenomico; S, proteina Spike; TMPRSS2, serin proteasi 2 transmembrana (27).

1.8 Vaccini anti-SARS-CoV-2

I vaccini sono lo strumento più importante dal punto di vista del rapporto costo-beneficio per controllare la pandemia da SARS-CoV-2, anche se il continuo emergere di nuove varianti può in parte intaccarne l'efficacia di prevenzione.

Tutti i vaccini appaiono efficaci nel prevenire le forme severe di COVID-19, l'ospedalizzazione e la morte ed i benefici superano i rischi a dispetto dei rari eventi avversi che sono stati registrati (31).

Alla fine del 2021 si registravano circa 100 differenti vaccini sviluppati, 26 in clinical trials di fase III, 17 autorizzati all'uso almeno in un paese e 2 sotto valutazione.

I principali vaccini sviluppati sono stati: **a)** a RNA messaggero (mRNA), **b)** vaccini a vettore virale (AVV), **c)** a proteina o subunità inattivata.

I vaccini:

a) Sono stati sviluppati con una metodica nuova ma non sconosciuta. Risale infatti al 1990 la prima iniezione in un modello murino di mRNA che provò la fattibilità di questa metodica come vaccino (32). L'instabilità dell'mRNA, l'alto grado di immunogenicità e il trasporto ai tessuti erano stati individuati come i principali ostacoli da affrontare.

I vaccini contro il SARS-CoV-2 BNT162b2 e mRNA-1273 sono stati primi vaccini a mRNA ad essere autorizzati. Contengono mRNA dell'antigene di interesse che, una volta entrato nella cellula target, viene tradotto nella proteina S per indurre la risposta immunitaria. Il protocollo di somministrazione prevede 2 dosi a distanza di 21 giorni e una terza a distanza di 3 mesi.

L'efficacia di protezione verso l'infezione da SARS-CoV-2 originario è risultata del 90% a 5-6 mesi di follow-up dopo la seconda dose.

Il vaccino mRNA-1273 dimostrò un'efficacia più bassa pari al 48%.

b) Sono dei sistemi di delivery contenenti acidi nucleici codificanti un antigene. AZD1222, Ad5-nCoV e Sputnik V mostrarono un'efficacia tra il 65 e 91.6% contro il SARS-CoV originario. AZD1222 mostrò un'efficacia del 46% verso la variante alfa mentre scende al 10% contro la variante beta in Sud Africa.

c) Rientrano in questo gruppo i vaccini che sono dati da virus integri che però non possono infettare le cellule, né replicare. Le subunità vaccinali sono date da frammenti di proteine o polisaccaridi (33). NVX-CoV2373 mostrava un'efficacia del 89% verso il SARS-CoV-2 originario, del 86% verso la variante alpha e del 60% verso la beta.

In tabella 4 sono riassunti i principali vaccini sviluppati.

Tabella 4.

Phase III trials for coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines

Vaccine	Author	Study population	Cut-off date	Main endpoint	Symptomatic COVID-19			Severe COVID-19			Hospitalization	Any unsolicited serious adverse event	
					Vaccine	Placebo	Efficacy (%; 95%CI)	Cases among vaccine group	Cases among placebo group	Efficacy (%; 95% CI)		Vaccine	Placebo
BNT162b2 (RNA-based)	Polack et al. [14]	USA, Argentina, Brazil, Germany, S. Africa, Turkey ≥16 years	27th July 2020 to 14th November 2020 Median follow-up: 2 months	After dose 1 After dose 2 COVID-19 with onset at least 7 days after the second dose without prior infection	50/21 314 8/18 198	275/21 258 162/18 325	82% (75.6 to 86.9) 95% (90.3 to 97.6)	0 1	4 4	88.9% (20.1 to 99.7) 75% (-152.6% to 99.5%)	NA NA	0.6% 0.6%	0.5% 0.5%
	Thomas et al. [15]		27th July 2020 to 13th March 2021 6 months follow-up	After dose 2 COVID-19 with onset at least 7 days after the second dose without prior infection	77/20 998	850/20 713	91.3% (89.0 to 93.2)	1	23	95.7% (73.9 to 99.9)	NA	1.2%	0.7%
	Frenck et al. [16]	USA 12–15 years	15th October 2020 to 12th January 2021 2 months follow-up	After dose 2 COVID-19 with onset at least 7 days after the second dose without prior infection	0/1005	16/978	100% (75.3 to 100)	0	0	No cases of severe COVID-19 were observed	NA	0.4%	0.1%
mRNA-1273 (RNA-based)	Baden et al. [17]	USA ≥18 years	27th July 2020 to 21st November 2020 Median follow-up of 64 days	After dose 1 After dose 2 COVID-19 with onset at least 14 days after the second dose without prior infection	7/996 11/14 134	39/1079 185/14 075	80.2% (55.2 to 92.5) 94.1% (89.3 to 96.8)	NA 0	NA 30	NA 100% (no CI estimated)	NA 3 in the placebo group and 1 in the vaccine group	NA 0.6%	NA 0.6%
	El Sahly et al. [18]	US ≥18 years	26th March 2020 Median follow-up of 5.3 months post dose 2	COVID-19 with onset at least 14 days after the second dose without prior infection	55/14 287	744/14 164	93.2% (91 to 94.8)	2	106	98.2%	NA	0.7%	0.6%
CvCoV (RNA-based)	CureVac press communication [19]	Argentina, Belgium, Colombia, Dominican Republic, Germany, Mexico, Netherlands, Panama, Peru, Spain	Estimated completion date: 15th May 2022	COVID-19 of any severity	40 000 adults 83 cases among the vaccine group 145 cases among the placebo group		48%	9	36	77% against moderate and severe disease	0 hospitalizations among the vaccine group 6 hospitalizations among the placebo group	Ongoing	Ongoing
AZD1222 (Non-replicating viral vector ChAdOx1 nCoV-19 vaccine)	Emary et al. [20]	UK	1st October 2020 to 14th January 2021 Median follow-up: not provided	Symptomatic COVID-19 with onset at least 14 days after the second dose without prior infection	59/4244	210/4290	Alpha: 70.4% (43.6 to 84.5) Non-VOC lineages: 81.5% (67.9 to 89.4)	NA	NA	NA	There were no cases of hospitalization or death	NA	NA
	Voysey et al. [21]	UK/Brazil/South Africa ≥18 years	23rd April 2020 to 7th December 2020 Median follow-up post dose 2: 53 -90 days according to the dose gap	Symptomatic COVID-19 with onset at least 14 days after the second dose without prior infection	84/8597	248/8581	66.7% (57.4% to 74%)	0	15	Efficacy against hospitalization from 22 days after vaccination: 100%	2 hospitalizations among the vaccine group 22 hospitalizations among the placebo group	0.7%	0.8%
	Madhi et al. [22]	South Africa ≥18 years	24th June 2020 to 9th November 2020 Median follow-up post dose 2: 156 -121 days	Mild to moderate COVID-19 with onset at least 14 days after the second dose without prior infection	19/750	23/717	21.9 (-49.9 to 59.8)	0	0	No participant had severe COVID-19	Zero hospitalizations	14 events	13 events

T. Falder et al. / Clinical Microbiology and Infection 26 (2022) 202–221

1.9 La teoria del network idiotipico e l'infezione da SARS-CoV-2

La patogenesi della sindrome acuta respiratoria da SARS-CoV-2 non è ancora completamente chiarita così come gli effetti multiorgano e la sindrome long-COVID che si sviluppa dopo la risoluzione dell'infezione. Lo sviluppo di vaccini è stato un passaggio critico nel controllo della pandemia e nella prevenzione della malattia grave, ma la loro efficacia in termini di prevenzione dell'infezione è risultata limitata con la comparsa di nuove varianti virali. Nel corso del tempo si sono registrate rare reazioni avverse associate alla vaccinazione che possono andare da reazioni allergiche a miocarditi e trombosi immunomediate in soggetti adulti sani. Nella maggior parte dei casi gli effetti collaterali sono associati a complesse reazioni immunomediate. Al fine di comprendere a fondo la diversità, la complessità e l'intensità della risposta immunitaria, in grado di generare nella popolazione generale adulta simili reazioni, è necessario investigare utilizzando la lente della risposta immunitaria anti-idiotipo. La network ipotesi è stata formulata nel 1974 da Niels Kaj Jerne (34) e descrive per la prima volta la produzione di anticorpi anti-idiotipo.

Si basa sull'idea che il sistema immunitario instaura una memoria a seguito di stimolazione interna e non esterna. La ricombinazione V(D)J dei recettori TCR e BCR posti, rispettivamente, sulla superficie dei linfociti T e B, porta a formare una sequenza immunogenica chiamata idiotipo; questa sequenza è capace di indurre la produzione di specifici anticorpi anti-idiotipo come se fossero antigeni. I linfociti idiotipo-specifici sono attivamente regolati come i linfociti antigene-specifici: in questo modo la regolazione idiotipica è un meccanismo di tolleranza immunologica. Questa tipologia di anticorpi è prodotta dall'ospite in risposta alle immunoglobuline, rilasciate dalle plasmacellule nei confronti di qualunque antigene. Interagendo con le immunoglobuline, gli anticorpi danno origine ad un complesso così formato: antigene-anticorpi primari-anticorpi anti-idiotipo. È possibile osservare l'alterazione del network idiotipico quando si ha una cross-reattività tra anticorpo anti-idiotipo e anticorpo anti-antigene non self e anticorpo verso antigene self che condivide idiotipo con conseguente stimolazione. Questo fenomeno causa cicli di stimolazione e soppressione che possono essere avviati/mantenuti da qualunque ulteriore stimolazione antigenica esterna. Trasferendo quindi queste nozioni nella patogenesi del long COVID e nelle rare reazioni avverse alla vaccinazione, alla produzione di anticorpi anti-SARS-CoV-2 (anti-Spike protein) potrebbe far seguito l'elaborazione da parte dell'ospite di anticorpi anti-idiotipo. Questi ultimi sarebbero caratterizzati da una specularità antigenica nei confronti degli epitopi virali e il sistema immunitario si troverebbe di fronte nuovamente ai medesimi stimoli antigenici, creando un circolo vizioso con ondate di anticorpi anti-SARS ed anti-idiotipo che sarebbero in grado di legarsi a loro volta ad ACE2. Il legame potrebbe, in teoria, indurre numerosi differenti effetti sulle cellule che non sono mutualmente esclusivi ma dipendenti dalla natura degli anticorpi anti-idiotipo e dal ruolo del recettore su quel tipo particolare di cellula: per esempio, potenzialmente, potrebbero bloccare la funzione di ACE2 oppure, alternativamente, potrebbero stimolarne la funzione attraverso il trigger del recettore o ancora modularne l'espressione in superficie attraverso il legame e la conseguente internalizzazione. Ancora, potrebbe indurre sulla cellula target esprimente ACE2, una risposta mediata dal complemento oppure fenomeno di killing da parte del sistema immunitario.

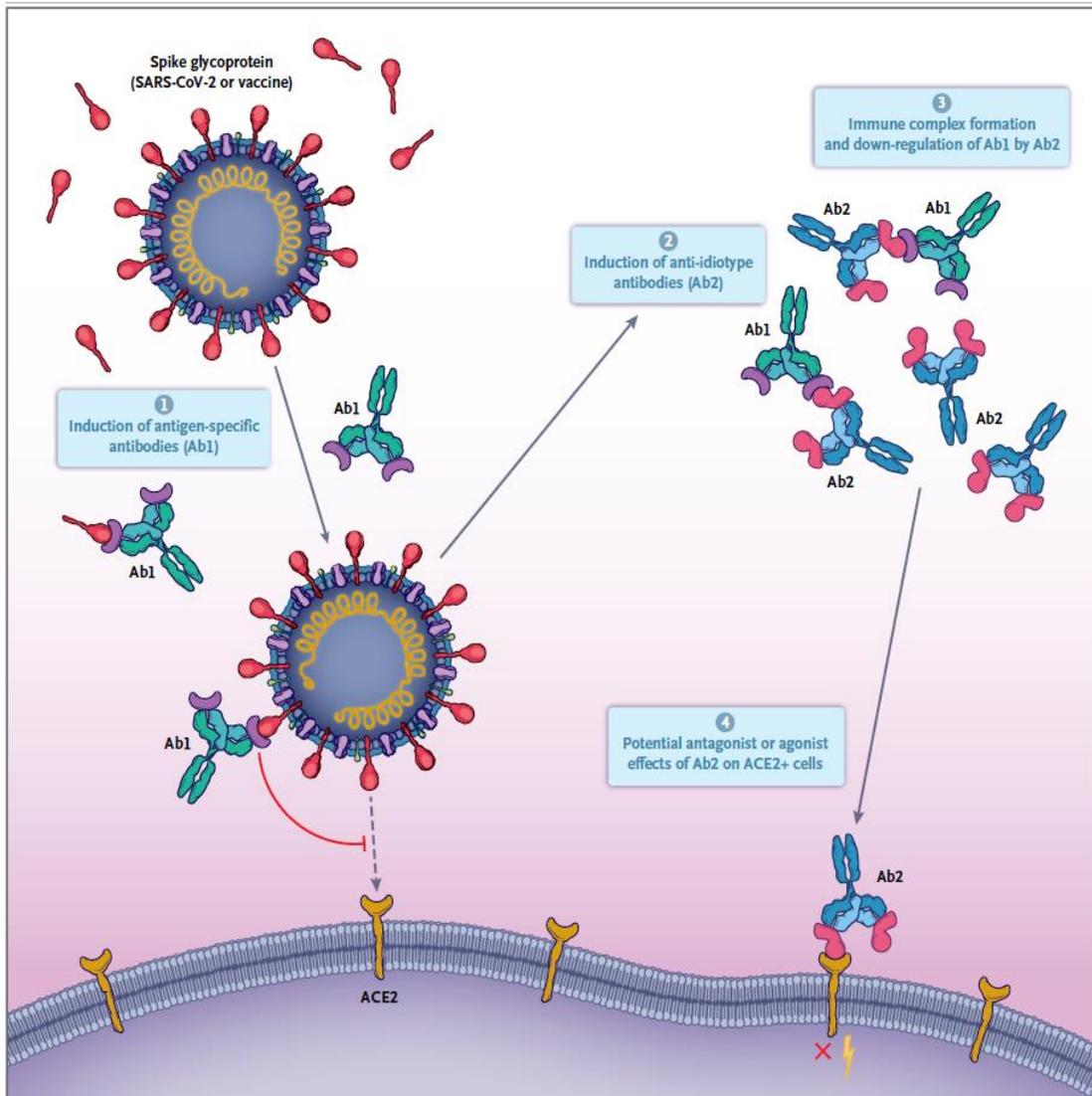


Figura 9. Sia durante l'infezione da SARS-CoV-2 che a seguito della vaccinazione anti-SARS-CoV-2, si rilasciano anticorpi contro la proteina Spike del virus. La proteina Spike si lega al recettore ampiamente espresso per l'angiotensina 2 (ACE2) sulla cellula target. Gli anticorpi anti-Spike vengono chiamati Ab1. La porzione di Ab1 che lega e neutralizza la proteina Spike ha delle distinte sequenze nella regione CDR3 e queste regioni, leganti l'anticorpo, possono esse stesse produrre una risposta anticorpale chiamata anti-idiotipo (Ab2). Gli anticorpi anti-idiotipo (Ab2) possono agire principalmente in due modi: possono legarsi agli anticorpi neutralizzanti (Ab1) inducendo la formazione di immunocomplessi rendendo quindi Ab1 inefficace oppure legarsi allo stesso target della proteina Spike, cioè ACE2.

2 LA PRODUZIONE DI AUTOANTICORPI A SEGUITO DI INFEZIONE DA SARS-CoV-2 E A SEGUITO DI VACCINAZIONE ANTI-SARS-CoV-2

La formazione di nuovi epitopi che determinano nuovi target per la formazione di autoanticorpi ha un ruolo importante nell'ipotesi dell'autoimmunità (35).

2.1 Anticorpi anti-ACE2

L'infezione virale da SARS-CoV-2 provoca patologie respiratorie gravi come la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) simile a quella causata dal SARS-CoV (sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus). Sia SARS-CoV-2 che SARS-CoV utilizzano lo stesso recettore, l'ACE2 (enzima di conversione dell'angiotensina-2) per infettare le cellule. L'ACE2 è uno degli enzimi centrali nel sistema renina-angiotensina (RAS) che regola la pressione arteriosa, l'equilibrio elettrolitico e le resistenze vascolari sistemiche. È espresso nel polmone e in molti altri tessuti tra cui il cervello, i reni, il tratto gastrointestinale e il tessuto adiposo. ACE2 è un omologo dell'ACE e svolge un ruolo chiave nel bilanciamento delle risposte provocate dall'ACE. Nei polmoni, l'attivazione del RAS locale può influenzare la patogenesi del danno polmonare attraverso meccanismi multipli, come un aumento della permeabilità vascolare e alterazioni delle cellule epiteliali alveolari. L'attivazione del RAS polmonare coinvolge la renina, l'enzima iniziale della cascata di attivazione RAS; la renina scinde l'angiotensinogeno generando angiotensina I (Ang I, un ormone decapeptide, inattivo). L'ACE converte l'Ang I ad angiotensina II (Ang II, un ormone octapeptide), molto attivo, che esercita effetti vasoattivi legandosi ai suoi recettori, di tipo I (AT1) e tipo II (AT2) (36). L'ACE2 idrolizza l'Ang I generando Ang-(1-9), l'Ang II genera Ang-(1-7), che si lega al Mas (Mas è un recettore endogeno, accoppiato alla fosfolipasi C, ed è espresso in vari organi come cuore, vasi, testicoli e cervello) per svolgere il suo ruolo principale, quello di antagonizzare molti degli effetti mediati dall'Ang II. Attualmente è noto che il virus SARS-CoV-2, attraverso il recettore ACE2 entra nella cellula ospite causando, così, un danno cellulare diretto e il rilascio di mediatori dell'infiammazione e di fattori pro-coagulanti che si assocerebbero alla tempesta di citochine. Alti livelli di interleuchine, di fattori di necrosi tumorale e di interferone si sono osservati in pazienti con microtrombosi e coagulazione intravascolare disseminati (CID). Il danneggiamento

dell'enzima ACE2, causato dall'ingresso del virus, potrebbe influire sul funzionamento del sistema renina-angiotensina e la presenza di recettori ACE2 a livello renale spiegherebbe la grave disfunzione renale evidenziata nei soggetti affetti (37-38).

In aggiunta, ad opera di una disintegrina e di una metalloproteasi (ADAM17 e TASE, rispettivamente) avviene il clivaggio di ACE2 dalla superficie cellulare determinando la forma solubile, enzimaticamente attiva definita ACE2s (39).

Se l'incremento dei livelli plasmatici di ACE2s solubile sia patologico o fisiologico non è stato ancora chiarito. Recentemente, invece è stato dimostrato come ACE2s sia in grado di facilitare l'infezione da SARS-CoV-2 (40-41).

È stato inoltre postulato che in soggetti con alti livelli di ACE2s solubile possa avvenire il legame tra la proteina virale Spike e ACE2s ed il complesso ACE2-Spike potrebbe essere endocitato. L'intero complesso proteina virale-ACE2 sarebbe enzimaticamente clivato con la formazione di nuovi epitopi che indurrebbero a loro volta la formazione di nuovi anticorpi. In questa situazione gli autoanticorpi potrebbero avere come target sia ACE che ACE2 portando a infiammazione grave, soprattutto a livello delle cellule endoteliali polmonari. A supporto di questo, numerosi lavori scientifici hanno dimostrato elevati livelli sierici di ACE2 in pazienti COVID-19 con quadro clinico severo (42). In ultima analisi, il 42% di omologia di ACE2 con ACE potrebbe quindi significare che nuovi anticorpi formati contro ACE2 potrebbero cross reagire con ACE.

2.2 Anticorpi anti-fattore piastrinico 4

Gli anticorpi contro il complesso eparina/fattore piastrinico 4 sono noti per essere coinvolti nell'induzione di trombocitopenia indotta da eparina per effetto dell'attivazione piastrinica, definita come HIT.

La loro determinazione può aiutare a confermare la diagnosi di HIT, che si basa principalmente su criteri clinici. I metodi utilizzati per determinarli sono sia funzionali (o di attivazione) sia immunologici (43). I test funzionali utilizzano piastrine da donatore, lavate e incubate con eparina e siero del paziente. Il test di rilascio di serotonina è considerato il "gold standard" per caratterizzare gli anticorpi della HIT, ma è complesso e comporta la marcatura piastrinica con composti radioattivi. Test di routine meglio disponibili sono il test di attivazione piastrinica indotta da eparina (HIPA), il test in chemiluminescenza valutati con aggregometro e i test citofluorimetrici di generazione di

microparticelle o dell'espressione di annessina V. I test immunologici usano antigeni target legati a superfici (complessi PF4/eparina o PF4/polivinilsulfato). Il test più utile nel work-up diagnostico dei pazienti con sospetta HIT è il test di agglutinazione al gel. Questi test sono rapidi e ampiamente disponibili, ma mancano di specificità. Risultati falsamente positivi si hanno fino al 2% nei controlli normali, al 4% in donne in gravidanza e all'8% in malati non esposti ad eparina. Inoltre, dal 30% al 50% dei pazienti in terapia eparinica sviluppano tali anticorpi senza avere segni clinici o laboratoristici di HIT.

Nel periodo pandemico, a seguito dell'approvazione per l'uso sulla popolazione generale del vaccino anti-SARS-CoV-2 AVV non replicante, si è accesa l'attenzione sugli anticorpi anti-PF4. Rari casi di trombosi venosi cerebrali, in giovani pazienti che avevano ricevuto un vaccino anti-SARS-CoV-2 a AVV sono stati associati alla presenza di anticorpi anti-PF4, da qui la definizione di VITT (Vaccine-Induced immune Thrombotic Thrombocytopenia; immuno trombocitopenia vaccino-indotta) (44).

La VITT è caratterizzata da alti livelli di immunoglobuline IgG nel plasma dei pazienti in grado di legarsi al complesso PF4/polyanione inducendo attivazione piastrinica. Di interesse è, quindi, la comprensione del meccanismo fisiopatologico per mezzo del quale si sviluppa la VITT.

Si suppone un meccanismo multistep che coinvolge sia il AVV che le neo sintetizzate proteine Spike che prevede: 1) diffusione rapida nel circolo sanguigno; 2) la diffusione indurrebbe la produzione precoce di alti livelli di IL-6; 3) interazione di eritrociti, piastrine, mast-cells e endotelio; 4) favorisce la presenza di DNA extracellulare a livello del sito di iniezione; 5) attivazione delle piastrine e mast-cells a seguito del rilascio di PF4 e/o somministrazione di eparina. Inoltre, l'infezione delle mast-cells da parte di AVV potrebbe indurre aberrante risposta infiammatoria. La presenza naturale di anticorpi anti-PF4/eparina potrebbe amplificare l'attivazione piastrinica e gli eventi trombotici.

Infine, la neo sintetizzata proteina Spike, interagendo con ACE2 su endotelio, linfociti e piastrine potrebbe triggerare ulteriori eventi trombotici scatenando la VITT (45).

In particolare, Huyand A. e colleghi (46) hanno descritto il ruolo di 8 amminoacidi che sono coinvolti nel legame tra anticorpi e complesso PF4 (Arg22, His23, Glu28, Lys46, Asn47, Lys50, Lys62 e Lys66) suggerendo che il sito di legame sia specifico di PF4. 4 degli 8 amminoacidi compresi nell'epitopo VITT corrispondevano ad amminoacidi su PF4 ai quali si lega l'eparina (Arg22, His23, Lys46 e Lys66) (Figura 10).

3 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo principale del mio lavoro, condotto durante il periodo di tirocinio, è stato quello di contribuire alla messa a punto, in urgenza, del metodo di identificazione e studio del coinvolgimento degli anticorpi anti-PF4 nei pazienti che manifestavano effetti avversi trombotici a seguito di vaccinazione anti-SARS-CoV-2 di tipo adenovirale inattivato (AVV). L'esigenza si è presentata improvvisamente nel mese di giugno 2021, nella nostra regione, come in tutto il resto d'Italia e nelle nazioni che hanno adottato un piano vaccinale comprendente vaccini AVV. La sfida è partita dall'importanza che, in quei giorni di emergenza, è stata attribuita alla ricerca di anticorpi anti-PF4 e, dall'evidenza che il metodo utilizzato in routine per la determinazione degli anticorpi anti-PF4 a scopo diagnostico per le HIT, risultava avere performance analitiche non idonee (bassa sensibilità). Tale importanza risultava evidente dalla flowchart definita per il Sistema Sanitario Regione Liguria da ALISA; si richiedeva, infatti, ai clinici di attenersi ad essa in caso di pazienti sospetti secondo quanto stabilito: "...In caso di riscontro di trombosi in sedi atipiche e piastrinopenia, al fine di confermare il sospetto di VITT, dovrà essere eseguito prelievo ematico da inviare a laboratorio specialistico di riferimento per la ricerca successiva di anticorpi anti-PF4". Il lavoro ha comportato una veloce acquisizione dei dati di recentissima letteratura per arrivare all'applicazione immediata di quanto appreso, allo scopo di identificare e rendere performante il metodo di dosaggio più sensibile e specifico possibile per la ricerca degli autoanticorpi anti-PF4 a scopo diagnostico per la VITT.

I pazienti identificati come affetti da VITT sono rientrati, inoltre, in uno studio che si propone di valutare la possibile influenza degli anticorpi anti-ACE2 in pazienti con manifestazioni cliniche imputabili a rare forme di effetti avversi a seguito di vaccinazione anti-SARS-CoV-2 e in pazienti con forme severe di COVID-19 a seguito di infezione da SARS-CoV-2.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Pazienti

La valutazione degli anticorpi anti-PF4 è stata effettuata su campioni di plasma in sodio citrato di n° 91 pazienti che afferiti al Pronto Soccorso di diversi Ospedali della Regione Liguria (Ospedale Policlinico San Martino di Genova, Ospedale di Lavagna, Ospedale di Imperia, Ospedale San Paolo Savona, Ospedale di La Spezia, Ospedali ASL3, Ospedali Galliera Genova), sono giunti presso il Laboratorio di Autoimmunologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova per la valutazione dell'eventuale presenza di anticorpi anti-PF4 per sospetta VITT.

N°25 campioni rispettavano pienamente i criteri stabiliti dalla flowchart definita da ALISA (vedi Figura 11) per sospetta VITT, mentre per altri N°66 pazienti soddisfavano i criteri in flowchart solo parzialmente.

Sono stati, inoltre, arruolati 25 sieri di donatori sani provenienti dalla banca del sangue locale per la verifica finale della specificità del test.

Tutti i campioni sono stati aliquotati e conservati a -20°C fino all'utilizzo.

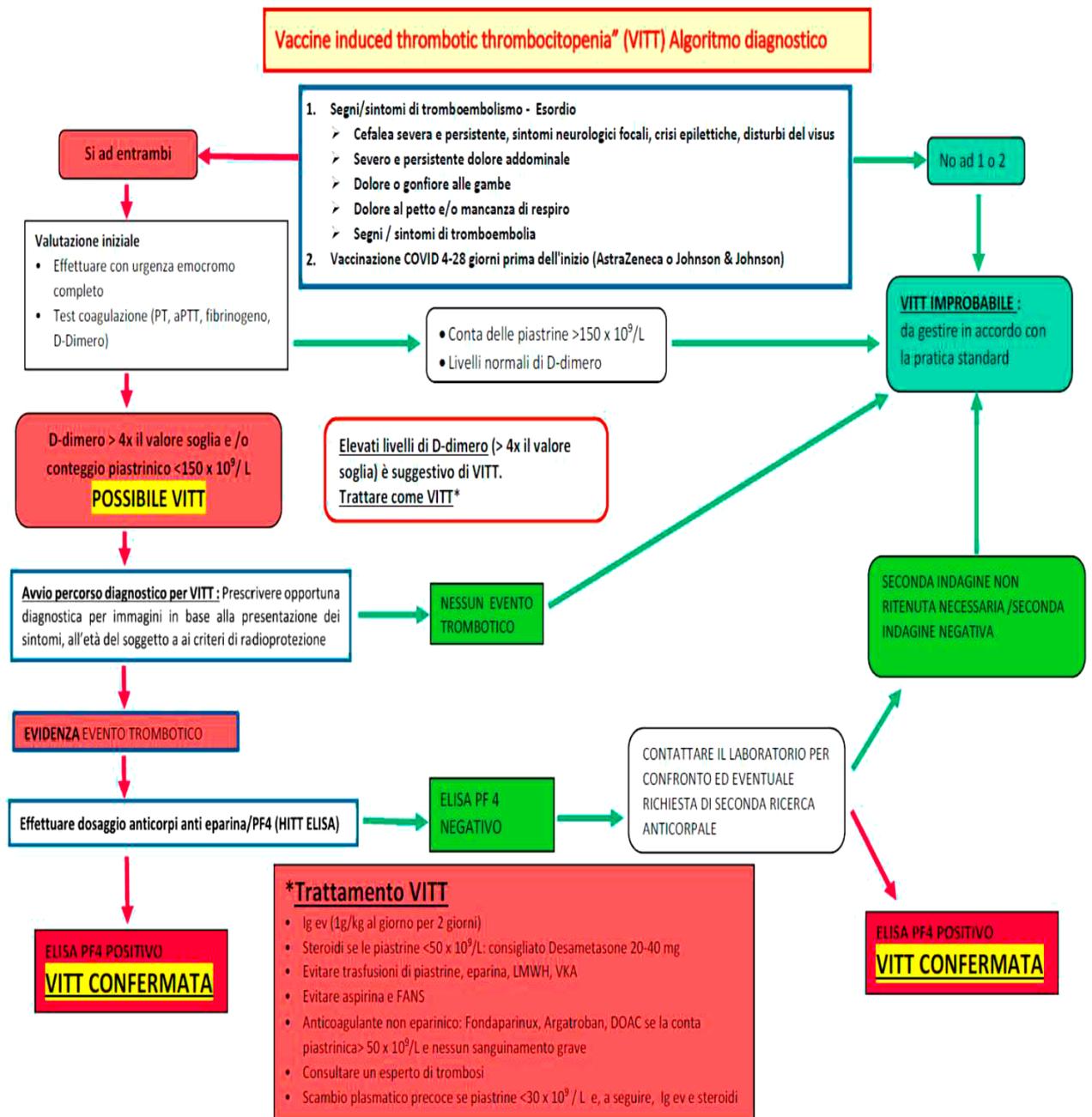


Figura 11. Flow-chart ALISA per sospetta VITT.

Per lo studio “ACE” sono stati arruolati ad oggi n°40 pazienti (16 femmine, 24 maschi) che afferivano presso il Policlinico San Martino per ricovero o follow-up per reazioni neurologiche a seguito di infezione da SARS-CoV-2 o a seguito di apparente reazione avversa a vaccinazione. Per tutti i pazienti arruolati, anche per questo studio, sono stati raccolti 2 mL di plasma che sono stati conservati a $-20^{\circ}C$ fino all'utilizzo.

4.2 Valutazione anticorpi anti-PF4

Test in chemiluminescenza

Il test in chemiluminescenza per la valutazione degli anticorpi anti-PF4 si basa sul meccanismo di attivazione delle piastrine. È il test comunemente scelto per la routine per l'identificazione di pazienti affetti da HIT. Il test si basa sul principio che nanoparticelle di polistirene rivestite di anticorpi monoclonali murini anti-PF4/eparina agglutinano quando miscelate con complesso di PF4/polivinilsulfonato (PVS) e la reazione induce un'alta assorbanza. L'aggiunta di un plasma negativo per anti-PF4 non determina, oppure determina ma in minima misura, l'effetto di inibizione dell'agglutinazione. Al contrario, l'aggiunta di plasma derivante da un paziente con anticorpi anti-PF4 determina l'inibizione dell'agglutinazione. L'osservazione di nessuno o minimo incremento dell'assorbanza indica un test positivo.

Lo strumento calcola in automatico la curva di concentrazione degli anticorpi per mezzo dell'interpolazione della curva di calibrazione, dove la concentrazione degli anticorpi nel plasma risulteranno essere inversamente proporzionali all'aumento dell'assorbanza.

La concentrazione è espressa in unità arbitraria per millilitro (U/mL) ed il test risulta positivo per valori uguali o superiori a 1 U/mL (47).

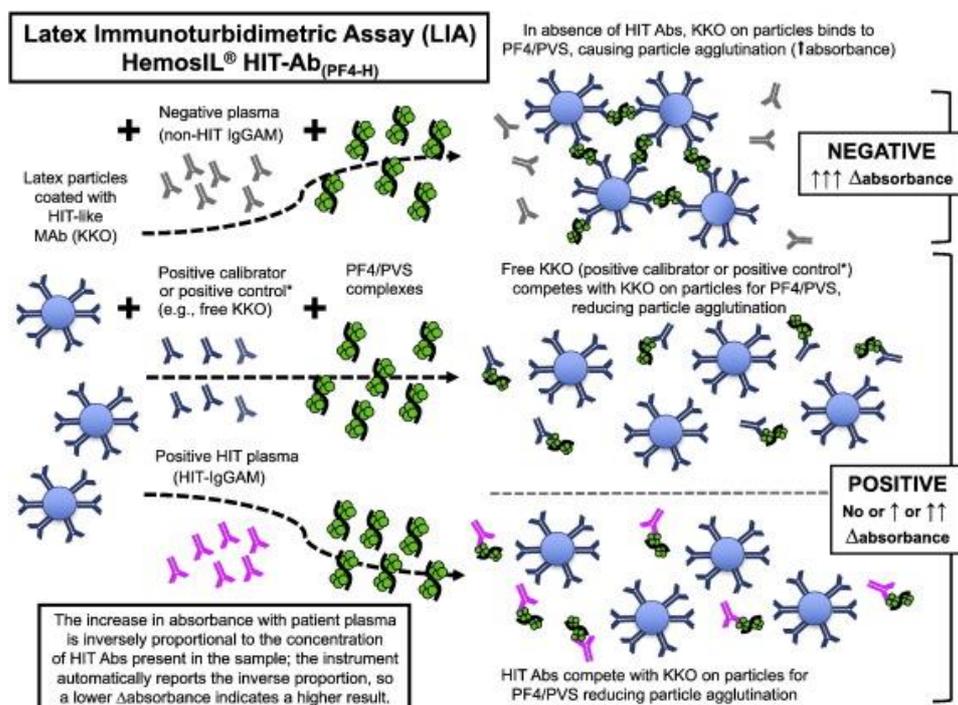


Figura 12. Principio su cui si basa il test CLIA utilizzato per la valutazione degli anticorpi anti-PF4 in pazienti HIT (47).

ELISA test

Al fine di valutare qualitativamente la presenza nel siero, di pazienti e controlli, degli anticorpi di classe IgG anti-PF4 a scopo di identificare pazienti affetti da VITT, è stato scelto e utilizzato il kit ASSERACHROM HPIA-IgG (STAGO).

In breve, il plasma dei pazienti in cui si suppone siano presenti gli anti-PF4 viene messo a contatto con un complesso eparina-PF4 coattato in piastra. Successivamente, l'anticorpo secondario IgG accoppiato ad una perossidasi si legherà al determinante antigenico dell'eventuale anticorpo anti-PF4. Il saggio viene, poi, rivelato dall'azione di un substrato, il TMB, e la reazione viene bloccata con un agente fortemente acido. L'intensità del colore sviluppato sarà letta da apposito lettore a 450 nm e correlata al livello di anticorpi sulla base della curva di calibrazione. Si è stabilito di partire con una diluizione del plasma di 1:101 e di eseguire i dosaggi in doppio come raccomandato.

Poiché l'esecuzione del test non è automatizzabile ma eseguita totalmente in manuale e data la delicatezza del responso, si è proceduto all'esecuzione del test in presenza di 2 operatori e secondo la seguente procedura:

- Disegnare lo schema della piastra da seguire durante l'esperimento;
- Diluire 1:101 il plasma dei pazienti da analizzare e il plasma del siero positivo interno di controllo;
- Ricostituire gli standard della curva e controlli positivi e negativi ed attendere almeno 30' a temperatura ambiente (RT) prima dell'uso;
- Trascorsi 30' aggiungere nei rispettivi pozzetti il bianco che sarà dato da 200 uL di solo buffer, 200 uL degli standard ricostituiti, 200 uL di plasma diluito dei singoli pazienti e controlli;
- Coprire la piastra ed incubare per 1h a temperatura ambiente;
- Trascorsi i primi 30' di incubazione ricostituire il Reagente 2, contenente anticorpo secondario legato a perossidasi, con buffer e lasciare riposare fino al termine dell'incubazione a RT;
- Trascorsa 1h di incubazione si procede a lavare la piastra 5 volte con l'apposito buffer di lavaggio;
- Terminato il lavaggio si tampona la piastra per asciugare bene i pozzetti e si aggiungono 200 uL del Reagente 2 in ogni pozzetto;

- Si procede ad incubazione di 1h;
- Trascorsa 1h di incubazione si procede a lavare la piastra 5 volte con apposito buffer di lavaggio;
- Si procede, quindi, ad aggiungere 200uL di TMB in ogni pozzetto e si attende 5';
- Trascorsi i 5 minuti si aggiungono 50 uL di acido solforico 1M e si attende 15';
- Si procede alla lettura della piastra misurando l'assorbanza a 450nm entro 1 h.

La lettura deve essere aggiustata sulla lettura del bianco, le densità ottiche (OD) dei controlli positivi e negativi devono rispettare i limiti lotto dipendenti indicati dal kit.

Qui di seguito un esempio di schema della piastra utilizzata per la valutazione della presenza di anticorpi anti-PF4.

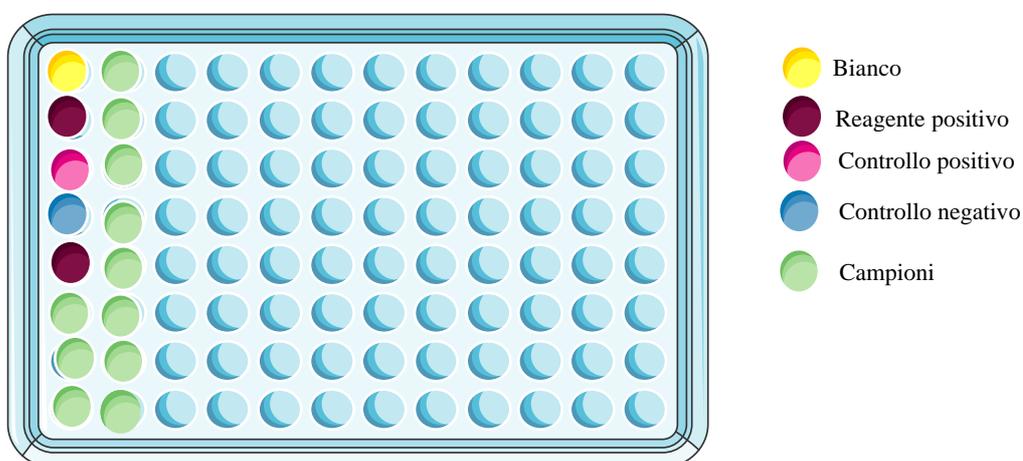


Figura 13. Schema piastra per test ELISA.

4.3 Test di funzionalità per conferma VITT

Il test di funzionalità prevede l'incubazione del siero precedentemente diluito (come descritto nel paragrafo precedente) con eparina a concentrazioni pari a 100, 90, 60 U/mL per 15' (48). Trascorso il tempo necessario, si procede all'esecuzione del test ELISA per identificazione di anticorpi anti-PF4 come precedentemente descritto.

Il risultato atteso per confermare un caso di VITT è la riduzione di almeno il 50% delle OD. In caso di HIT non si osserva tale riduzione.

4.4 Valutazione anticorpi anti ACE2.

L'esecuzione del test per la valutazione degli anticorpi di classe IgG anti-ACE2 prevede l'utilizzo del kit Cell Trend Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2)-EIA (Cell Trend GmbH).

In breve, l'enzima ACE2 si trova adeso ai pozzetti della micropiastra fornita dal kit. Durante la prima incubazione, gli anticorpi anti-ACE2 presenti nel plasma dei campioni si andranno a legare all'ACE2 rimanendo quindi immobilizzati sulla piastra. Verranno, quindi, rilevati da anticorpi anti-IgG secondari legati a perossidasi. La successiva reazione con substrato TMB indurrà una rilevazione colorimetrica che correlerà con la concentrazione degli anticorpi anti-ACE2.

Per l'esecuzione del test si procede quindi:

- Portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente;
- Disegnare lo schema della piastra;
- Diluire i campioni 1:100 con buffer di diluizione;
- Aggiungere 100 uL di campione, standard e controlli negli appositi pozzetti, sigillare la piastra ed incubare 2h a 4°C;
- Lavare la piastra 3 volte con 300 uL di buffer di lavaggio precedentemente diluito 1:10 in acqua distillata;
- Aggiungere ad ogni pozzetto 100 uL di anticorpo secondario marcato con perossidasi;
- Sigillare la piastra ed incubare 1 h a temperatura ambiente in lieve agitazione;
- Lavare la piastra 3 volte con 300 uL di buffer di lavaggio;
- Dispensare 100 uL di substrato TMB in ogni pozzetto;
- Incubare 20' al buio;
- Aggiungere 100 uL di soluzione di stop ad ogni pozzetto e procedere alla rilevazione dell'assorbanza a 450nm entro 20 minuti.

4.5 Statistica

Per la valutazione statistica dei dati è stato utilizzato il software JMP. È stato usato il test non parametrico Wilcoxon per confronto tra gruppi di pazienti. I valori statisticamente significativi sono stati così indicati: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5 RISULTATI

5.1 Analisi della presenza di anticorpi anti-PF4 in pazienti con sospetto di VITT

A partire dal mese di giugno 2021 ad oggi sono pervenuti presso il Laboratorio di Autoimmunologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova, 91 campioni di plasma al fine di valutare l'eventuale presenza di anticorpi anti-PF4 per sospetta VITT. Le provette sono state prelevate da pazienti giunti al Pronto Soccorso di diversi Ospedali della Regione Liguria e, in base alla flowchart ALISA (vedi Figura 11) dovevano avere, in breve: effettuato la vaccinazione anti-SARS-CoV-2 di tipo AVV nei 21 giorni precedenti i sintomi, n° piastrine (PLT) $<150 \times 10^9/L$, valori sierici di D-dimero 4 volte il valore limite massimo, segni radiologici di trombosi. Il risultato del test e la tempistica di esecuzione, come da flow-chart, è di fondamentale importanza per il clinico per poter inserire il paziente nel corretto percorso diagnostico/terapeutico. In 66 casi il clinico ha prescritto il test anche se i criteri non erano completamente soddisfatti ma sulla base di una forte suggestione delle manifestazioni cliniche da indurre sospetto VITT.

Il primo campione giunto al laboratorio è stato, in prima istanza, valutato per la presenza di anti-PF4 attraverso la metodica in chemiluminescenza, considerata fino a quel momento specifica in caso HIT per identificazione dei suddetti anticorpi. Il campione è risultato negativo benché il quadro clinico fosse fortemente suggestivo di VITT.

Si è quindi proceduto, in urgenza, a valutare l'uso e l'appropriatezza di un metodo alternativo per la valutazione della presenza nel plasma di anticorpi anti-PF4 sulla base dei dati internazionali che stavano emergendo in letteratura in quello stesso periodo.

La scelta è stata orientata verso il test ELISA (ASSERACHROM IgG, Stago) sebbene da letteratura è noto non avere performance ottimali per HIT, per cui il gold standard rimane la chemiluminescenza. La collaborazione stretta tra il laboratorio e i clinici è stata di fondamentale importanza per l'identificazione del metodo di dosaggio opportuno. Il laboratorio ha operato in stretto contatto con i clinici anche successivamente e, sulla base di evidenze internazionali di rarissimi casi ai quali la diagnosi di VITT si associava a negatività per IgG anti-PF4 ma positività IgM o IgA, si è concordato che tutti i test con risultato negativo per cui il sospetto clinico continuava ad essere molto forte, si procedesse anche alla successiva analisi per la ricerca di immunoglobuline anti-PF4 di isotipo A e M.

Inoltre, le positività per anti-PF4 riscontrate sono state confermate effettuando anche test di funzionalità piastrinica per differenziarle da eventuale HIT.

La positività IgG per anti PF4 si è riscontrata in 3 pazienti su 91. Tutti i plasmi risultati positivi per anti-PF4, valutati in presenza di eparina alla concentrazione di 100, 90, 60 U/mL (48) mostravano una riduzione della positività al test di funzionalità >50%. Tale risultato confermava la positività al test ed andava a supportare il quadro diagnostico di VITT. In nessun caso abbiamo avuto riscontro di positività IgM e IgA in pazienti IgG negativi, mentre i 3 pazienti con positività IgG, hanno dato riscontro di positività anche per anti-IgM e IgA.

In tabella 5 i dati demografici dei pazienti arruolati.

Tabella 5. Dati demografici della popolazione per sospetta VITT.

N° Pazienti (91)	Maschi (47)	Femmine (44)
Età	60,09	58,75
Linfociti %	17,9	16,9
Neutrofili%	68,22	84,11
Monociti %	6,52	6,91
Piastrine	168	157,28
INR (s)	1,13	1,17
PAPTT(s)	35,6	36,08
Fibrinogeno	3,71	3,59
D-Dimero	3598	7100
ANTI-PF4	0	3

Tutti i 3 pazienti affetti da VITT e positivi per anti-PF4 erano femmine con media dell'età 28 ± 8 anni e 2/3 sono decedute.

Sono, quindi, stati analizzati alcuni parametri ematologici quali percentuale di linfociti e monociti e confrontati con quanto osservato nei pazienti sintomatici anti-PF4 negativi.

Come mostrato in Figura 13 (Pannello A, B, C) è stato evidenziato un incremento statisticamente significativo della percentuale dei neutrofili circolanti (* $p=0.044$) nei pazienti HIT rispetto ai pazienti non confermati. Un trend all'incremento nella percentuale dei neutrofili, invece, è stato osservato nella popolazione VITT se confrontati con il gruppo di pazienti non confermati ($p=0.05$). Non sono state invece osservate differenze per quanto riguarda la percentuale, nel sangue periferico di linfociti e monociti.

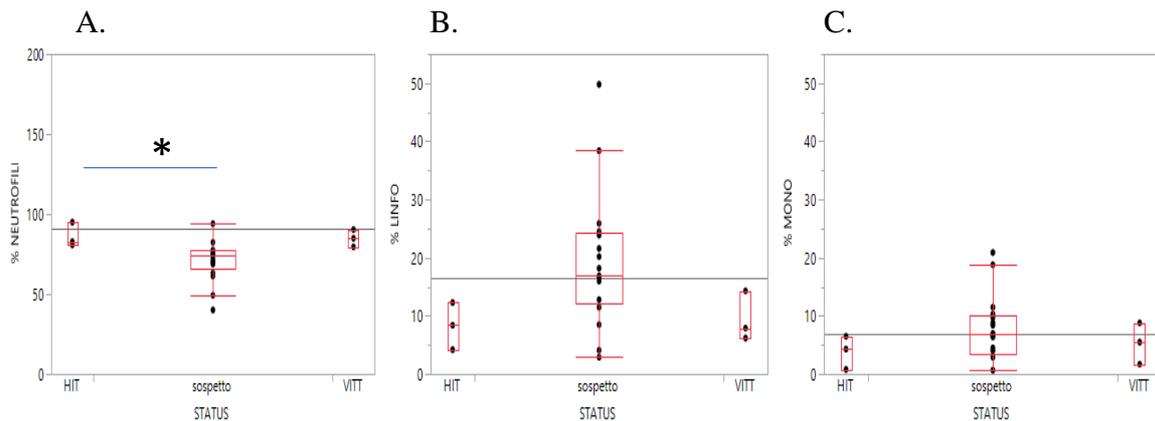


Figura 13: Analisi statistica e rappresentazione dei dati ematologici raccolti nei pazienti con VITT, HIT e COVID. Pannello A. Analisi della percentuale dei neutrofili nelle diverse coorti di pazienti. * $p < 0.05$. **Pannello B e C:** Analisi della percentuale di linfociti e monociti nel sangue periferico nelle diverse coorti di pazienti e controlli.

Sono stati, poi, analizzati i valori sierici di PCR come principale indicatore di flogosi, il numero di piastrine ($PLT \times 10^9$), il D-Dimero e Fibrinogeno oltre che INR.

Come mostrato in Figura 14 (Pannelli A, B, C, D, E), i pazienti affetti da VITT o HIT mostrano numeri di PLT decisamente ridotti se confrontati con pazienti sospetti non confermati (Media \pm DS; 26.66 ± 11 vs 185.25 ± 92.69 ; vs 185.25 ± 92.69 * $p = 0.02$, * $p = 0.01$; rispettivamente). I valori sierici di D-Dimero si mostrano statisticamente aumentati (43013 ± 14179 vs 364 ± 203 ; ** $p = 0.0052$) nei pazienti con VITT rispetto alle altre coorti di pazienti (Pannello B) così come INR (International Normalized Ratio ** $= 0.0083$; pannello C). Nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda il valore sierico del fibrinogeno, tempo di protrombina e tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT).

È stato inoltre possibile seguire il follow-up di uno delle tre pazienti VITT e si è potuto osservare, a distanza di 12 mesi, la negativizzazione per la ricerca di anticorpi anti-PF4. Sulla base anche di questo dato il clinico sta valutando la sospensione della terapia.

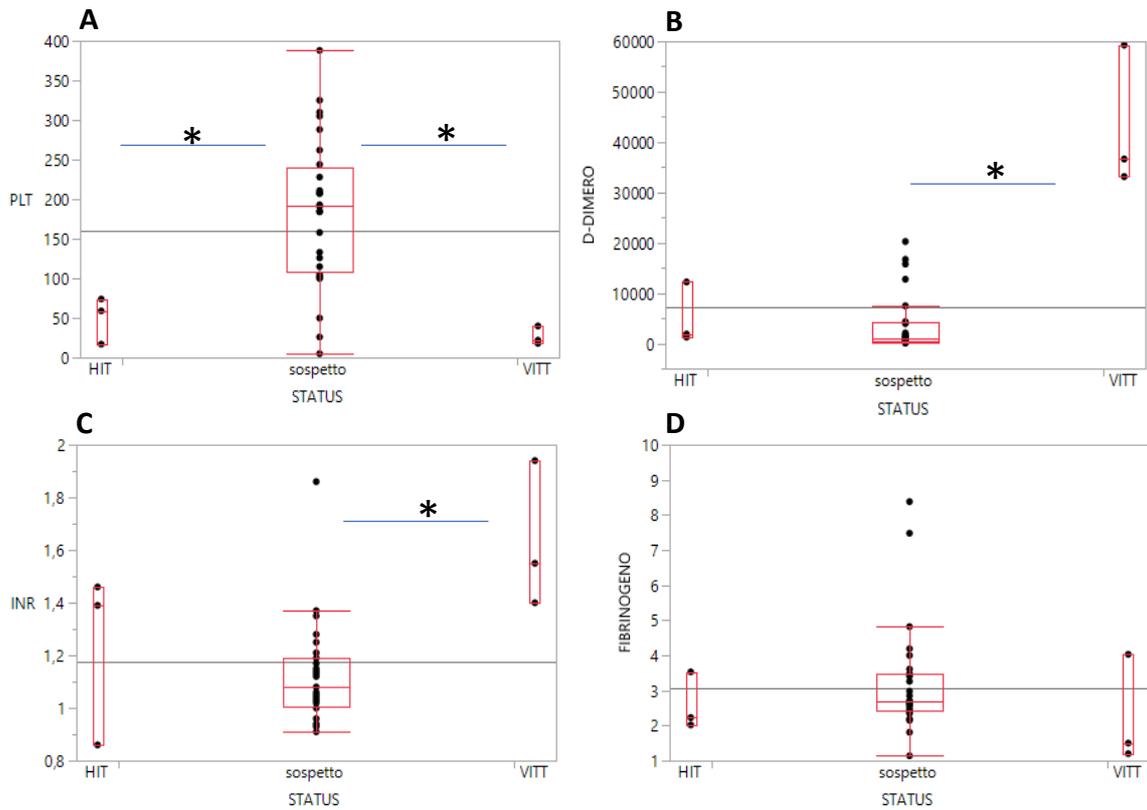


Figura 14. Analisi statistica dei principali parametri di coagulazione.

Pannello A e B: Valutazione del numero di piastrine e D-Dimero nelle diverse coorti di pazienti * $p < 0.05$.

Pannelli C e D: Valutazione dell'INR e del fibrinogeno sierico nei diversi pazienti. * $p < 0.05$.

5.2 Studio della presenza degli anticorpi anti-ACE2 in siero di pazienti dopo infezione da SARS-CoV-2.

Lo sviluppo di forme gravi di COVID-19 oppure di sindromi post infezione/post vaccinazione per SARS-CoV-2 genera l'interesse e la necessità di studiare il ruolo dell'autoimmunità. Si è, quindi, rivolta l'attenzione allo studio della presenza degli autoanticorpi quali anti-ACE2.

L'analisi ha preso in considerazione 40 campioni di pazienti che hanno avuto accesso al Laboratorio di Autoimmunologia per analisi di follow-up a seguito di effetti neurologici osservati post vaccinazione da SARS-CoV-2 e 3 forme di COVID grave. I valori rilevati nel siero sono stati confrontati con quelli identificati in una coorte di 25 donatori sani raccolti presso la banca di sangue locale per i quali risultava una concentrazione media sierica pari a 28.5 ± 12.9 UI/mL.

L'analisi, come mostrato in Figura 15, ha messo in evidenza come i soggetti affetti da forme gravi di COVID-19 mostravano un livello di anti-ACE2 simile rispetto ai donatori sani, mentre i pazienti affetti da forme neurologiche post vaccinazione o infezione da COVID-19 mostravano una concentrazione sierica statisticamente inferiore (** $p=0.0001$).

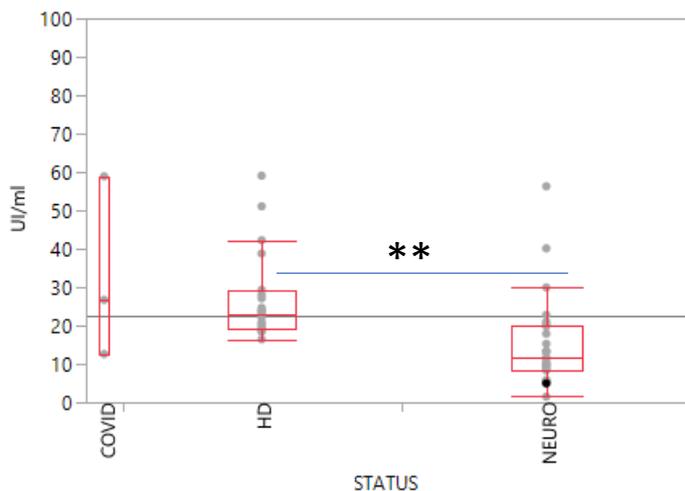


Figura 15. Rappresentazione statistica mediante box-plot delle concentrazioni sieriche di anti-ACE2 nelle diverse coorti di pazienti.

I sieri dei tre pazienti VITT confermati sono stati, inoltre, valutati per la presenza degli anticorpi anti-ACE2. 2 dei 3 pazienti sono risultati avere livelli sierici di anti-ACE2

paragonabili a quelli presenti nei sieri dei donatori sani (16.7, 3.2UI/mL). Un solo paziente presentava livello superiore pari a 38UI/mL.

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La pandemia di SARS-CoV-2 ha imposto un grande sforzo al sistema sanitario per dare una risposta tempestiva alle esigenze del paziente. La vaccinazione rappresenta il principale strumento per contenere l'attuale epidemia di SARS-CoV-2. La rapida approvazione e la successiva introduzione a livello globale di vaccini contro SARS-CoV-2 ha, inevitabilmente, portato alla segnalazione di eventi avversi anche rari, con una frequenza comunque sovrapponibile a quella della popolazione generale.

Il 7 aprile 2021, l'EMA ha rilevato un possibile collegamento tra la vaccinazione con vaccini a vettore virale (AVV, AstraZeneca e Johnson & Johnson) e casi molto rari di trombi inusuali associati a bassi livelli di piastrine, con esordio tipico tra 4 e 16 giorni dalla vaccinazione. In particolare, per il vaccino Vaxevria, a fronte di un rapporto rischio-beneficio complessivamente favorevole al vaccino, sono stati segnalati rarissimi casi (approssimativamente 1/100.000, ma il rischio aumenta fino a circa 1/50.000 nei soggetti di età < 50 anni) di tromboembolismo in sedi atipiche (encefalo, vasi splenici e mesenterici) associato a piastrinopenia. Si è evidenziato velocemente che in molti dei casi con concomitante trombosi e trombocitopenia, i test per gli anticorpi anti-PF4 sono risultati positivi o fortemente positivi. Un'analisi estesa per altri potenziali meccanismi che potrebbero causare trombosi e/o trombocitopenia è stata effettuata per una parte minoritaria di questi casi; tuttavia, non è stata ad oggi trovata nessuna altra alterazione che possa essere presa in considerazione per spiegare gli eventi osservati. Nondimeno, l'esatto meccanismo fisiopatologico che causa l'insorgenza di questi eventi trombotici non è ancora stato definito e non sono stati identificati fattori di rischio specifici.

Alla base di tale sindrome "Vaccine-induced Immune Thrombotic Thrombocitopenia" (VITT) si è ipotizzato possa esserci un fenomeno di tipo immunitario simile a quello

osservato molto raramente in corso di trattamento con eparina (trombocitopenia indotta da eparina o HIT) e il dosaggio di tali autoanticorpi, con metodo opportuno, è risultato di rilevante importanza per la diagnosi. Il lavoro sostenuto durante il tirocinio ha contribuito alla riuscita del Laboratorio di Autoimmunologia dell'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, quale laboratorio specialistico della regione, a identificare e performare in tempi record il test con più elevata sensibilità e specificità possibile per identificazione di anti-PF4, di fondamentale importanza come supporto al clinico per affrontare i rari casi di reazione avversa post vaccinazione con AVV. In relazione al mutato scenario epidemiologico in senso favorevole e di alcuni eventi avversi cronologicamente e, verosimilmente, collegati alla somministrazione del vaccino Vaxevria, l'11 giugno 2021 il Ministero della Salute ha recepito il parere del Comitato Tecnico Scientifico, limitandone l'indicazione alle sole persone di età uguale o superiore ai 60 anni, prevedendo inoltre l'applicazione di un ciclo vaccinale "misto", con somministrazione di una seconda dose di vaccino a mRNA nei soggetti di età inferiore ai 60 anni che avessero già effettuato una prima dose di vaccino Vaxzevria. Come riportato in letteratura, anche i casi liguri di VITT mostrano un profilo sierologico particolare per la presenza di anticorpi anti-PF4, la conta piastrinica ridotta e livelli plasmatici di D-dimero molto elevati mentre non si notano differenze per quanto riguarda i valori di PCR, percentuali di popolazioni cellulari quali linfociti e monociti. L'esecuzione della valutazione estesa anche per anticorpi di isotipo IgA e M anti-PF4 non aggiunge positività a quelle individuate dal test specifico per IgG. Pazienti affetti da VITT, se non adeguatamente trattati, possono anche avere esito fatale. Sebbene non ancora completamente noti i meccanismi fisiopatologici alla base di tale sindrome, questi sembrano essere del tutto differenti rispetto ai comuni eventi trombotici, anche per quel che riguarda le sedi

coinvolte; in particolare, per la trombosi venosa cerebrale, l'associazione di cefalea, crisi epilettica ed emiparesi fluttuante è particolarmente suggestiva.

Il monitoraggio nel tempo di uno dei 3 pazienti VITT ha permesso inoltre di osservare che la positività è un effetto transitorio. Ulteriori studi sono necessari per capire quali stimoli potrebbero rievocare il rilascio di anticorpi anti-PF4.

Per quanto riguarda lo studio degli autoanticorpi anti-ACE2, dai risultati preliminari confermiamo, anche per la nostra coorte di pazienti, un incremento della loro concentrazione plasmatica nei pazienti affetti da forme severe di COVID-19, dato già presente in letteratura (49). Solo uno dei 3 pazienti affetti da VITT risultava positivo, ma data la rarità dell'evento avverso, è indispensabile raccogliere i dati provenienti da altri centri. Il loro ruolo nello sviluppo di eventi avversi di tipo neurologico, sia post infezione che post vaccinazione, al momento è ancora da chiarire anche sulla base della classificazione dell'evento neurologico manifestato.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. PMID: 21413252.
2. Beaudette FR, Hudson CB. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 90:51–58, 1937
3. Peiris, J., Guan, Y. & Yuen, K. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* **10**, S88–S97 (2004). <https://doi.org/10.1038/nm1143>
4. Ge, XY., Li, JL., Yang, XL. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**, 535–538 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12711>
5. Liang G, Chen Q, Xu J, et al. Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong Province, China. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(10):1774-1781. doi:10.3201/eid1010.040445
6. Cauchemez S, Van Kerkhove MD, Riley S, Donnelly CA, Fraser C, Ferguson NM. Transmission scenarios for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill*. 2013;18(24):20503. Published 2013 Jun 13.
7. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Jun;7(6):439-50. doi: 10.1038/nrmicro2147. PMID: 19430490; PMCID: PMC2830095.
8. Hussain S, Pan J, Chen Y, Yang Y, Xu J, Peng Y, Wu Y, Li Z, Zhu Y, Tien P, Guo D. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2005 May;79(9):5288-95. doi: 10.1128/JVI.79.9.5288-5295.2005. PMID: 15827143; PMCID: PMC1082772.
9. Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, Mommaas AM. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):5927-40. doi: 10.1128/JVI.02501-05. PMID: 16731931; PMCID: PMC1472606.

10. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol.* 2007 Jan;81(1):20-9. doi: 10.1128/JVI.01358-06. Epub 2006 Aug 23. PMID: 16928755; PMCID: PMC1797243.
11. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269. Published 2020 Nov 25. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
12. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet.* 2008 Apr;9(4):267-76. doi: 10.1038/nrg2323. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18319742.
13. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
14. Cui L, Wang H, Ji Y, Yang J, Xu S, Huang X, Wang Z, Qin L, Tien P, Zhou X, Guo D, Chen Y. The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *J Virol.* 2015 Sep;89(17):9029-43. doi: 10.1128/JVI.01331-15. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26085159; PMCID: PMC4524063.
15. Woo PC, Lau SK, Yuen KY. Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 Oct;19(5):401-7. doi: 10.1097/01.qco.0000244043.08264.fc. PMID: 16940861; PMCID: PMC7141584.
16. Tyrrell DAJ, Myint SH. Coronaviruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 60.
17. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, Ravelli RBG, Paul van Schayck J, Mykytyn AZ, Duimel HQ, van Donselaar E, Riesebosch S, Kuijpers HJH, Schipper D, van de Wetering WJ, de Graaf M, Koopmans M, Cuppen E, Peters PJ, Haagmans BL, Clevers H. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020 Jul 3;369(6499):50-54. doi: 10.1126/science.abc1669. Epub 2020 May 1. PMID: 32358202; PMCID: PMC7199907.

18. Berger, J.R. COVID-19 and the nervous system. *J. Neurovirol.* **26**, 143–148 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00840-5>
19. Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, van der Werf S, Yuen KY, Altmeyer R. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol.* 2005 May;86(Pt 5):1423-1434. doi: 10.1099/vir.0.80671-0. PMID: 15831954.
20. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
21. Singh D, Yi SV. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp Mol Med.* 2021 Apr;53(4):537-547. doi: 10.1038/s12276-021-00604-z. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33864026; PMCID: PMC8050477.
22. Lednicky J.A., Tagliamonte M.S., White S.K., Elbadry M.A., Alam M.M., Stephenson C.J., Bonny T.S., Loeb J.C., Telisma T., Chavannes S. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution. medRxiv. 2021 doi: 10.1101/2021.03.19.21253391.
23. Vlasova A.N., Diaz A., Dامتie D., Xiu L., Toh T.-H., Lee J.S.-Y., Saif L.J., Gray G.C. Novel canine coronavirus Isolated from a hospitalized pneumonia patient, east Malaysia. *Clin. Infect. Dis.* 2021 doi: 10.1093/cid/ciab456. Published online May 20, 2021. Vlasova A.N., Diaz A., Dامتie D., Xiu L., Toh T.-H., Lee J.S.-Y., Saif L.J., Gray G.C. Novel canine coronavirus Isolated from a hospitalized pneumonia patient, east Malaysia. *Clin. Infect. Dis.* 2021 doi: 10.1093/cid/ciab456. Published online May 20, 2021.
24. Xu R.-H., He J.-F., Evans M.R., Peng G.-W., Field H.E., Yu D.-W., Lee C.-K., Luo H.-M., Lin W.-S., Lin P. Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10:1030–1037.
25. Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Zhang L.J., Guan Y.J. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003;302:276–278.

26. Xiao X., Newman C., Buesching C.D., Macdonald D.W., Zhou Z.-M. Animal sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic. *Sci. Rep.* 2021;11:11898.
27. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **19**, 141–154 (2021).
28. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, Anthony SJ, Barclay WS, Boni MF, Doherty PC, Farrar J, Geoghegan JL, Jiang X, Leibowitz JL, Neil SJD, Skern T, Weiss SR, Worobey M, Andersen KG, Garry RF, Rambaut A. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell.* 2021 Sep 16;184(19):4848-4856. doi: 10.1016/j.cell.2021.08.017. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34480864; PMCID: PMC8373617.
29. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Dec;588(7836):E6. doi: 10.1038/s41586-020-2951-z. Erratum for: *N Z Nurs J.* 1988 Nov;81(11):18-9. PMID: 33199918.
30. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*
31. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Feb;28(2):202-221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34715347; PMCID: PMC8548286.
32. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8. doi: 10.1126/science.1690918. PMID: 1690918.
33. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12283-12287. doi:10.1073/pnas.1400472111
34. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* 1974 Jan;125C(1-2):373-89. PMID: 4142565.

35. McMillan P, Dexhiemer T, Neubig RR, Uhal BD. COVID-19-A Theory of Autoimmunity Against ACE-2 Explained. *Front Immunol.* 2021;12:582166. Published 2021 Mar 23. doi:10.3389/fimmu.2021.582166
36. *Compensation of ACE2 Function for Possible Clinical Management of 2019-nCoVInduced Acute Lung Injury Wu Virologica Sinica www.virosin.org https://doi.org/10.1007/s12250-020-00205-*
37. South AM, Tomlinson L, Edmonston D, Hiremath S, Sparks MA. Controversies of renin-angiotensin system inhibition during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Nephrol.* 2020 Jun;16(6):305-307. doi: 10.1038/s41581-020-0279-4. PMID: 32246101; PMCID: PMC7118703.
38. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020 Jul;98(1):219-227. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32327202; PMCID: PMC7194105.
39. Wang J, Zhao H and An Y (2022) ACE2 Shedding and the Role in COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:789180. doi: 10.3389/fcimb.2021.789180
40. Karthika, T., Joseph, J., Das, V. R. A., Nair, N., Charulekha, P., Roji, M. D., et al. (2021). SARS-CoV-2 Cellular Entry Is Independent of the ACE2 Cytoplasmic Domain Signaling. *Cells* 10 (7), 1814. doi: 10.3390/cells10071814
41. Yeung, M. L., Teng, J. L. L., Jia, L., Zhang, C., Huang, C., Cai, J.-P., et al. (2021). Soluble ACE2-Mediated Cell Entry of SARS-CoV-2 via Interaction With Proteins Related to the Renin-Angiotensin System. *Cell* 184 (8), 2212–2228.e12. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.053 Yeung, M. L., Teng, J. L. L., Jia, L., Zhang, C., Huang, C., Cai, J.-P., et al. (2021). Soluble ACE2-Mediated Cell Entry of SARS-CoV-2 via Interaction With Proteins Related to the Renin-Angiotensin System. *Cell* 184 (8), 2212–2228.e12. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.053
42. Van Lier D, Kox M, Santos K, van der Hoeven H, Pillay J, Pickkers P. Increased blood Angiotensin Converting Enzyme 2 activity in critically ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res.* (2021) 7. 10.1183/23120541.00848-2020

43. Warkentin TE. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Thrombolysis*. 2000 Nov;10 Suppl 1:35-45. doi: 10.1023/a:1027381103184. PMID: 11155193.
44. Platton S, Bartlett A, MacCallum P, Makris M, McDonald V, Singh D, Scully M, Pavord S. Evaluation of laboratory assays for anti-platelet factor 4 antibodies after ChAdOx1 nCoV-19 vaccination. *J Thromb Haemost*. 2021 Aug;19(8):2007-2013. doi: 10.1111/jth.15362. Epub 2021 Jul 5. PMID: 33973336; PMCID: PMC8236994.
45. Azzarone B, Veneziani I, Moretta L, Maggi E. Pathogenic Mechanisms of Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia in People Receiving Anti-COVID-19 Adenoviral-Based Vaccines: A Proposal. *Front Immunol*. 2021 Aug 13;12:728513. doi: 10.3389/fimmu.2021.728513. PMID: 34484238; PMCID: PMC8415022.
46. *Antibody epitopes in vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia* <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03744-4> Received: 4 May 2021 Accepted: 21 June 2021 Published online: 7 July 2021 Check for updates Angela Huynh1, John G. Kelton1,2, Donald M. Arnold1,2, Mercy Daka3 & Ishac Nazy1,2 2021
47. Warkentin TE, Sheppard JI, Linkins LA, Arnold DM, Nazy I. Performance characteristics of an automated latex immunoturbidimetric assay [HemosIL[®] HIT-Ab(PF4-H)] for the diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res*. 2017 May;153:108-117. doi: 10.1016/j.thromres.2017.03.010. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28391124.
48. Takashi Satoh, Yoko Tanaka, Yuka Okazaki, Junichi Kaburaki, Yasuo Ikeda, Masataka Kuwana, Heparin-dependent and -independent anti-platelet factor 4 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, *Rheumatology*, Volume 51, Issue 9, September 2012, Pages 1721–1728, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes145>
49. Rodriguez-Perez AI, Labandeira CM, Pedrosa MA, Valenzuela R, Suarez-Quintanilla JA, Cortes-Ayaso M, Mayán-Conesa P, Labandeira-Garcia JL. Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *J Autoimmun*. 2021 Aug;122:102683. doi:

10.1016/j.jaut.2021.102683. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34144328; PMCID:
PMC8193025.

RINGRAZIAMENTI

Sono giunta alla fine di un percorso lungo e anche difficile ma pieno di soddisfazioni che, ha posto le basi per il mio futuro e, cosa più importante mi ha permesso di capire cosa volessi fare “da grande”. Se sono arrivata fino a qui, raggiungendo il mio obiettivo lo devo a numerose persone alle quali voglio dedicare poche, ma significative parole per dimostrargli la mia gratitudine: Ringrazio il Laboratorio di Autoimmunologia dell’Ospedale Policlinico San Martino di Genova presso il quale ho svolto il mio tirocinio, in particolare grazie a Emanuela, Anastasia, Bianca e Cristina che mi hanno subito accolta come “una di voi” non facendomi mai sentire in difetto e soprattutto grazie per quello che mi avete insegnato e per le “pause caffè” sempre gradite, momenti che non dimenticherò. Ringrazio la Prof.ssa Giampaola Pesce e la Dott.ssa Federica Maria Bozzano alle quali sono particolarmente riconoscente perchè mi hanno seguito durante tutto il percorso e mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo in tempi “record”. Un grazie anche al Dott. Franciotta e al Professor Saverino. Ringrazio anche la mia correlatrice Bassi Anna Maria per la sua disponibilità. Grazie ai miei colleghi con i quali ho condiviso gioie per ogni esame passato, momenti di spensieratezza ma anche le ansie prima di un esame. Ricorderò sempre le interminabili videochiamate per riuscire e ripetere tutto il programma il giorno prima di un esame. Grazie ai miei amici lontani e vicini ma che comunque ci sono sempre stati e sempre pronti per una parola di conforto e di sostegno. Grazie a Matteo che durante questi anni mi ha sempre spronato a fare del mio meglio. Grazie per avermi sempre sostenuta e soprattutto grazie per la pazienza perché riconosco che con me ce ne vuole tanta. Grazie ai miei zii che mi hanno sempre fatto capire quanto fossero fieri e contenti dei miei risultati raggiunti in questo percorso. Un “enorme grazie” a mio fratello e Manuela che, in questi anni mi hanno dimostrato che posso sempre contare su di loro e, sono sicura che ci saranno in ogni momento della mia vita pronti a supportarmi in ogni modo possibile.

E infine grazie ai miei genitori, per i quali non basterebbe un libro intero di ringraziamenti, perché senza di voi non sarei arrivata da nessuna parte. Grazie perché so che voi ci sarete sempre per qualsiasi cosa. Grazie per tutto quello che mi avete dato e per dimostrarmi ogni giorno quanto siete fieri di me in ogni gesto che fate.

Voglio dedicare questo giorno così speciale per me, ai miei nonni perché anche se non sono qui con me io so che mi “sorvegliano” e mi sostengono ogni giorno e in ogni cosa che faccio. So che oggi saranno felici e fieri della loro “nipotina”. Grazie nonni per i valori che mi avete insegnato, li porto sempre con me.

Martina