



SAPIENZA
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXVI CICLO**

Vaccinazione anti SARS-CoV-2 in popolazioni "fragili": studio di alcune componenti della risposta immunitaria

DOTTORANDO

Roberta Campagna

DOCENTE GUIDA

Prof. Guido Antonelli

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1.	INTRODUZIONE.....	4
1.1	Classificazione	5
1.2	Struttura del genoma	8
1.3	Proteine virali.....	10
1.4	Modalità di trasmissione e ciclo di replicazione.....	14
1.5	Variabilità di SARS-CoV-2.....	18
1.6	Patogenesi	23
1.7	COVID-19 e risposta immunitaria indotta dall'infezione.....	26
1.8	Vaccinazione anti SARS-CoV-2.....	31
2.	OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	36
3.	MATERIALI E METODI.....	38
3.1	Popolazione di studio	38
3.1.1	Pazienti con neoplasie ginecologiche.....	38
3.1.2	Pazienti con Sclerosi Sistemica (SSc).....	38
3.1.3	PLWH e pazienti emodializzati	39
3.1.4	Pazienti con tumori solidi	40
3.2	Valutazione della risposta umorale	40
3.3	Valutazione della risposta cellulo-mediata tramite saggio di rilascio di IFN- γ	41
3.4	Valutazione del titolo di anticorpi neutralizzanti	41
3.4.1	Linee cellulari e preparazione degli stock di SARS-CoV-2.....	42
3.4.2	Plaque Reduction Neutralization Test	42
3.5	Valutazione della risposta cellulo-mediata tramite citometria a flusso	43
3.6	Analisi statistica.....	45
4.	RISULTATI.....	47
4.1	Pazienti con neoplasie ginecologiche.....	47
4.1.1	Risposta umorale nelle pazienti con neoplasie ginecologiche	49
4.2	Pazienti con Sclerosi Sistemica.....	52

4.2.1 Risposta umorale nei pazienti con SSc.....	53
4.2.2 Tasso di sieropositività e livelli sierici di IgG nei pazienti con SSc in base alle terapie con immunosppressori	55
4.3 Pazienti emodializzati e PLWH	57
4.3.1 Risposta umorale nei pazienti emodializzati e PLWH.....	59
4.3.2 Risposta cellulo-mediata (IGRA)	62
4.4 Pazienti con tumori solidi	63
4.4.1 Risposta umorale nei pazienti con tumori solidi.....	64
4.4.2 Anticorpi neutralizzanti	65
4.4.3 Correlazione fra i titoli anticorpali rilevati attraverso test CLIA e PRNT50	67
4.4.4 Risposta cellulo-mediata nei pazienti con tumori solidi	68
 5. DISCUSSIONE	 74
 BIBLIOGRAFIA	 84

1. INTRODUZIONE

Alla fine del 2019 sono stati segnalati per la prima volta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità casi di polmonite di eziologia sconosciuta nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei in Cina. Nel gennaio 2020 le autorità cinesi ne hanno isolato l'agente eziologico responsabile e avendo individuato delle somiglianze sia con il coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV) che con il virus della sindrome respiratoria del Medio Oriente (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV), il patogeno identificato è stato classificato come un nuovo coronavirus umano. Il virus inizialmente chiamato 2019-nCoV e in seguito classificato come SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) (Woo *et al.*, 2023) mostrava un'elevata omologia con SARS-CoV e altri beta coronavirus scoperti negli esseri umani, pipistrelli e altri animali selvatici (Chan *et al.*, 2020; C. Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2021). SARS-CoV-2 è oggi riconosciuto come l'agente eziologico della malattia COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) ed è stato responsabile dello stato di pandemia dichiarato dall'OMS a Marzo 2020 a seguito della diffusione della malattia in tutto il mondo (Hu *et al.*, 2021a).

La maggioranza dei coronavirus patogeni per l'uomo sono responsabili soltanto di sintomatologie lievi (Peck *et al.*, 2015) ad eccezione di SARS-CoV (Zhong *et al.*, 2003) e MERS-CoV che hanno causato due grandi epidemie nel corso del XXI secolo (Zaki *et al.*, 2012; R. Lu *et al.*, 2020). Gli individui che vengono infettati da SARS-CoV-2 possono mostrare un'ampia varietà di sintomi tra i quali vi sono malessere generale, tosse e febbre (N. Chen *et al.*, 2020) fino ad arrivare ai casi più gravi che possono essere caratterizzati da sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e danno polmonare acuto che conduce a infiammazione e polmonite con potenziale esito fatale (Y. -M. Gao *et al.*, 2020; Tehrani *et al.*, 2021). L'entità dell'emergenza sanitaria ha reso necessario un rapido sviluppo di vaccini e la successiva attuazione di campagne di vaccinazione di massa allo scopo, in primo luogo, di limitare la diffusione del virus nella popolazione generale e inoltre di evitare le manifestazioni più gravi della malattia. I soggetti con fragilità che contraggono l'infezione da SARS-CoV-2 corrono un rischio più elevato di andare incontro a una sintomatologia più

severa che può richiedere anche il ricovero in terapia intensiva e portare a prognosi infausta (Garassino, Jennifer G Whisenant, *et al.*, 2020; Ng *et al.*, 2020; Williamson *et al.*, 2020; L. Zhang *et al.*, 2020; Venkatesulu *et al.*, 2021; Wolff *et al.*, 2021).

1.1 Classificazione

SARS-CoV-2 è un virus rivestito caratterizzato da un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva (ssRNA (+)), appartiene all'ordine *Nidovirales*, che a sua volta comprende le famiglie *Coronaviridae*, *Arteriviridae* e *Roniviridae* (Fig.1). SARS-CoV-2 fa parte della famiglia *Coronaviridae*, ulteriormente suddivisa nelle sottofamiglie *Torovirinae* e *Coronavirinae* (Saberiyana *et al.*, 2022; Woo *et al.*, 2023).

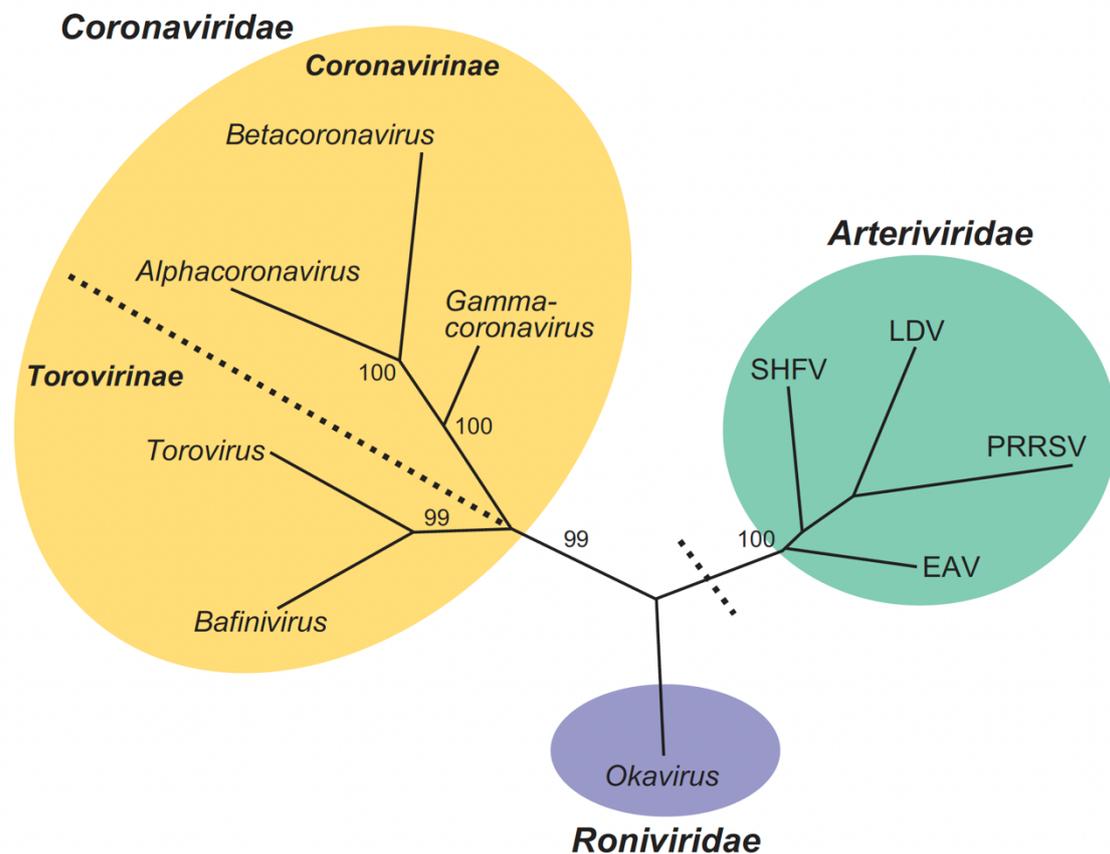


Figura 1. Albero filogenetico dell'ordine *Nidovirales* (SHFV: simian hemorrhagic fever virus, LDV: lactate dehydrogenase-elevating virus, PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, EAV: equine arteritis virus) (King *et al.*, 2012).

I coronavirus sono in grado di infettare oltre all'uomo una estesa varietà di animali terrestri, tra i quali pipistrelli, roditori, gatti, cani, conigli, bovini, cavalli, ecc. e mammiferi acquatici (delfini e balene). Sulla base di omologie genetiche, i coronavirus umani e animali sono inoltre classificati in quattro generi: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Saberian *et al.*, 2022; Woo *et al.*, 2023). Nell'uomo, le infezioni da Coronavirus interessano principalmente il tratto respiratorio superiore e il tratto gastrointestinale, con sintomi che vanno da malattie lievi e autolimitanti, come il comune raffreddore, a manifestazioni più importanti, quali bronchiti e polmoniti (Wevers and van der Hoek, 2009).

In aggiunta alla loro capacità di infettare numerosi ospiti, i coronavirus sono caratterizzati da elevati tassi di ricombinazione e mutazione genetica, pertanto gli eventi di *spillover* non sono infrequenti (Su *et al.*, 2016; Cui, Li and Shi, 2019). I primi coronavirus umani (HCoV) sono stati descritti intorno agli anni '60 in pazienti con comune raffreddore. Da quel momento sono stati identificati numerosi HCoV inclusi quelli responsabili delle due epidemie originate da eventi zoonotici, rispettivamente tra il 2002-2003 e nel 2013, ovvero quella della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus umano (SARS-CoV) (Peiris *et al.*, 2003; Raj *et al.*, 2014) e quella della sindrome respiratoria del Medio Oriente da coronavirus (MERS-CoV) (Raj *et al.*, 2014). Diversamente dalla maggioranza dei Coronavirus umani, questi due patogeni, in caso di infezione nell'uomo, possono causare malattie respiratorie fatali (Althobaity, Wu and Tildesley, 2022).

Sulla base di omologie di sequenza con SARS-CoV, MERS-CoV e altri HCoV e per la somiglianza della sua struttura genomica, del suo ciclo di replicazione e dell'antigene di superficie, SARS-CoV-2 è stato classificato come un Coronavirus umano appartenente al genere dei *Betacoronavirus*. Oltre alle omologie di sequenza, sono state identificate delle similitudini tra SARS-CoV-2 e SARS-CoV e MERS-CoV anche per quanto riguarda la sintomatologia, l'origine zoonotica, la filogenesi e la possibilità di trasmissione da persona a persona (Chan *et al.*, 2020; C. Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2021). SARS-CoV vede nei pipistrelli il suo naturale *reservoir* (Li *et al.*, 2005) e l'ospite intermedio per effettuare il salto di specie all'uomo, nel quale è altamente trasmissibile, sembra essere stato

il pangolino (Xiao *et al.*, 2020) oppure il musang (Kan *et al.*, 2005). Le origini di MERS-CoV non sono del tutto chiare ma, si ritiene che possa condividere con SARS-CoV l'origine dai pipistrelli e che sia successivamente stato trasmesso ai dromedari responsabili della trasmissione all'uomo (Reusken *et al.*, 2013; Azhar *et al.*, 2014); diversamente da SARS-CoV-1 e -2, MERS-CoV rimane un virus zoonotico, con un indice di trasmissibilità interumana <1. L'origine di SARS-CoV-2 rimane oggetto di studio, anche se, come altri Coronavirus sembra essere originato dai pipistrelli (P. Zhou *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021a). Il passaggio dal serbatoio animale all'uomo potrebbe essere avvenuto attraverso un ospite intermedio che tuttavia ad oggi non è ancora stato identificato (Liu, Chen and Chen, 2019; Andersen *et al.*, 2020; C. Zhang *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021b) (Fig.2).

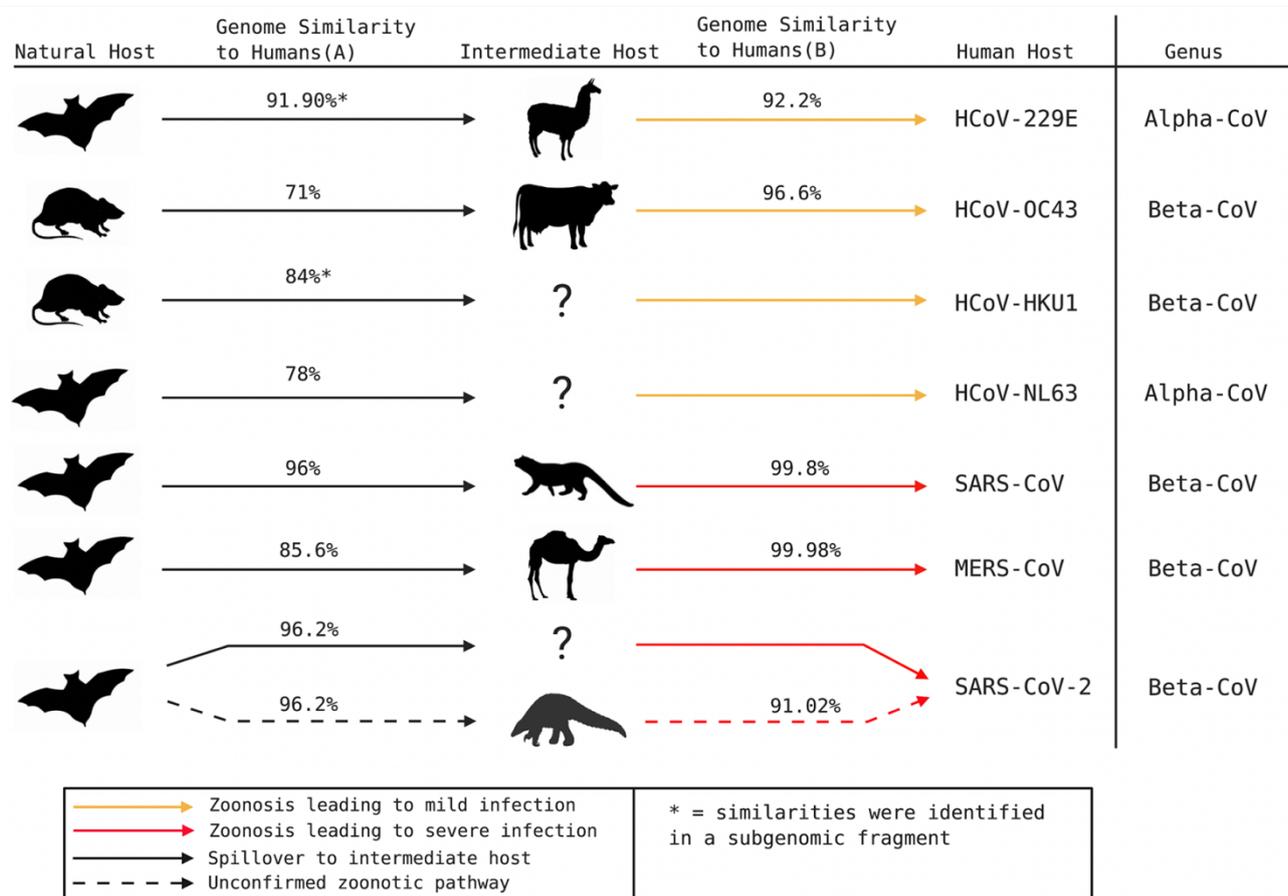


Figura 2. Origine animale dei coronavirus umani (Singh *et al.*, 2021).

Sebbene questi virus condividano numerose somiglianze, vi è una serie di differenze che caratterizzano SARS-CoV-2. In particolare, SARS-CoV-2 condivide il recettore cellulare, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), con SARS-CoV, ma rispetto a

quest'ultimo è in grado di legare il proprio anti-recettore in maniera più efficiente grazie a delle variazioni nel dominio di legame del recettore della proteina spike SARS-CoV-2 (RBD). Altre differenze risiedono sia nel tasso di mortalità che nella trasmissibilità, rispettivamente inferiore e superiore in SARS-CoV-2 rispetto a SARS-CoV e MERS-CoV (Petersen *et al.*, 2020; W. Cao *et al.*, 2021; Kesheh *et al.*, 2022).

1.2 Struttura del genoma

Il genoma di SARS-CoV-2 ha una dimensione di circa 29,9 kb, è costituito da almeno 14 *open reading frame* (ORF), con ORF1a e ORF1b localizzate al 5' che compongono circa i due terzi del genoma, e codifica per 29 proteine virali. I due terzi dell'estremità 5' del genoma di SARS-CoV-2 codificano per due poliproteine sovrapposte: pp1a e pp1ab (Chen, Liu and Guo, 2020). Queste poliproteine a seguito di un taglio autoproteolitico sono processate per dare origine a 16 proteine non strutturali (nsp), che svolgono funzioni essenziali per la replicazione e la trascrizione virale oltre che per l'evasione della risposta immunitaria (Brant *et al.*, 2021; Jamison *et al.*, 2022). All'estremità 3' del genoma sono presenti quattro ORF che codificano invece per le proteine strutturali, fra le quali ritroviamo la proteina del nucleocapside (N), la proteina Spike (S), la proteina di membrana (M) e la proteina dell'envelope (E), che oltre a svolgere un ruolo nell'assemblaggio del virione, sono anche coinvolte nella soppressione della risposta immunitaria dell'ospite. Tra le proteine strutturali, la proteina S, oltre ad essere l'elemento a cui questa classe di virus deve il proprio nome, poiché conferisce al virione osservato al microscopio elettronico il caratteristico aspetto della corona solare, è anche responsabile del tropismo del virus (Woo *et al.*, 2023). Intercalata fra i geni che codificano per le proteine strutturali è inoltre presente una serie di geni accessori, che codificano per le proteine accessorie ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b e ORF14 coinvolte nella regolazione dell'infezione virale e che, ad eccezione delle proteine strutturali ORF3a e ORF7a, possono non essere incorporate nel virione (Gordon *et al.*, 2020).

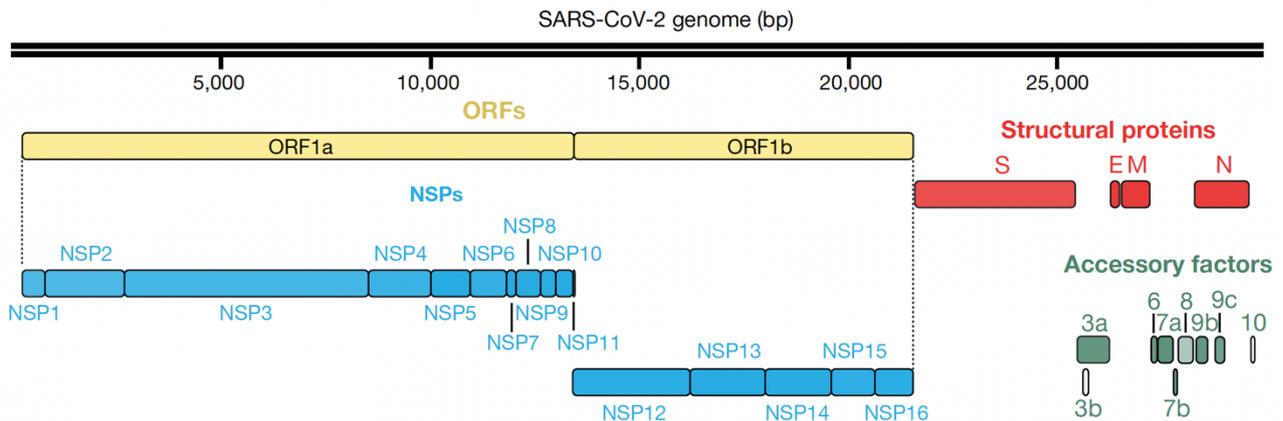


Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura del genoma di SARS-CoV-2. Sono rappresentate le ORF codificanti per le proteine strutturali e non strutturali e le proteine accessorie (Gordon *et al.*, 2020).

All'estremità 5' sono presenti delle sequenze di regolazione trascrizionale (*transcriptional regulatory sequences* TRS) che contengono una sequenza leader di 70 basi, denominata TRS-L, contenente a sua volta una sequenza di 7-10 basi che regolano la trascrizione, esistono inoltre al 5' UTR (*untranslated region*) degli elementi che impediscono la degradazione degli RNA messaggeri (mRNA) virali da parte della cellula ospite. All'estremità 3' si trova il sito di legame per il complesso di replicazione e trascrizione (RTC – *replication and transcription complex*) che regola l'inizio della replicazione e della trascrizione degli intermedi di RNA a polarità negativa (Brant *et al.*, 2021). Associati ad ogni ORF ci sono dei motivi detti TRS-B, che sembrano essere importanti negli eventi di ricombinazione, poiché regolano la sintesi discontinua degli intermedi a polarità negativa degli RNA sub-genomici (sgRNA). Il genoma di SARS-CoV-2 è inoltre caratterizzato, come quello di altri Coronavirus, da un basso contenuto in GC e dalla soppressione delle isole CpG, che rappresentano una forma di protezione dalle proteasi a dito di zinco presenti nelle cellule infettate (de Haan *et al.*, 1998).

Similmente a quanto osservato per altri coronavirus, il genoma di SARS-CoV-2 forma delle strutture secondarie (SS) essenziali per la replicazione virale. In particolare, queste SS si formano in regioni invertite (IR) che si ripiegano a formare delle strutture a *stem-loop* e nei così detti "siti quadruplex" (Simmonds, 2020).

Le sequenze IR che si trovano al 5' UTR formano 5 strutture a *stem-loop*, denominate da SL1 a SL5, che conferiscono stabilità alle strutture secondarie e risultano conservate nelle diverse varianti virali (Miao *et al.*, 2021). I G-Quadruplex sono strutture composte da quattro guanine che si assemblano prima in una forma planare quadrata e poi si impilano formando la struttura secondaria. Si ritiene che i G-Quadruplex siano di fondamentale importanza non soltanto per il virus poiché sono coinvolti nella replicazione e nell'assemblaggio dei virioni, ma anche per l'ospite, perché rendono visibile il virus al sistema immunitario modulando quindi anche la risposta (Kadam *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

1.3 Proteine virali

Come detto in precedenza, il genoma di SARS-CoV-2 codifica per 16 proteine non strutturali, 4 proteine strutturali e 6 proteine accessorie (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10) (V'kovski *et al.*, 2021). Le proteine non strutturali derivano dalla traduzione delle ORF1a e ORF1b e insieme alle proteine accessorie contribuiscono alla replicazione dell'RNA di SARS-CoV-2 nella cellula infettata.

Vengono inizialmente sintetizzate la proteasi *papaine-like* nsp3 e la proteasi principale nsp5, responsabili della scissione delle due poliproteine in 16 nsp. Successivamente, nsp12 con il suo dominio RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRp) unitamente ai cofattori nsp7 e nsp8 andrà a formare l'RTC che consentirà la trascrizione degli sgRNA dalla cui traduzione saranno sintetizzate le proteine strutturali e accessorie (Kadam *et al.*, 2021).

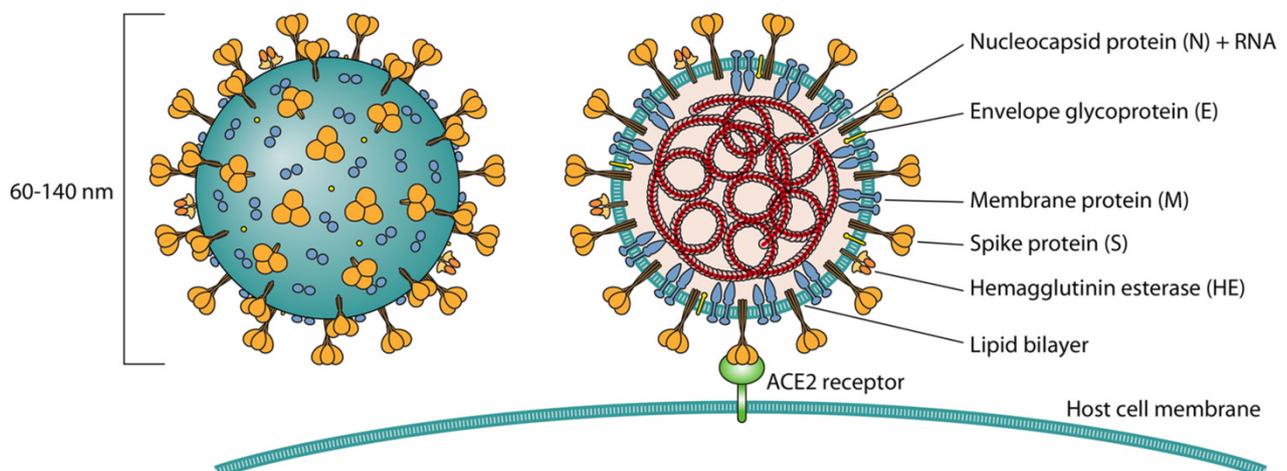


Figura 4. Rappresentazione della struttura del virione di SARS-CoV-2 (Safiabadi Tali *et al.*, 2021).

La glicoproteina spike (S) è una proteina omotrimerica di 200 nm, presente in numerose copie sull'envelope e ha come funzione principale quella di riconoscere il recettore sulla membrana della cellula ospite (Cohen, Lin and Machamer, 2011; Kalra and Kandimalla, 2021; Justo Arevalo *et al.*, 2023). Questa proteina è suddivisa in tre domini, un dominio transmembrana, un breve dominio intracellulare e le due subunità extracellulari S1 e S2 (Guan *et al.*, 2020). Tra la regione S1-S2 è presente un sito di scissione polibasico (PRRAR), che favorisce la scissione mediata dalla furina (Hoffmann *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020). Il taglio effettuato dalla furina porta ad avere sulla superficie dei virioni maturi una proteina che sarà composta da due subunità non covalentemente legate (Jackson *et al.*, 2022). La subunità S1, tramite il *receptor binding domain* (RBD), è responsabile del legame al recettore cellulare ACE2 mentre S2 media la fusione della membrana virale con quella cellulare, consentendo poi l'ingresso del virus nella cellula (Y. Huang *et al.*, 2020; Guruprasad, 2021). L'RBD rappresenta inoltre il target degli anticorpi neutralizzanti prodotti sia in risposta all'infezione che alla vaccinazione (Jackson *et al.*, 2022).

La proteina del nucleocapside è ampiamente conservata nella famiglia dei *Coronaviridae*. La funzione principale della proteina N è di legarsi all'RNA genomico, in modo da stabilizzarlo per formare una ribonucleoproteina (Zeng *et al.*, 2020). Questa proteina è prodotta abbondantemente durante il corso dell'infezione e risulta essere estremamente immunogenica (Smits *et al.*, 2021).

La proteina N è suddivisa in tre regioni conservate: un dominio N-terminale (NTD) responsabile del legame fra la proteina N e l'RNA virale (S. Kang *et al.*, 2020), un dominio di C-terminale (CTD) che media l'oligomerizzazione della proteina N e ne consente l'interazione con la proteina M (Kadam *et al.*, 2021) e infine una regione *linker* centrale che contribuisce a regolare l'interazione della proteina N con l'acido nucleico (Cubuk *et al.*, 2021). Questa proteina, oltre ad avere una funzione strutturale, sembra essere coinvolta nei meccanismi di evasione della risposta immunitaria, in particolare è stato ipotizzato un suo ruolo nella soppressione della risposta mediata dall'interferon (IFN) di tipo I, che rappresenta una prima linea di difesa contro i virus, mediante l'inibizione della via di segnalazione *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I) (K. Chen *et al.*, 2020).

La proteina di membrana (M) è una proteina con tre domini transmembrana che, interagendo con la ribonucleoproteina che deriva dall'interazione fra l'RNA genomico e la proteina N, modella la struttura del virione e ne regola l'assemblaggio e l'omeostasi. Insieme alla proteina Spike, è considerata una delle proteine più immunogeniche di SARS-CoV-2 (Zheng *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2021). Anche per questa proteina è stato dimostrato un ruolo inibitorio della risposta mediata dall'IFN. Questa inibizione è mediata dall'interazione con proteine appartenenti al *pathway* di RIG-I, che porta all'inibizione della fosforilazione e della traslocazione nucleare del fattore di trascrizione *interferon regulatory factor 3* (IRF3) (Zheng *et al.*, 2020; Fu *et al.*, 2021). Inoltre, la proteina M inibisce anche la fosforilazione della proteina *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1), modulando ulteriormente l'attività antivirale dell'IFN (Xia *et al.*, 2020).

La proteina E è la più piccola delle principali proteine strutturali (Y. Cao *et al.*, 2021) e consiste di un dominio transmembrana, un dominio N-terminale e un dominio C-terminale (Chai *et al.*, 2021). Il dominio transmembrana di questa proteina può formare eliche omopentameriche la cui oligomerizzazione porta alla formazione di un canale ionico (Mandala *et al.*, 2020). Pur essendo presente in basse quantità nelle particelle virali è abbondantemente espressa nelle cellule infettate. La proteina dell'envelope, attraverso l'interazione con la proteina M, contribuisce al mantenimento della struttura e al rilascio dei virioni maturi (El Omari *et al.*, 2019; Alsaadi, Neuman and Jones, 2020) e favorisce il processamento e la maturazione della proteina Spike promuovendone la permanenza nel compartimento intermedio fra il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi (ERGIC) (Boson *et al.*, 2020). Per quanto riguarda il ruolo nella risposta immunitaria, la proteina E legando il *Toll-like receptor* (TLR) 2 promuove la produzione di diverse citochine, tra cui interleuchina (IL)-1 β , IL-6 e *Tumor Necrosis Factor* (TNF) ed è un fattore di patogenicità (Y. Cao *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2021).

Il ruolo di RdRp è esercitato da un complesso costituito da nsp12, nsp7 e nsp8. Il dominio ad attività polimerasica è localizzato nel dominio N-terminale di nsp12 (Hillen *et al.*, 2020;

Peng *et al.*, 2020; Y. Gao *et al.*, 2020), nsp8 sembra aumentare la processività dell'enzima mentre la funzione esatta di nsp7 rimane ancora da definire (Hillen *et al.*, 2020).

Il ruolo delle proteine non strutturali è riassunto nella Tabella 1.

Proteina	Ruolo nel ciclo di replicazione virale	Ruolo nella risposta immunitaria dell'ospite
nsp1	Inibizione della sintesi proteica dell'ospite tramite un legame con la subunità ribosomiale 40S	Inibizione di RIG-I e ISG15
nsp2	Replicazione virale, trascrizione, inibizione della sintesi proteica dell'ospite	
nsp3	Proteasi <i>papain-like</i> , ruolo essenziale nell'RTC	Induzione della tempesta di citochine
nsp4	Formazione e mantenimento dell'organello delle vescicole a doppia membrana	
nsp5	Proteasi principale	Inibizione della risposta IFN indotta
nsp6	Formazione e mantenimento dell'organello delle vescicole a doppia membrana	
nsp7	Formazione dell'RTC, legame dell'ssRNA	
nsp8	Formazione dell'RTC	
nsp9	Formazione dell'RTC	Inibizione della risposta IFN indotta
nsp10	Formazione dell'RTC	
nsp11	Sconosciuto	
nsp12	RNA-polimerasi RNA-dipendente, formazione dell'RTC	
nsp13	Elicasi, <i>capping</i> dell'RNA	Inibizione della risposta IFN indotta
nsp14	Attività di <i>proofreading</i> (in associazione a nsp10)	
nsp15	Endoribonucleasi	Inibizione della risposta IFN indotta
nsp16	Metilazione dell'estremità 5' dell'RNA virale	

Tabella 1. Ruolo delle proteine non strutturali codificate dal genoma di SARS-CoV-2.

Fra le proteine accessorie la ORF3 svolge un ruolo nelle fasi finali del ciclo di replicazione virale, in particolare, favorisce il rilascio dei nuovi virioni tramite esocitosi (Chen *et al.*, 2021), inoltre è in grado di influenzare la risposta infiammatoria sia stimolando la produzione di

citochine pro-infiammatorie (IFN- β , IL-6 e IL-1 β) (Tian *et al.*, 2021) che sopprimendo il *pathway* mediato dall' IFN- α inibendo la fosforilazione di STAT1 (Xia *et al.*, 2020). Numerose proteine accessorie sono responsabili dell'inibizione della risposta immunitaria. ORF6 ritardando la produzione dell'IFN- β e il *signaling* a valle, garantisce al virus un tempo sufficiente alla propria replicazione (Lei *et al.*, 2020; Miorin *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020).

La proteina ORF7a, grazie alla sua struttura simile a quella delle immunoglobuline, attraverso un'interazione con i monociti CD14+ limita la presentazione dell'antigene (Zhou *et al.*, 2021), stimola la produzione di numerose citochine infiammatorie mediata dal fattore di trascrizione *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) e allo stesso tempo bloccando la fosforilazione di STAT2 inibisce la via dell'IFN di tipo I (Xia *et al.*, 2020).

Infine, ORF8, interagendo con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC-I) ne riduce l'espressione sulla superficie cellulare, pertanto le cellule infettate non sono riconosciute in maniera efficiente dai linfociti T citotossici (Zhang *et al.*, 2021). Anche ORF8 agisce come un antagonista degli IFN di tipo I con un conseguente blocco dell'*interferon-stimulated response element* (ISRE) (Li *et al.*, 2020).

1.4 Modalità di trasmissione e ciclo di replicazione

SARS-CoV-2 viene trasmesso tramite *droplet*, ovvero goccioline di muco o saliva, con una dimensione maggiore di 5 μ m che sono rilasciate dagli individui infettati dal virus (Sindhuja, Kumari and Kumar, 2022). La trasmissione per via respiratoria può verificarsi anche quando vengono prodotti degli aerosol, di dimensioni inferiori rispetto ai *droplet* che rimanendo nell'aria più a lungo possono essere inalate in particolari situazioni, come in caso di procedure mediche quali la broncoscopia, l'intubazione endotracheale e la rianimazione cardio-polmonare (Parasher, 2021). Meno di frequente la trasmissione può avvenire attraverso oggetti e superfici contaminate da persone infette (Kutti-Sridharan *et al.*, 2020; Parasher, 2021). Le vie di trasmissione proposte per SARS-CoV-2 sono schematizzate nella Figura 5.

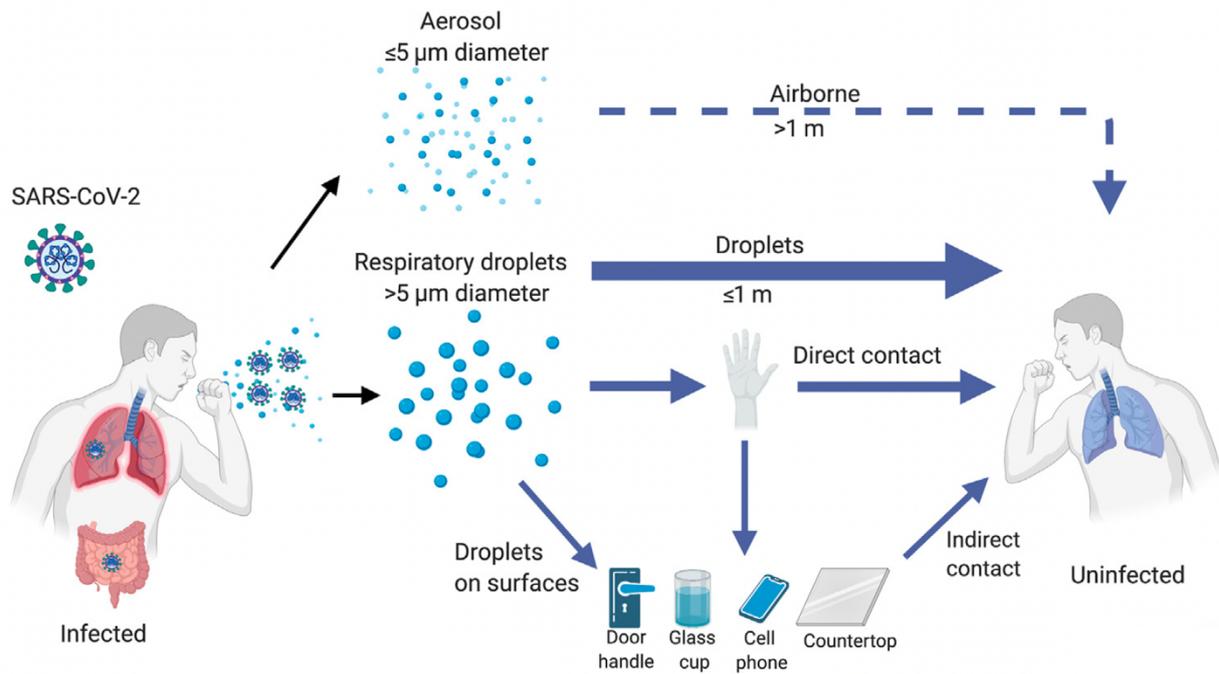


Figura 5. Vie di trasmissione proposte per SARS-CoV-2. Immagine modificata da (Harrison, Lin and Wang, 2020).

Dopo il suo ingresso nell'organismo, SARS-CoV-2 può infettare le cellule epiteliali della cavità nasale o del tratto respiratorio inferiore (Jackson *et al.*, 2022). L'ingresso nella cellula è mediato dall'adesione fra la proteina Spike e il recettore ACE2. Poiché questo recettore è espresso da numerosi tipi cellulari, tra cui le cellule endoteliali, le cellule del tratto gastrointestinale, del cuore e del fegato, è stato ipotizzato che a questo sia legato il danno multiorgano che si può riscontrare in associazione all'infezione (Sungnak *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2022). In aggiunta, la presenza di corecettori consente a questo virus di infettare anche cellule con bassa espressione di ACE2, espandendone il tropismo ad altri tessuti umani (Gusev *et al.*, 2022). All'interazione recettore cellulare-antirecettore virale seguono quindi importanti cambiamenti conformazionali che determinano la fusione fra la membrana virale e quella cellulare con la formazione di un poro che consente al genoma di raggiungere il citoplasma (Jackson *et al.*, 2022).

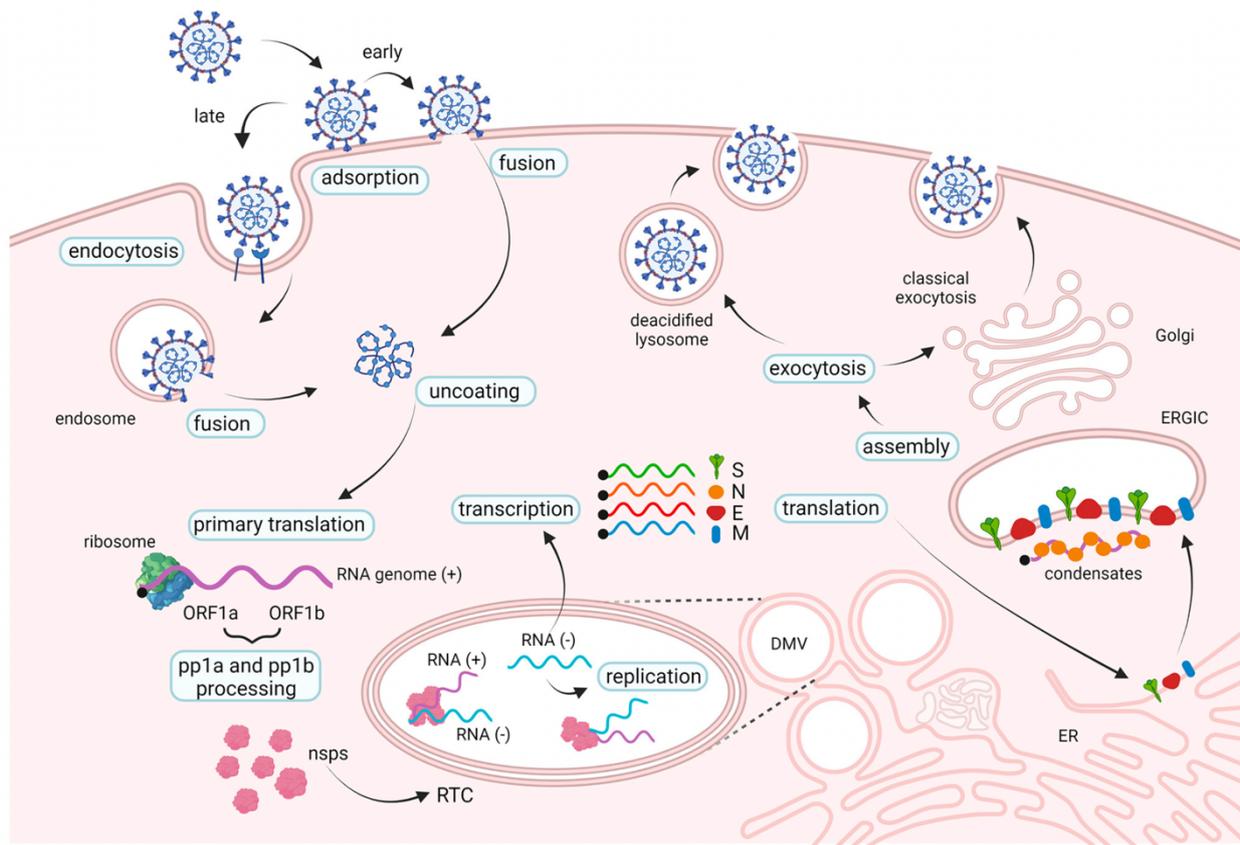


Figura 6. Ciclo di replicazione di SARS-CoV-2. Nell'immagine sono rappresentati entrambi i meccanismi di ingresso del virus nella cellula bersaglio (Pizzato *et al.*, 2022).

L'RBD è responsabile dell'interazione con ACE2 e, dopo il riconoscimento, S2 media la fusione con la membrana della cellula bersaglio. Una volta che l'RBD entra in contatto con ACE2 avviene un cambiamento conformazionale irreversibile, si verifica infatti il passaggio della proteina S da uno stato chiuso a uno stato aperto che rende l'RBD più esposto consentendo la successiva fusione della membrana del virione con quella della cellula ospite (Walls *et al.*, 2020). In particolare, dopo l'interazione con il recettore, viene esposto un sito di taglio della subunità S2 chiamato S2', il cui clivaggio da parte della serin proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2) permette il rilascio del peptide fusogeno che da inizio al processo di formazione del poro. SARS-CoV-2 possiede un secondo meccanismo d'ingresso nella cellula ospite che si può verificare nel momento in cui il complesso virus-ACE2 non incontra sulla membrana cellulare TMPRSS2. In questo caso, il virus è internalizzato per endocitosi mediata da clatrina dove il taglio del sito S2' è effettuato dalla catepsina L, che richiede per la sua attività un ambiente acido, come quello che si ritrova appunto negli

endolisosomi. Anche in questo caso, in seguito al taglio di S2', avviene la dissociazione delle subunità S1 e S2, a cui segue la fusione delle membrane, il rilascio del genoma nel citoplasma dove avverrà la scapsidazione e la replicazione (Jackson *et al.*, 2022).

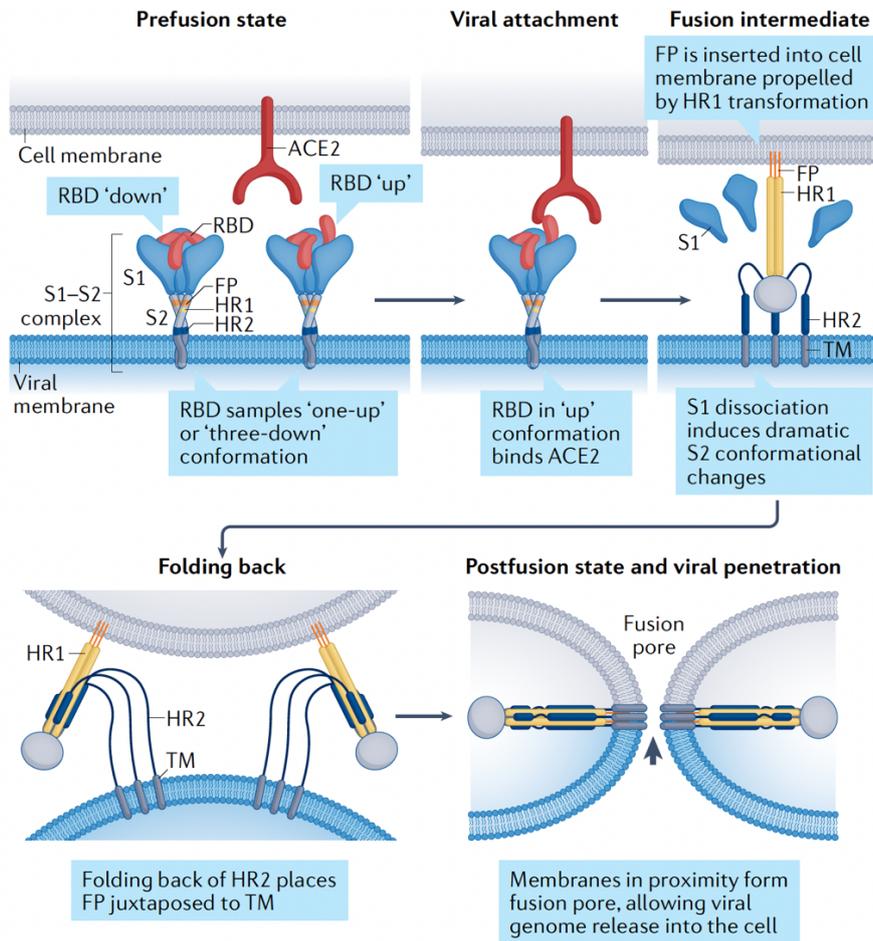


Figura 7. Modello del meccanismo di fusione indotto dalla proteina Spike. È rappresentata la transizione dalla conformazione pre-fusione alla conformazione post-fusione (Jackson *et al.*, 2022).

Il genoma a ssRNA (+) è riconosciuto dai ribosomi come un mRNA e viene immediatamente tradotto nelle due poliproteine, pp1a e pp1ab che saranno processate nelle varie proteine non strutturali (Finkel *et al.*, 2021). Una delle prime proteine ad essere prodotta è nsp1 che blocca la traduzione dell'mRNA della cellula ospite, mentre la replicazione e la trascrizione sono guidate dalle attività enzimatiche di nsp12, nsp13, nsp14 e nsp16 (Schubert *et al.*, 2020). La sintesi degli antigenomi complementari all'ssRNA (+) e degli sgrNA a polarità negativa avviene all'interno di vescicole a doppia membrana (DMV) che si formano in prossimità del reticolo endoplasmatico (ER) (Knoops *et al.*, 2008). La localizzazione all'interno delle DMV

permette alle componenti virali di eludere la risposta immunitaria dell'ospite poiché costituisce una barriera fisica nei confronti dei recettori dell'immunità che si trovano nel citoplasma. La formazione delle DMV è indotta dall'attività di nsp4 e nsp6, sebbene i meccanismi alla base della loro biosintesi non siano stati totalmente chiariti (Brant *et al.*, 2021). Similmente a quanto osservato per altri coronavirus, all'interno delle DMV si assembla l'RTC che attraverso un meccanismo di sintesi continua porta alla produzione degli RNA genomici e tramite un meccanismo di sintesi discontinua consente, a partire dagli sgRNA (-), la trascrizione degli mRNA che codificano per le proteine strutturali e accessorie (Hussain *et al.*, 2005). Questo meccanismo di sintesi discontinua sembra essere mediato dall'interazione fra la sequenza TRS-L al 5' del genoma e le sequenze TRS-B che si trovano in corrispondenza di ciascuna ORF che codifica per le proteine strutturali e accessorie (Hussain *et al.*, 2005; Sawicki, Sawicki and Siddell, 2007; Wu and Brian, 2010; Kim *et al.*, 2020; Ziv *et al.*, 2020; D. Wang *et al.*, 2021).

Le proteine strutturali neosintetizzate traslocano dal reticolo endoplasmatico attraverso il compartimento ERGIC, dove avverrà l'interazione con la ribonucleoproteina. Infine, i virioni maturi sono liberati dalla cellula infettata tramite esocitosi (de Haan and Rottier, 2005; Stertz *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2020). È stato proposto, per diversi coronavirus, un ruolo della proteina ORF3a in molteplici passaggi coinvolti in questo processo (Ziebuhr, 2004; de Wit *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2021).

1.5 Variabilità di SARS-CoV-2

Gli eventi di ricombinazione genetica nei coronavirus determinano cambiamenti della virulenza nel corso dell'infezione e possono essere responsabili della comparsa di nuovi virus (Su *et al.*, 2016).

Il tasso di mutazione di SARS-CoV-2 è stimato essere attorno a $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-6}$ mutazioni per nucleotide per ciclo di replicazione come precedentemente osservato in altri *Betacoronavirus* (Loewe and Hill, 2010; Sanjuán *et al.*, 2010; Fehr and Perlman, 2015; Sanjuán and Domingo-Calap, 2016; Amicone *et al.*, 2022). Sebbene questo tasso di mutazione non sia particolarmente alto, l'elevata trasmissibilità, la presenza di numerosi casi asintomatici

(Alene *et al.*, 2021), l'ampio spettro di ospiti disponibili alla sua replicazione (Fang *et al.*, 2020; Mahdy, Younis and Ewaida, 2020) e le pressioni ambientali dovute ad iniziali bassi tassi di vaccinazione unitamente a numerosi cambiamenti nelle politiche di contenimento dell'infezione, hanno consentito a SARS-CoV-2 di accumulare un elevato numero di mutazioni in breve tempo. Di notevole rilevanza sono indubbiamente le mutazioni associate alla proteina Spike poiché sono in grado di influenzare la trasmissione da uomo a uomo, nonché il passaggio da uomo ad animale, patogenicità e virulenza (Dubey *et al.*, 2021). La capacità di mutare in brevissimo tempo è dovuta sia alla massiccia replicazione durante l'infezione che alla durata della stessa. L'*antigenic drift* interessa più di frequente le proteine superficiali poiché sono quelle maggiormente esposte alla pressione selettiva dell'ospite, indotta ad esempio dalla produzione di anticorpi neutralizzanti (Tortorici and Veessler, 2019). Il tasso di mutazione più elevato è stato riscontrato nelle regioni che codificano per la subunità S1 e in particolare per il dominio RBD, un trend già osservato per altri coronavirus umani (Bush, 2001; Gallaher, 2020; Singh *et al.*, 2021).

Dopo circa un anno dalla comparsa dei primi casi di infezione da SARS-CoV-2 sono emerse nuove varianti virali che si sono ben presto diffuse a livello globale. L'Organizzazione Mondiale della Sanità classifica queste varianti in due categorie principali, le *Variants of Interest* (VOI) e le *Variants of Concern* (VOC). Le VOI sono varianti virali con mutazioni che possono essere potenzialmente associate a una malattia più severa e all'elusione della risposta immunitaria dell'ospite, mentre le VOC sono caratterizzate da una più elevata trasmissibilità ed alterazioni delle manifestazioni cliniche, con un associato aumento delle ospedalizzazioni e dei decessi. Inoltre, è stata osservato per queste varianti, un basso tasso di neutralizzazione da parte degli anticorpi prodotti nel corso delle infezioni pregresse, una più bassa efficacia delle terapie e dei vaccini e la possibilità di errori nella rilevazione del virus da parte dei test diagnostici (*Coronavirus disease (COVID-19): Variants of SARS-COV-2*). Le VOC che si sono succedute durante il corso della pandemia sono state Alpha, Beta, Gamma, Delta e Omicron con tutti i suoi successivi *sublineage*.

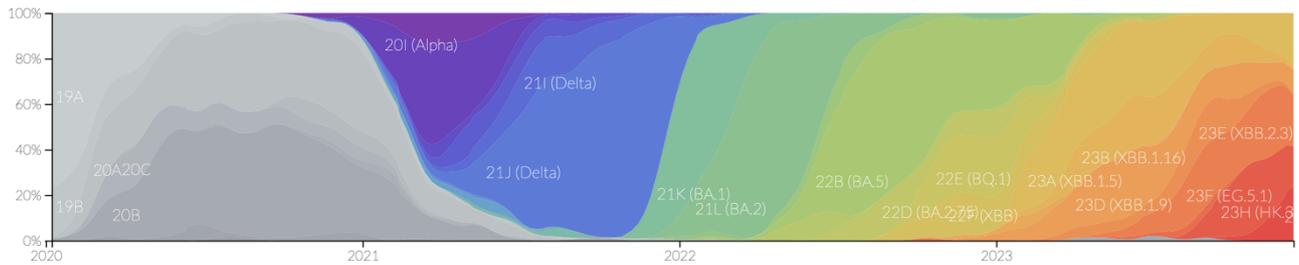


Figura 8. Nell’immagine è rappresentata la prevalenza delle varianti a partire da Gennaio 2020 fino a Dicembre 2023 (Nextstrain).

La variante Alpha (B.1.1.7) (Fig.9) è diventata dominante a livello globale a partire da dicembre 2020. Le sue mutazioni, in particolare la N501Y nell’RBD della proteina Spike ne hanno aumentato la trasmissibilità, favorendo l’affinità di legame con ACE2 (Leung *et al.*, 2021). La mutazione D614G, presente in tutte le varianti di SARS-CoV-2, stabilizza, come la N501Y, la conformazione aperta della proteina S, ma non è associata ad un aumento dell’affinità di legame con il recettore. Inoltre, questa mutazione comporta una maggiore infettività, un carico virale più elevato ma non a una sintomatologia più severa (Korber *et al.*, 2020). Un’altra mutazione rilevante è la delezione in posizione 69-70 sulla Spike, che può alterare l’efficacia di trattamenti basati sull’uso di anticorpi (Kemp *et al.*, 2021) e che è stata associata a falsi negativi in seguito all’uso di alcuni test di Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) (Galloway *et al.*, 2021).

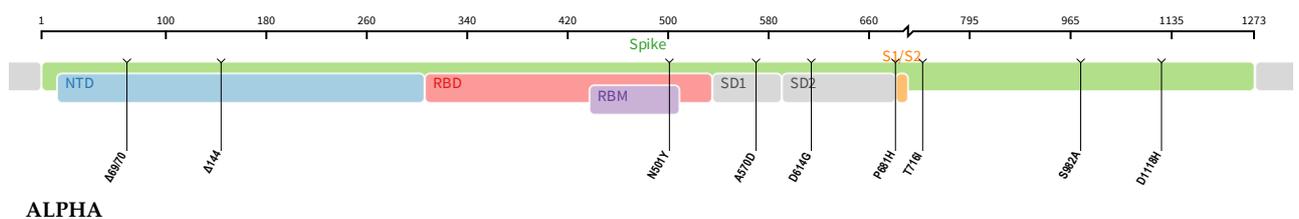


Figura 9. Mutazioni amminoacidiche principali della proteina Spike della variante Alpha (Tzou *et al.*, 2022).

La variante Beta (B.1.351) (Fig.10) condivide con la variante Alpha le due mutazioni a carico dell’RBD, N501Y e D614G, responsabili di un’aumentata trasmissibilità. Questa variante si è rivelata resistente al trattamento con alcuni anticorpi monoclonali e al plasma di pazienti precedentemente infettati dal ceppo wild-type (WT) del virus. Queste caratteristiche sono state associate principalmente alla sostituzione E484K, (Cele *et al.*, 2021; M. Hoffmann *et al.*,

2021; P. Wang *et al.*, 2021) che in associazione ad altre mutazioni contribuisce ad aumentare di 3,7 volte l'affinità di legame con ACE2 (Barton *et al.*, 2021; Greaney *et al.*, 2021).

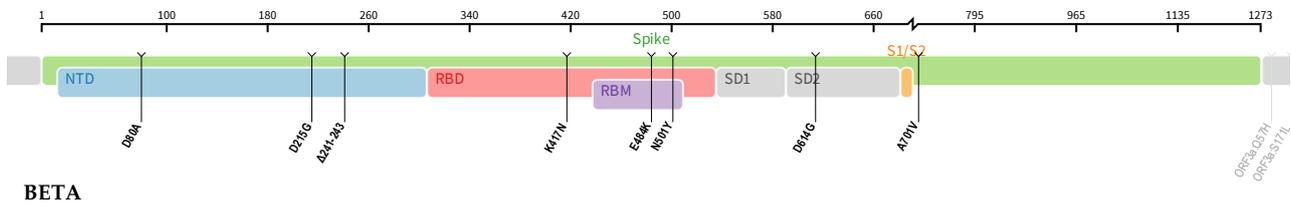


Figura 10. Mutazioni amminoacidiche principali della proteina Spike della variante Beta (Tzou *et al.*, 2022).

Da gennaio 2021 si è affermata come VOC la variante Gamma (P.1) (Fig.11) che condivide con Beta le mutazioni E484K e N501Y (Faria *et al.*, 2021). Con la comparsa di questa variante si è assistito a una diminuzione dei casi di anosmia e disgeusia, mentre sono stati osservati più di frequente sintomi simili al raffreddore comune (Luna-Muschi *et al.*, 2022). Anche Gamma si è dimostrata resistente al trattamento con alcuni anticorpi monoclonali (McCallum *et al.*, 2021) e al plasma iperimmune di pazienti infettati con il ceppo WT, in questo caso per la presenza delle mutazioni K417T e L18F, confermando quindi la possibilità di reinfezione (M. Hoffmann *et al.*, 2021).

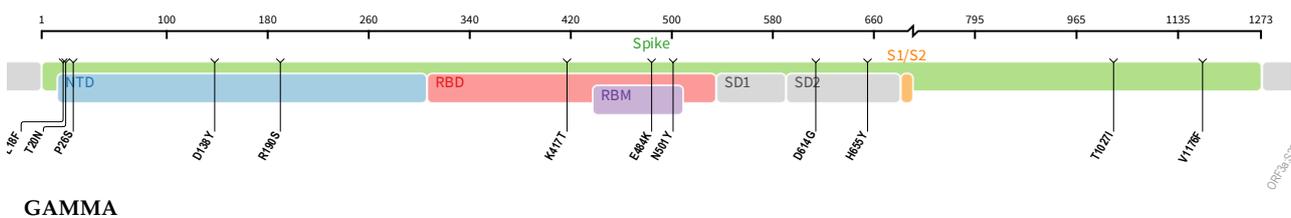


Figura 11. Mutazioni amminoacidiche principali della proteina Spike della variante Gamma (Tzou *et al.*, 2022).

La variante Delta (Fig.12) si è affermata come variante dominante intorno alla metà del 2021. Le mutazioni caratteristiche di questa variante sono T478K, P681R e L452R che anche in questo caso ne hanno aumentato la trasmissibilità (Planas *et al.*, 2021). Anche per Delta è stata osservata una ridotta risposta agli anticorpi neutralizzanti prodotti sia da pazienti con pregressa infezione che in seguito a vaccinazione (Deng *et al.*, 2021). La mutazione P681R è stata associata da studi *in vivo* ad aumentata patogenicità (Saito *et al.*, 2022), mentre la T478K,

favorendo l'interazione con ACE2 comporta un aumento dell'infettività (Muecksch *et al.*, 2021).

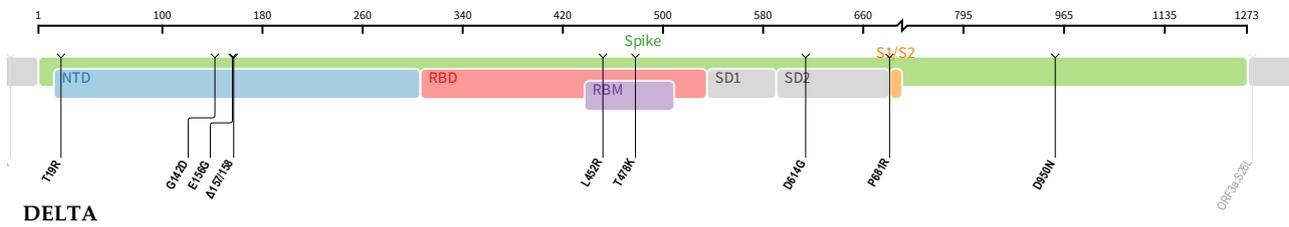


Figura 12. Mutazioni amminoacidiche principali della proteina Spike della variante Delta (Tzou *et al.*, 2022).

Alla fine del 2021 sono stati registrati i primi casi di variante Omicron (Fig.13), una variante particolarmente divergente per l'elevato numero di mutazioni che le hanno conferito un'aumentata trasmissibilità. Sono state identificate circa 30 mutazioni solo a carico della proteina S, 15 delle quali nel dominio RBD, associate a una maggiore trasmissibilità e a cambiamenti nella severità dei sintomi (He *et al.*, 2021). Omicron è la variante di SARS-CoV-2 con il maggior numero di mutazioni e la sua elevata trasmissibilità in associazione alla capacità di eludere la risposta immunitaria hanno sollevato importanti preoccupazioni a livello globale al momento della sua identificazione. Il suo elevato tasso di trasmissibilità ha comportato una rapida sostituzione di Delta come variante dominante in numerose regioni, ciononostante, a causa del suo tropismo cellulare alterato, Omicron ha una patogenicità ridotta rispetto alle altre varianti (Tzou *et al.*, 2022). Studi di filogenesi hanno provato che pur condividendo numerose mutazioni con le varianti che l'hanno preceduta, Omicron non si sarebbe evoluta da esse (Chaguzza *et al.*, 2023). È stato ipotizzato che possa essersi evoluta a causa dei lunghi periodi di infezione da SARS-CoV-2 negli individui immunocompromessi (Cele *et al.*, 2021). A partire dalla variante B.1.1.529, si sono evoluti numerosi *sublineage* di Omicron, fra questi, le varianti BA.1, BA.4 e BA.5 avendo in comune con Alpha la delezione 69-70, che, come detto in precedenza, potevano essere associate a falsi negativi in alcuni saggi di Real Time PCR (Galloway *et al.*, 2021).

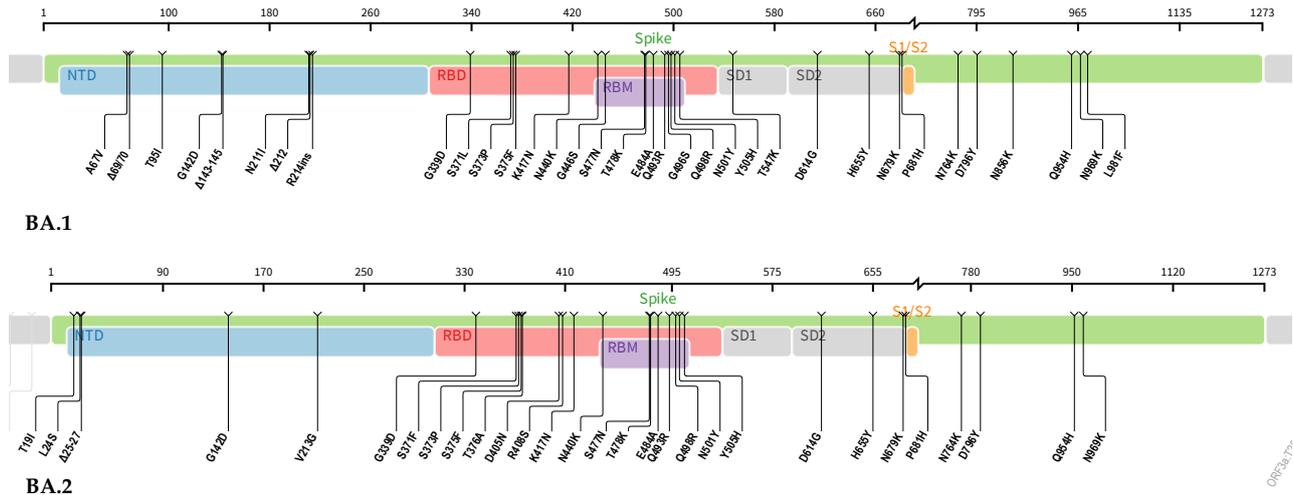


Figura 13. Mutazioni amminoacidiche principali della proteina Spike dei primi due *sublineage* di Omicron: in alto è raffigurata BA.1 e in basso BA.2 (Tzou *et al.*, 2022).

1.6 Patogenesi

Durante le prime fasi dell'infezione da SARS-CoV-2, il virus è direttamente responsabile del danno tissutale mentre nelle fasi successive questo danno è mediato prevalentemente dalla risposta immunitaria dell'ospite (Casella *et al.*, 2023).

Il danno causato dall'infezione da SARS-CoV-2 interessa in particolar modo le cellule alveolari di tipo 2, che hanno un ruolo fondamentale nella produzione del surfattante e sono coinvolte nel riparo dei tessuti danneggiati. (Sindhuja, Kumari and Kumar, 2022). Le componenti virali agiscono come *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) stimolando la risposta del sistema immunitario innato. L'RNA virale è riconosciuto nel citoplasma dai recettori RIG-I, *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) e dalla GMP-AMP ciclico sintasi (cGAS), mentre a livello delle membrane è riconosciuto dai TLR; il riconoscimento da parte di questi sensori induce a valle una produzione di citochine, in particolare di IFN-I. Numerose altre citochine sono prodotte in seguito all'infezione causando la tempesta di citochine associata al peggioramento delle condizioni dei pazienti (Tahaghoghi-Hajghorbani *et al.*, 2020).

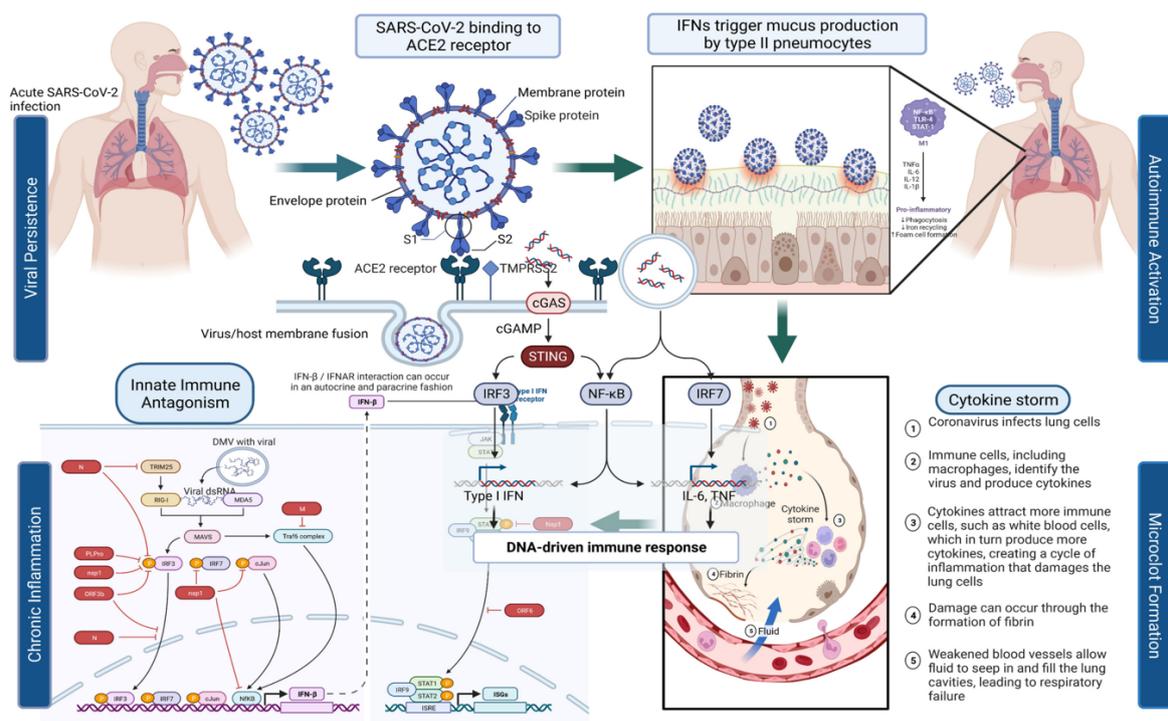


Figura 14. Meccanismi di risposta dell'ospite all'infezione da SARS-CoV-2 (Sherif *et al.*, 2023).

L'infezione da SARS-CoV-2 culmina in un tipo peculiare di morte cellulare programmata, la piroptosi, un meccanismo che comporta la scissione della gasdermina (GSDM), a cui segue la formazione di pori sulla membrana cellulare con conseguente lisi e morte cellulare con fuoriuscita del contenuto della cellula (Niu *et al.*, 2022). Studi di RNA sequencing condotti su tessuto polmonare hanno rivelato che in seguito all'infezione c'è un'upregolazione della proteina *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3), appartenente alla famiglia dei *Pattern Recognition Receptor* (PRR), il cui ruolo è quello di riconoscere le componenti virali unitamente ai *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMP), in modo da indurre la via dell'inflammasoma (Bittner *et al.*, 2022; Lamers and Haagmans, 2022; Wang *et al.*, 2022). Nello specifico, si assiste all'attivazione di due caspasi (CASP) infiammatorie, CASP1 e CASP11, che, come accennato in precedenza, sono responsabili del clivaggio della Gasdermina D (GSDMD) nei suoi due domini C-terminale e N-terminale (GSDMD-N). Quest'ultimo è in grado di oligomerizzare formando dei pori sulla membrana plasmatica che consentono l'ingresso di ioni ed acqua portando quindi a morte cellulare.

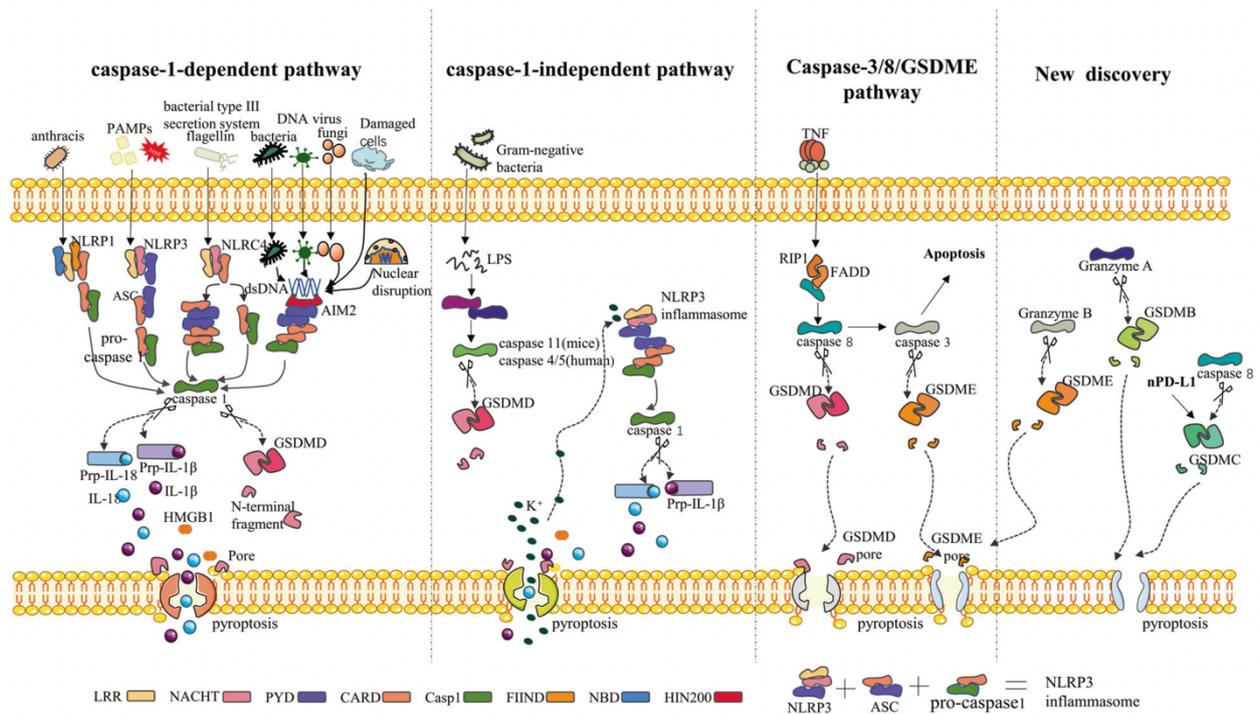


Figura 15. Meccanismi molecolari della piroptosi. PAMPs: pathogen-associated molecular patterns, NLRP1/3 NLR: pyrin domain-containing 1/3, NLR: nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing protein, NLRC4: NLR CARD domain-containing 4, ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, CARD: caspase recruitment domain, AIM2: absent in melanoma 2, PYD: pyrin domain, NBD: nucleotide-binding domain, LRR: leucine-rich repeat (Wu *et al.*, 2022).

Contestualmente vengono rilasciate numerose citochine infiammatorie quali IL-1 β e IL-18 (Tang, Comish and Kang, 2020; Shimizu, Nakamura and Kawakami, 2021) che insieme al rilascio di IL-6, IL-8 e TNF da parte del tessuto danneggiato, porteranno all'attivazione di una risposta cellulare T-helper di tipo 1 (Carosi *et al.*, 2021; Hu, Huang and Yin, 2021).

Il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte dei monociti causa l'apoptosi delle cellule polmonari, mentre la produzione di chemochine e citochine da parte dei macrofagi aumenta la permeabilità capillare con conseguente reclutamento dei neutrofili. La massiccia infiltrazione di macrofagi e neutrofili nel tessuto polmonare esacerbata da un segnale interferonico debole o ritardato (Borczuk and Yantiss, 2022; Zanza *et al.*, 2022) induce danni permanenti agli pneumociti. L'esito finale di questi eventi è una tras migrazione delle proteine del sangue con conseguente edema alveolare e interstiziale (Batah & Fabro, 2021).

Il danno alveolare è quindi immuno-mediato e può nei casi più severi sfociare nell'*Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), una grave insufficienza respiratoria (Cascella *et al.*, 2023).

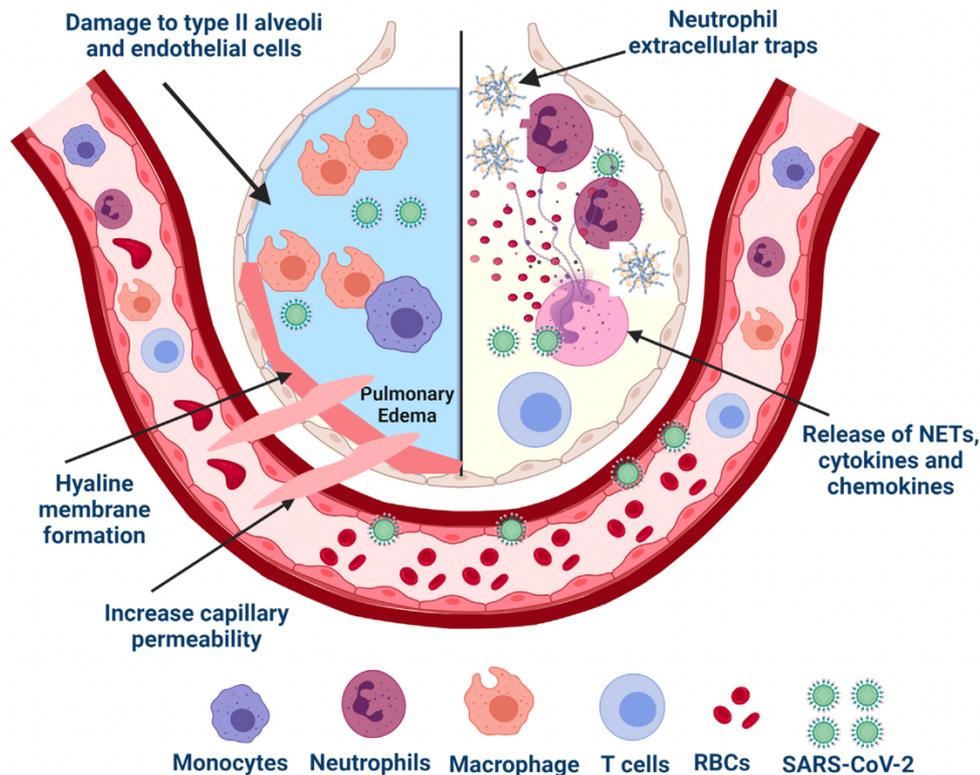


Figura 16. Meccanismi fisiopatologici del danno alveolare diffuso e della sindrome da distress respiratorio acuto (Sindhuja, Kumari and Kumar, 2022).

1.7 COVID-19 e risposta immunitaria indotta dall'infezione

A novembre 2023, l'OMS riporta più di 700 milioni di casi confermati di COVID-19 e quasi 7 milioni di decessi. Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche dell'infezione, queste risultano essere estremamente variabili e vanno da un decorso asintomatico fino a una malattia a rapida progressione che può portare al decesso entro poche settimane dall'insorgenza dei sintomi. Sebbene una gran parte degli individui infettati sia asintomatica (Hoehl *et al.*, 2020; X. Lu *et al.*, 2020) o paucisintomatica, alcuni soggetti possono sviluppare polmonite interstiziale, che può progredire verso l'insufficienza respiratoria e ARDS, con necessità di ventilazione meccanica e ricovero nelle unità di terapia intensiva (Grasselli *et al.*, 2020; Lippi *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

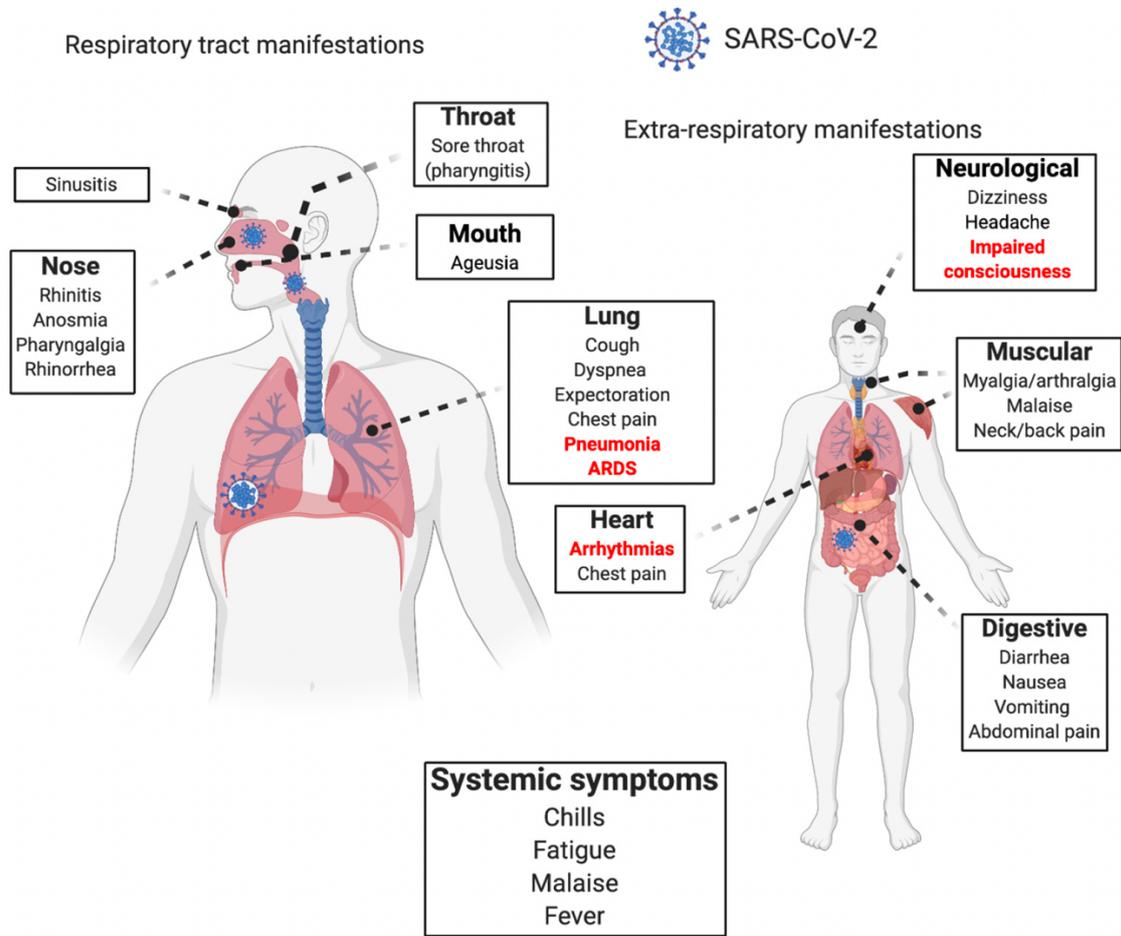


Figura 17. Manifestazioni cliniche del COVID-19 (Harrison, Lin and Wang, 2020).

Il decorso della malattia può essere diviso in diverse fasi che ripercorrono la gravità dei sintomi. Il periodo d'incubazione, pur avendo subito delle variazioni con l'avvicinarsi delle varianti, è in media di 4-5 giorni (Galmiche *et al.*, 2023), dopodiché, nonostante molti individui continuino ad essere asintomatici, nei casi in cui si ha una sintomatologia, questa si presenta in genere con mal di testa, mal di gola, tosse secca, raffreddore e febbre (CDC, 2020; Carosi *et al.*, 2021; Borczuk and Yantiss, 2022; Martora *et al.*, 2023). Se il sistema immunitario è in grado di controllare questa "fase di infezione precoce", il decorso della malattia è benigno, altrimenti l'infezione evolve nella così detta "fase polmonare". In questa fase si osservano alterazioni a livello dei polmoni associate sia all'effetto citopatico del virus che alla risposta dell'ospite. I sintomi respiratori in questo caso sono più severi e si può avere polmonite interstiziale che può determinare insufficienza respiratoria acuta. In alcuni soggetti la malattia può evolvere nella "fase iperinflammatoria" caratterizzata da tempesta

di citochine. Quando la malattia arriva a questa fase si possono avere conseguenze sia a livello polmonare che sistemico (Carosi *et al.*, 2021).

In base alla severità dei sintomi, si può classificare la malattia da COVID-19 in tre gruppi principali: non grave, grave e critica.

L'infezione non grave è definita come assenza di sintomi gravi o critici, in cui si ha una saturazione di ossigeno <90% in aria ambiente, polmonite e segni di grave distress respiratorio. Come detto in precedenza, la maggior parte delle persone infettate presenta una malattia lieve, la malattia grave si verifica nel 15% dei pazienti, mentre il 5% presenta una malattia critica. I pazienti critici oltre ad ARDS possono andare incontro a sepsi, shock settico e insufficienza multiorgano (Agarwal *et al.*, 2020; Long *et al.*, 2022). L'insufficienza respiratoria è riconosciuta come la principale causa di morte (85% dei casi) (F. Zhou *et al.*, 2020). La capacità di controllare l'infezione nei casi lievi e asintomatici è da attribuire alla risposta immunitaria innata, mentre la progressione verso le forme più severe risiede nel fallimento dei meccanismi di difesa di prima linea non specifici e/o al concomitante sviluppo di una risposta immunitaria acquisita che se non adeguatamente regolata può diventare deleteria per l'ospite, in particolare in presenza di comorbidità (Boechat *et al.*, 2021).

Il decorso della malattia è strettamente dipendente dalla presenza di condizioni infiammatorie pre-esistenti nonché dallo stato immunitario della persona infettata (Shi *et al.*, 2020). Un più elevato tasso di letalità è stato osservato nei soggetti anziani (J. Chen *et al.*, 2020), nei fumatori, negli obesi, nei pazienti con malattia renale cronica, con malattie cardiovascolari e nei pazienti oncologici (Flaherty *et al.*, 2020).

L'immunità innata è fondamentale nella protezione dall'infezione, tuttavia, come detto in precedenza può diventare deleteria in caso di una attivazione non controllata (Schulte-Schrepping *et al.*, 2020). Le sequenze del genoma virale ricche in GU sono riconosciute dal TLR7 nelle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC) e dal TLR8 nelle DC mieloidi e convenzionali (Salvi *et al.*, 2021). Questi recettori stimolano il rilascio di IFN da parte delle pDC, favoriscono la presentazione dell'antigene e quando viene a mancare una regolazione possono promuovere nelle fasi successive dell'infezione un'infiammazione incontrollata (Schultze and Aschenbrenner, 2021).

I macrofagi pro-infiammatori, che esprimono alti livelli di ACE2 (Muus *et al.*, 2021), dopo l'ingresso del virus rilasciano citochine e chemochine infiammatorie, tra cui *Chemokine (C-C motif) ligand 7* (CCL7), CCL8 e CCL13. A questo evento segue il reclutamento di linfociti T produttori IFN- γ e altre citochine che continuano ad attivare i macrofagi (Grant *et al.*, 2021). Con l'aumentare dell'età si assiste a un aumento dei macrofagi di tipo pro-infiammatorio e questo meccanismo contribuisce a motivare l'elevata incidenza di casi gravi di COVID-19 nelle persone anziane (van Beek *et al.*, 2019). Inoltre, nei pazienti che hanno forme severe di COVID-19 è stata dimostrata la presenza di granulociti e monociti alterati. In particolare, in questi soggetti, i monociti esprimono un ridotto livello di molecole MHC e un alto livello di allarmine e CD163 mentre i neutrofilii mostrano una over-espressione dei meccanismi associati alla formazione di trappole extracellulari (NET) (Schulte-Schrepping *et al.*, 2020; Wendisch *et al.*, 2021). La formazione dei NET porta al rilascio di citochine infiammatorie (IL-6) e chemochine (IL-8, CCL3) nonché di peptidi antimicrobici e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Sebbene questo processo abbia un ruolo protettivo, in caso di mancata degradazione dei NET può favorire i processi fisiopatologici intrappolando le cellule infiammatorie e prevenendo il reclutamento di cellule riparatrici dei tessuti (Schauer *et al.*, 2014; Knopf *et al.*, 2019; Yaykasli *et al.*, 2021). Anche le cellule Natural killer (NK) mostrano un'alterazione dell'attività antivirale con un'aumentata espressione di geni stimolati dall'IFN e una ridotta attività anti-fibrotica (Krämer *et al.*, 2021).

L'azione dall'immunità specifica è indispensabile all'eliminazione degli agenti patogeni e allo sviluppo della memoria immunologica. Questa risposta è mediata innanzitutto dai linfociti B che sono responsabili della produzione di varie classi di anticorpi, fra i quali IgM, IgA, IgG e IgE che rivestono un ruolo fondamentale nelle risposte immunitarie alle infezioni virali. Le IgA sono secrete nel tratto respiratorio e svolgono un ruolo chiave nell'immunità mucosale svolgendo un ruolo preventivo nei confronti dell'infezione. Dopo circa una settimana dall'infezione da SARS-CoV-2 si osserva la produzione di IgM (Denning, Kilcoyne and Ucer, 2020; Long *et al.*, 2020). Dopo due settimane dall'inizio dell'infezione compaiono anche le IgG, che richiedono tempi più lunghi per la loro maturazione, questo processo, che passa attraverso lo *switch* isotipico, è necessario per garantire una maggiore

capacità neutralizzante. Questa classe di anticorpi possiede rispetto a quelle descritte in precedenza un'emivita relativamente lunga nel siero ed è associata alla memoria dei linfociti B (Nakano *et al.*, 2021). I titoli di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2 diminuiscono rapidamente dopo l'infezione, questa caratteristica è associata a un'immunità transitoria e al rischio di reinfezioni. Gli anticorpi non sono l'unica componente dell'immunità adattativa coinvolta nel contrastare l'infezione da SARS-CoV-2, è indispensabile l'azione dell'immunità cellulare mediata dai linfociti T che riconoscono almeno 30 epitopi virali ed esibiscono una memoria sostenuta. Quando il *T-cell receptor* (TCR) dei linfociti T naïve interagisce con i peptidi di SARS-CoV-2 presentati dalle molecole MHC, vengono indotti la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T in cellule in grado di eliminare le cellule infettate dal virus e di favorire la produzione di anticorpi. Le molecole MHC di classe I attivano i linfociti T CD8+, mentre quelle di classe II attivano i linfociti T CD4+. Nei pazienti con forme severe di COVID-19 è stata osservata linfopenia, che può favorire la progressione della malattia (Wiersinga *et al.*, 2020). I linfociti T, in particolare i CD4+, isolati da questi pazienti mostravano una maggiore attivazione delle caspasi ed esposizione di fosfatidilserina, marcatori di morte per apoptosi (Bellesi *et al.*, 2020; André *et al.*, 2022). Questa circostanza può portare allo sviluppo di linfociti T CD8+ "impotenti", che vanno incontro ad *exhaustion* e hanno emivita breve (Hamilton *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2022), con conseguente perdita dell'attività citotossica (André *et al.*, 2022).

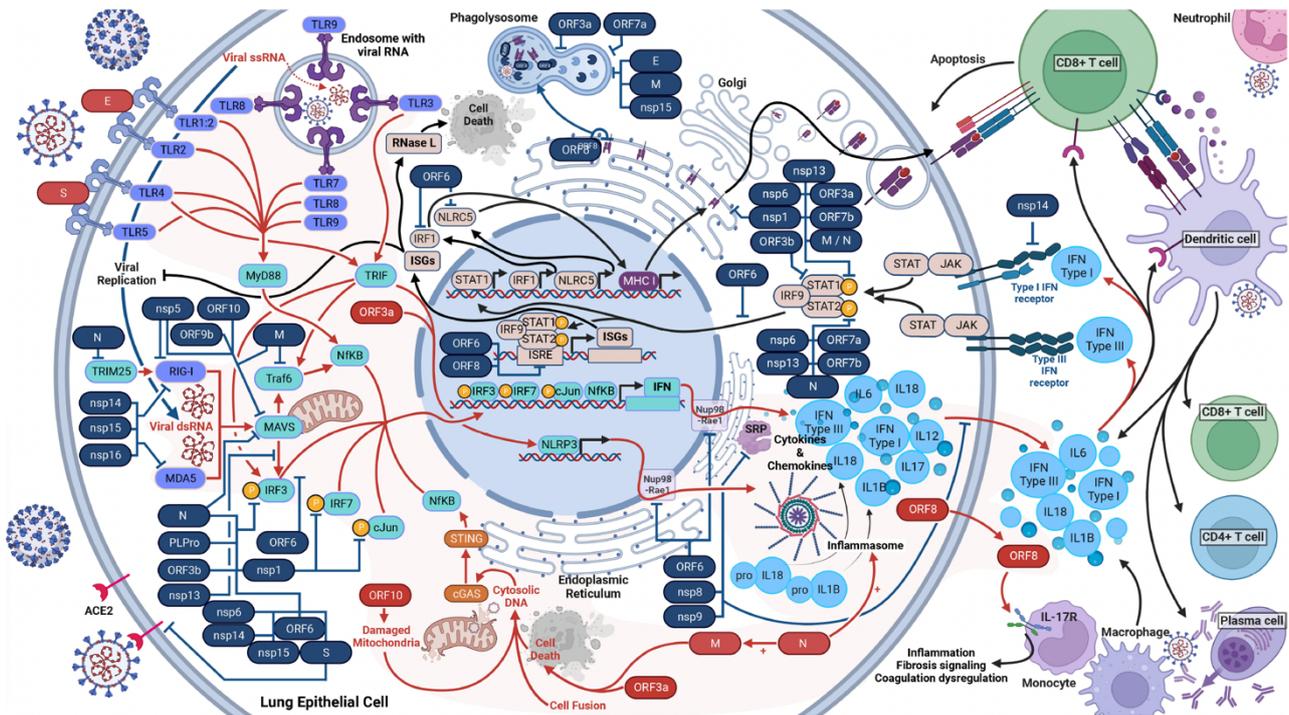


Figura 18. Vie di segnalazione coinvolte nella risposta immunitaria attivata da SARS-CoV-2 (Maison, Deng and Gerschenson, 2023).

1.8 Vaccinazione anti SARS-CoV-2

Le campagne di vaccinazione contro il COVID-19 hanno svolto un ruolo essenziale nella risposta alla pandemia, garantendo innanzitutto la protezione dalla malattia grave e consentendo di allentare nel tempo le misure di salute pubblica messe in atto in risposta all'emergenza, come le chiusure e l'uso obbligatorio di mascherine (Farsalinos *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2021; Narayanan *et al.*, 2023).

Ad oggi una gran parte della popolazione possiede un'immunità ibrida contro l'infezione da SARS-CoV-2, conseguenza di una protezione indotta sia dalla vaccinazione che da un'infezione progressa.

Così come la protezione conferita dall'infezione anche quella generata dai vaccini tende a diminuire nel tempo, quindi, non sono infrequenti le reinfezioni e può aumentare il rischio per le popolazioni fragili di andare incontro a forme severe di COVID-19 (Bobrovitz *et al.*, 2023). Per garantire quindi una protezione adeguata sono raccomandate dosi aggiuntive di vaccino anche se le tempistiche ideali rimangono ancora da definire.

I vaccini inizialmente prodotti sono stati progettati sul ceppo wild-type del virus SARS-CoV-2, tuttavia, il susseguirsi delle varianti ha reso necessario un aggiornamento, che ha reso attualmente disponibili vaccini in grado di fornire una protezione maggiore anche verso le sottovarianti di Omicron.

In Italia, dopo approvazione da parte dell'EMA (Agenzia europea per i medicinali) e dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), la campagna nazionale di vaccinazione anti COVID-19 per la stagione 2023/24 avviata dal Servizio Sanitario Nazionale si avvarrà dei nuovi vaccini adattati alla variante Omicron XBB.1.5 (Ministero della Salute).

Il Ministero della Salute Italiana ha pubblicato un "elenco dei gruppi di persone alle quali viene raccomandata la vaccinazione di richiamo con il nuovo vaccino aggiornato:

- Persone di età pari o superiore a 60 anni;
- Ospiti delle strutture per lungodegenti;
- Donne che si trovano in qualsiasi trimestre della gravidanza o nel periodo "postpartum" comprese le donne in allattamento;
- Operatori sanitari e sociosanitari addetti all'assistenza negli ospedali, nel territorio e nelle strutture di lungodegenza; studenti di medicina, delle professioni sanitarie che effettuano tirocini in strutture assistenziali e tutto il personale sanitario e sociosanitario in formazione;
- Persone dai 6 mesi ai 59 anni di età compresi, con elevata fragilità, in quanto affette da patologie o con condizioni che aumentano il rischio di COVID-19 grave.
- La vaccinazione viene consigliata a familiari, conviventi e caregiver di persone con gravi fragilità."

(Ministero della Salute)

Un parametro essenziale nello stabilire l'efficacia di un vaccino è innegabilmente la sua immunogenicità. Tale valutazione non può limitarsi esclusivamente al livello di anticorpi neutralizzanti generati; è essenziale analizzare l'effetto sull'immunità cellulo-mediata al fine di stimare la potenziale efficacia a lungo termine (*Clinical evaluation of new vaccines - Scientific guideline* | *European Medicines Agency*). Inoltre, l'immunogenicità è anche collegata alla

sicurezza e alla tollerabilità dei vaccini, che vanno accuratamente considerate quando si seleziona un vaccino per le popolazioni vulnerabili (Kudlay and Svistunov, 2022).

Al momento numerosi vaccini sono stati approvati e molti altri sono in fase di sviluppo.

I vaccini in fase di studio clinico si basano su diverse piattaforme, tra cui: subunità proteica, DNA, RNA, vettori virali, virus inattivato, *viral-like particles*, virus vivo attenuato, vettori virali replicanti combinati con cellule presentanti l'antigene. La maggior parte dei vaccini in fase di sperimentazione sono vaccini a subunità proteica (33%) e a RNA (23%) (Zasada *et al.*, 2023).

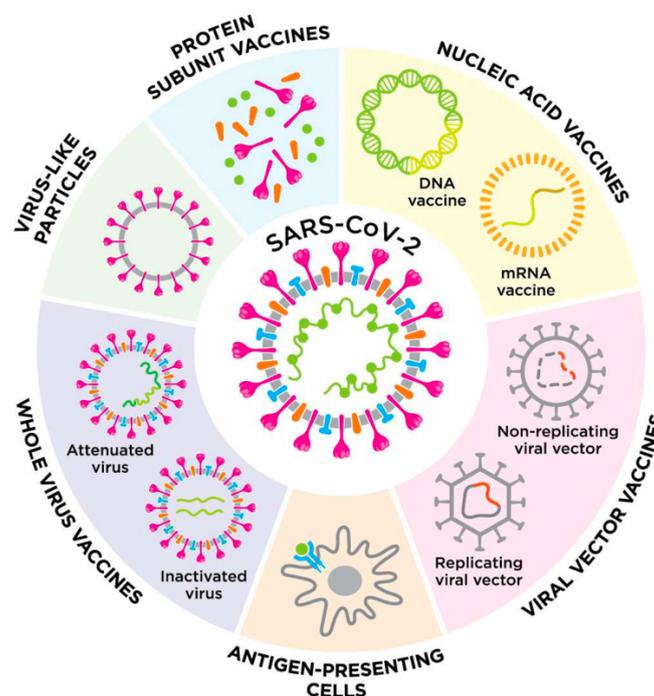


Figura 19. Panoramica delle piattaforme vaccinali contro il COVID-19 approvate e in corso di sviluppo (Kudlay and Svistunov, 2022).

Fra le tipologie di vaccini che hanno trovato un più largo impiego ci sono indubbiamente quelli a mRNA come Comirnaty/BNT162b2 prodotto da Pfizer-BioNTech e Spikevax/mRNA-1273 prodotto da Moderna.

Nei vaccini a mRNA “convenzionali” la regione codificante è fiancheggiata da regioni non tradotte al 5’ e al 3’ (Bloom, van den Berg and Arbutnot, 2021) e presenta delle modifiche che rendono la proteina Spike stabile nella sua conformazione pre-fusione.

Questo RNA non replicante è contenuto in nanoparticelle lipidiche che ne impediscono la degradazione e viene rilasciato nelle cellule dopo iniezione per via intramuscolare.

Una volta all'interno della cellula ospite, avviene la traduzione e viene sintetizzata la proteina Spike che sarà esposta sulla membrana cellulare. Questa esposizione consente la stimolazione la risposta immunitaria, che culmina nella produzione di anticorpi neutralizzanti e nell'attivazione della risposta cellulo-mediata, che forniranno protezione dall'infezione (Rauch *et al.*, 2018; Lundstrom, 2020; Creech, Walker and Samuels, 2021; Lamb, 2021). L'entità della risposta è direttamente proporzionale al numero di mRNA trascritti, che in caso dei vaccini a mRNA "convenzionali" può portare alla necessità di somministrazioni ripetute (Bloom, van den Berg and Arbuthnot, 2021).

I vaccini inattivati necessitano innanzitutto la propagazione del virus in coltura e la sua successiva inattivazione per mezzo di composti chimici che consentano comunque l'espressione degli epitopi antigenici (Creech, Walker and Samuels, 2021). Il virus così ottenuto viene usato per attivare la risposta immunitaria. Sebbene anche questa tipologia di vaccino si sia rivelata sicura è generalmente associata a un'immunità di breve durata che richiede pertanto frequenti richiami (Soiza, Scicluna and Thomson, 2021).

Fanno parte dei vaccini basati su vettori virali Sputnik V, CoviShield (ChAdOx1 nCoV - AstraZeneca) e Ad26.COV2 prodotto da Janssen. La produzione di questa tipologia di vaccino richiede la clonazione del gene che codifica la porzione antigenica d'interesse in vettori virali che possono essere in grado o meno di replicarsi (Dai and Gao, 2021). Fra i vantaggi di questa piattaforma si ritrovano la rapidità di produzione e la possibilità di non introdurre adiuvanti (Shang *et al.*, 2020).

I vaccini a subunità sono generalmente realizzati utilizzando proteine ricombinanti o peptidi sintetici e sfruttano la capacità di componenti antigeniche del patogeno di stimolare l'immunità dell'ospite. Anche in questo caso si tratta di piattaforme efficaci e sicure ed essendo estremamente target-specifici sono in grado di attivare la produzione di anticorpi neutralizzanti, tuttavia anche per questo tipo di tecnologia è indispensabile l'impiego di

adiuvanti allo scopo di indurre una risposta immunitaria più forte e di maggiore durata (Zhang *et al.*, 2015; Jeyanathan *et al.*, 2020; Malonis, Lai and Vergnolle, 2020).

Un'ulteriore tecnologia utilizzata per la produzione di vaccini anti-SARS-CoV- è quella dei vaccini a DNA. In questo caso il gene codificante gli antigeni del patogeno d'interesse viene trasferito alla cellula ospite attraverso un DNA plasmidico (Lee, Izzard and Hurt, 2018). Uno dei vantaggi di questo tipo di piattaforma, se confrontata con quella che utilizza RNA, è la stabilità, importante non solo all'interno della cellula dove sarà in grado di indurre una risposta immunitaria bilanciata, ma anche per quanto riguarda la più lunga possibilità di conservazione (Silveira, Moreira and Mendonça, 2021). È tuttavia fondamentale ottimizzare la sequenza dell'antigene e talvolta può essere necessario l'uso di adiuvanti (Wang *et al.*, 2020).

Nonostante l'avvento delle varianti, i vaccini finora approvati rimangono efficaci; una delle opzioni proposte per la produzione di vaccini più "universali" che si mantengano efficaci nel tempo, è quella di produrre vaccini che possano indurre una risposta immunitaria nei confronti di antigeni non superficiali di SARS-CoV-2. Un approccio di questo tipo potrebbe garantire una risposta più stabile dei linfociti T e proteggere il vaccino da ulteriori mutazioni a carico della proteina Spike (Callaway and Mallapaty, 2021; Kudlay and Svistunov, 2022).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Dai dati più recenti dell'OMS si registrano più di 700 milioni di casi confermati di COVID-19 e quasi 7 milioni di decessi (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*).

L'entità dell'emergenza sanitaria generata da SARS-CoV-2 ha evidenziato fin dalle prime fasi della pandemia la necessità di controllare la diffusione del virus. Sono state adottate numerose strategie per superare l'impatto sanitario, sociale ed economico della malattia, tra queste l'introduzione di diversi vaccini in tempi estremamente rapidi, resa possibile da una estesa collaborazione tra i membri della comunità scientifica che si è rivelata di importanza fondamentale (Creech, Walker and Samuels, 2021). Tra i vaccini anti-SARS-CoV-2, i vaccini a mRNA sono stati ampiamente utilizzati dimostrando protezione dalla malattia grave, dall'ospedalizzazione e dalla morte sia in popolazioni immunocompetenti che in fragili (Couderc *et al.*, 2022; Filho *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Montejano-Hervás *et al.*, 2022).

Sebbene in una prima fase sia stato necessario vaccinare tutta la popolazione allo scopo di ridurre i contagi, le ospedalizzazioni e i decessi, ad oggi la vaccinazione continua ad essere raccomandata soprattutto per quelle categorie di individui che mostrano un rischio più elevato di manifestare forme severe di COVID-19.

Fra questi ritroviamo gli individui con età maggiore di sessant'anni, le persone che vivono con HIV (PLWH), gli individui con malattia renale cronica sottoposti a emodialisi, i soggetti affetti da condizioni autoimmuni o condizioni infiammatorie croniche, i pazienti oncologici e in generale tutti gli individui che abbiano un deficit del sistema immunitario dovuto sia alla malattia che al trattamento al quale sono sottoposti (Cheng *et al.*, 2020; Garassino, Jennifer G. Whisenant, *et al.*, 2020; Jager *et al.*, 2020; L. Zhang *et al.*, 2020; Ng *et al.*, 2020; Parohan *et al.*, 2020; Williamson *et al.*, 2020; C. Hoffmann *et al.*, 2021; Venkatesulu *et al.*, 2021; World Health Organization, 2021; Mazzitelli *et al.*, 2022).

Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare diverse componenti della risposta immunitaria in seguito alla somministrazione di vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2 in diverse popolazioni fragili. L'arruolamento dei pazienti è avvenuto in momenti diversi della pandemia pertanto, ciascun gruppo arruolato è stato analizzato separatamente.

Nello specifico sono stati inclusi nello studio pazienti con neoplasie ginecologiche, pazienti sottoposti a emodialisi, individui che vivono con HIV (PLWH) e pazienti con sclerosi sistemica (SSc) che avevano ricevuto due dosi di vaccino a mRNA e pazienti con tumori solidi che avevano ricevuto almeno tre dosi di vaccino. Ogni popolazione è stata di volta in volta confrontata con un gruppo di individui sani abbinati per genere, età e dosi di vaccino ricevute.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione di studio

3.1.1 Pazienti con neoplasie ginecologiche

Sono state incluse nello studio pazienti afferenti all'Unità Operativa di Ginecologia Chirurgica e Oncologica del Policlinico Umberto I di Roma, con neoplasie ginecologiche in trattamento con chemioterapici o che avessero concluso la terapia entro i 6 mesi precedenti la vaccinazione. Le pazienti avevano una diagnosi confermata di tumore primario dell'ovaio, dell'endometrio o della cervice uterina. Lo stadio di progressione della malattia è stato definito secondo i criteri di valutazione RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 1.1 che utilizzano le variazioni della dimensione del tumore per avere una stima della risposta ai trattamenti (Schwartz *et al.*, 2016). Le dosi di vaccino sono state somministrate a distanza di 7–14 giorni dalle infusioni dei chemioterapici. I dati demografici (età, sesso), indice di massa corporea (BMI) e clinici (durata del trattamento, comorbidità, stadio della malattia) sono stati estrapolati dalle cartelle cliniche delle pazienti. I campioni sono stati raccolti da maggio 2021 ad agosto 2021.

In questo gruppo la produzione e il titolo anticorpale (Immunoglobuline G, IgG) sono stati valutati effettuando due prelievi di sangue periferico a distanza di 1 (t1) e 3 (t3) mesi dalla seconda dose di vaccino e i risultati ottenuti sono stati confrontati con un gruppo di donatrici sane vaccinate nello stesso periodo.

3.1.2 Pazienti con Sclerosi Sistemica (SSc)

Sono stati inclusi nello studio pazienti con SSc che soddisfacessero i criteri di classificazione dell'American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (van den Hoogen *et al.*, 2013) in trattamento presso il Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-metaboliche e Malattie Infettive del Policlinico Umberto I di Roma. I pazienti sono stati comparati con un gruppo di donatori sani vaccinati nello stesso periodo. La raccolta dei campioni è avvenuta da marzo 2021 a maggio 2021. Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti sono state estrapolate dalle cartelle cliniche.

Tutti i soggetti hanno ricevuto due dosi di vaccino a mRNA, i pazienti hanno proseguito le terapie ad eccezione di quelli in trattamento con Methotrexate (MTX), interrotto nella settimana precedente e in quella successiva alla vaccinazione seguendo le raccomandazioni delle principali società scientifiche di reumatologia (Matucci-Cerinic *et al.*, 2020; Curtis *et al.*, 2021). La risposta umorale è stata valutata effettuando due prelievi di sangue periferico a distanza di 1 (t1) e 3 (t3) mesi dalla seconda dose di vaccino.

3.1.3 PLWH e pazienti emodializzati

Per questa parte dello studio è stato arruolato un gruppo di PLWH unitamente a pazienti sottoposti a emodialisi di mantenimento (MHD) con un quadro di malattia renale in stadio terminale (ESKD), i primi afferenti al Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrinometaboliche e Malattie Infettive, i secondi in trattamento presso l'Unità Operativa Semplice Dipartimentale Dialisi del Policlinico Umberto I di Roma.

Dalle cartelle cliniche del gruppo PLWH sono state estratte le seguenti informazioni: dati demografici (età, sesso), prima diagnosi di HIV-1 (anni), tempo di esposizione alla terapia antiretrovirale (ARV) (anni), stadio di classificazione CDC, ARV attuale, coinfezione con il virus dell'epatite C (HCV), livello di HIV-RNA, conta dei linfociti T CD4+ al nadir, percentuale di linfociti T CD4+ al momento dell'arruolamento e conta assoluta dei linfociti. È stata inoltre registrata la presenza di comorbidità (tra cui diabete, ipertensione, malattie cardiovascolari (CVD), dislipidemia). I seguenti dati sono stati estrapolati dalle cartelle cliniche dei pazienti sottoposti a emodialisi: dati demografici (età, sesso), indice di massa corporea (BMI), durata del periodo di emodialisi pre-trapianto, trapianto di rene, tipo di accesso vascolare, frequenza e modalità dell'emodialisi.

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono riportate nelle Tabelle 10 e 11. Tutti gli individui inclusi avevano ricevuto due dosi di vaccino a mRNA. Per lo studio della cinetica della risposta anticorpale, da gennaio 2021 a dicembre 2021, sono stati prelevati campioni di sangue intero 7 e 21 giorni dopo la somministrazione della prima dose e 7 (t7), 14 (t14), 21 (t21), 90 (t90) e 270 (t270) giorni dopo la seconda dose.

3.1.4 Pazienti con tumori solidi

Per questa parte dello studio sono stati arruolati pazienti con tumori solidi afferenti all'Unità di Oncologia B del Policlinico Umberto I di Roma, sottoposti a diverse tipologie di terapie antitumorali: chemioterapia, immunoterapia (nello specifico farmaci anti-PD-L1), una combinazione di chemio- e immunoterapia e farmaci biologici. Anche in questo caso i pazienti sono stati confrontati con un gruppo di donatori sani vaccinati nello stesso periodo. I campioni sono stati raccolti da novembre 2022 a gennaio 2023.

Pazienti e donatori sani sono stati suddivisi in due gruppi gruppo "naïve" che comprendeva i soggetti che non riferivano pregressa infezione da SARS-CoV-2, e gruppo "experienced" che includeva i soggetti con precedente infezione. I pazienti sono stati inoltre stratificati in base alla terapia: "immunotherapy", pazienti in trattamento con immunoterapia e chemio-immunoterapia, e "non immunotherapy" pazienti in trattamento con chemioterapia e farmaci biologici. Tutti i soggetti avevano ricevuto almeno tre dosi di vaccino a mRNA.

In questa popolazione di pazienti con tumori solidi sono state analizzate le differenze nella risposta umorale e cellulo-mediata un anno dopo la somministrazione della terza dose di vaccino.

3.2 Valutazione della risposta umorale

Per la valutazione della risposta umorale sono stati raccolti campioni di sangue intero. I campioni sono stati centrifugati a 1500×g per 15 minuti per la separazione del siero e sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Il titolo anticorpale è stato rilevato utilizzando un test di chemio-immunoluminescenza indiretta (SARS-CoV-2 TrimericS IgG, DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy) su piattaforma LIAISON® tramite il kit. Questa analisi consente la rilevazione di IgG leganti la forma trimerica della proteina Spike in campioni di siero e plasma. Il titolo anticorpale rilevato è stato espresso in Binding Antibody Units/ml (BAU/ml), il range di quantificazione del test va da 4,81 a 2080 BAU/ml, i campioni sono considerati positivi per la presenza di anticorpi anti-Spike per valori maggiori o uguali di 33,8 BAU/ml. Per valori >2080 BAU/ml sono state eseguite diluizioni 1:5, 1:10 o 1:20.

3.3 Valutazione della risposta cellulo-mediata tramite saggio di rilascio di IFN- γ

Per il sottogruppo dei pazienti sottoposti a emodialisi è stata valutata la risposta cellulo-mediata tramite il saggio di rilascio di IFN- γ (IGRA) Covi-FERON test (SD Biosensor, Suwon, Repubblica di Corea) confrontandola con quella dei donatori sani.

Nello specifico, 270 giorni dopo la somministrazione della seconda dose, 1 ml di sangue intero è stato raccolto in ciascuna delle 5 provette presenti nel kit Covi-FERON: provetta "Nil" con funzione di controllo negativo, provetta "Original Spike Protein (SP)" contenente antigeni specifici della proteina Spike derivati dal ceppo wild-type di SARS-CoV-2 e dalla variante Alpha, provetta "Variant" contenente gli antigeni specifici della proteina Spike derivati dalle varianti Beta e Gamma, provetta "NP Antigen" contenente l'antigene specifico della proteina nucleocapsidica di SARS-CoV-2, provetta "Mitogeno" con funzione di controllo positivo.

Il sangue prelevato è stato miscelato per inversione e i campioni sono stati incubati per 24 ore a 37°C per la stimolazione dei linfociti T con i diversi peptidi. Dopo 24 ore, per la separazione del plasma i campioni sono stati centrifugati a 2200×g per 15 minuti.

I livelli di IFN- γ sono stati rilevati tramite un saggio di immunoassorbimento enzimatico e i risultati sono stati interpretati come segue:

- 1) "Reactive" se la differenza fra il valore dell'antigene e il Nil era $\geq 0,25$ Unità Internazionali (UI)/ml e/o $\geq 0,25$ e $\geq 25\%$ del valore Nil e la differenza fra Mitogeno e Nil $\geq 0,5$ UI/ml;
- 2) "Non reactive" se la differenza fra il valore dell'antigene e il Nil era $< 0,25$ UI/ml e/o $\geq 0,25$ UI/ml e $< 25\%$ del valore del Nil e la differenza fra Mitogeno e Nil $\geq 0,5$ UI/ml.

3.4 Valutazione del titolo di anticorpi neutralizzanti

Nello studio della popolazione con tumori solidi i campioni di siero di pazienti e donatori sani sono stati analizzati per verificare la presenza di anticorpi neutralizzanti (NAb) usando il "Plaque Reduction Neutralization Test" (PRNT) sia contro il ceppo Wuhan di SARS-CoV-2 che contro la variante Omicron, in questo secondo caso il test è stato eseguito solo sui

campioni dei soggetti naïve. Questi esperimenti sono stati condotti in un laboratorio con livello di biosicurezza 3 (BSL-3) presso l'Istituto di Scienze Biomediche della Difesa di Roma.

3.4.1 Linee cellulari e preparazione degli stock di SARS-CoV-2

Le cellule Vero E6 (CRL-1586; ATCC, Manassas, VA) sono state mantenute in coltura in terreno minimo essenziale (MEM), integrato con il 10% di siero fetale bovino (Sigma Aldrich, Milano, Italia) precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti, L-glutammina a concentrazione

2 mM (Life Technologies) e 1% di soluzione antibiotica (Life Technologies) a 37 °C con il 5% di CO₂.

Per la preparazione degli stock di SARS-CoV-2, il virus è stato propagato infettando le cellule Vero E6 a una molteplicità d'infezione (MOI) =0,01. Dopo 1 ora di adsorbimento a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂, è stato aggiunto MEM con 2% di FBS (Euroclone S.p.A.) e le cellule sono state incubate a 37°C in un'atmosfera di 5% di CO₂ e monitorate al microscopio ottico per rilevare la presenza di effetto citopatico nelle cellule infettate. Dopo 72 ore post-infezione, il virus rilasciato nel surnatante è stato raccolto mediante centrifugazione a 4°C, 600 × g per 10 minuti. Le aliquote di SARS-CoV-2 sono state dispensate in *criovial* e conservate a -80°C e successivamente titolate utilizzando il saggio di formazione delle placche.

3.4.2 Plaque Reduction Neutralization Test

Per valutare i livelli di anticorpi neutralizzanti tutti i campioni di siero sono stati inattivati a 56° C per 30 minuti e successivamente sottoposti a diluizioni seriali in MEM. Per ogni campione sono state selezionate tre diluizioni ognuna delle quali è stata analizzata in duplicato.

Sono stati prelevati 100 µl da ciascuna diluizione e sono stati miscelati con 100 µl di virus wild-type (Wuhan) e Omicron BQ.1 precedentemente diluiti. Dopo 1 ora di incubazione a 37° C, la sospensione è stata aggiunta a una piastra da 12 o 24 pozzetti contenente cellule Vero confluenti e la miscela è stata incubata un'ora a 37° C. Dopo la fase di adsorbimento, al fine di limitare la diffusione della progenie virale, sul monostrato cellulare è stato

dispensato un terreno semisolido composto da una miscela di MEM (privo di glutammina e rosso fenolo GIBCO), 1,5% Tragacanth (SIGMA), NaHCO₃ 7% (Gibco), L-glutammina 1X (Gibco), MEM non-essential Amino Acid Solution without L-glutamine 1x (MEM NEAA, Gibco), Hepes 0,02 M (Euroclone), Dimetil solfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e 2% di FBS (concentrazione finale). Dopo 4 giorni a 37 °C, il titolo degli anticorpi neutralizzanti è stato valutato calcolando la percentuale di riduzione delle unità formanti placca. In particolare, le placche sono state contate dopo rimozione del terreno semisolido, lavaggio con soluzione fisiologica e colorazione con cristalvioletto.

Per stabilire la percentuale di riduzione dell'infettività virale il numero di placche è stato confrontato con il controllo virale a titolo noto. La PRNT₅₀ è espressa come il reciproco della diluizione più alta in grado di ridurre il numero di unità formanti placca (PFU) del 50% rispetto al controllo virale (De Santis *et al.*, 2023).

3.5 Valutazione della risposta cellulo-mediata tramite citometria a flusso

Per lo studio della risposta cellulo-mediata nei pazienti con tumori solidi sono state valutate le percentuali di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ produttori IFN γ , IL2 e TNF α . A tale scopo le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state isolate dai campioni di sangue intero tramite centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

I PBMC sono stati sottoposti a stimolazione *overnight* con librerie di peptidi della proteina Spike di SARS-CoV-2 e le analisi sono state effettuate tramite citometria a flusso multiparametrica.

I *pool* di peptidi liofilizzati appartenevano al ceppo Wuhan wild-type (WT) (GenBank MN908947.3, Proteina QHD43416.1) della glicoproteina Spike (S) e alla variante B.1.1.529 Omicron (Miltenyi Biotec, Germany).

Diverse combinazioni di anticorpi coniugati ciascuno con un fluorocromo sono state utilizzate per lo *staining* dei PBMC (anti-CD45 coniugato con PacificBlue, anti-CD4 coniugato con APC-Cy7, anti-CD8 coniugato con APC, BioLegend, San Diego). I PBMC sono stati trattati con la soluzione Fix/Perm (BioLegend, San Diego) prima della colorazione

intracellulare (anti-IFN- γ coniugato con FITC, anti-TNF- α coniugato con PerCp-Cy 5,5 e anti-IL2 coniugato con PE-Cy7, Bio-Legend, San Diego) secondo le istruzioni del produttore. L'acquisizione dei campioni è stata eseguita su MACSQuant (Miltenyi Biotec, Germania) e i risultati sono stati analizzati con il software FlowJo™ v10.8.1.

Tutte le possibili combinazioni di espressione intracellulare di IFN γ , IL2 e TNF α da parte dei linfociti T sono state valutate. Le cellule in grado di produrre almeno una citochina fra quelle analizzate sono state definite "responding T-cells", mentre quelle in grado di produrre simultaneamente le tre citochine sono state definite "triple-positive T-cells".

La visualizzazione e l'analisi delle diverse combinazioni di citochine è stata eseguita con SPICE v6.1.

I pazienti hanno fornito il consenso informato scritto e le procedure sono state eseguite in conformità alla dichiarazione di Helsinki. Tutti gli studi inclusi in questo progetto sono stati approvati dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I, dell'Università di Roma "La Sapienza".

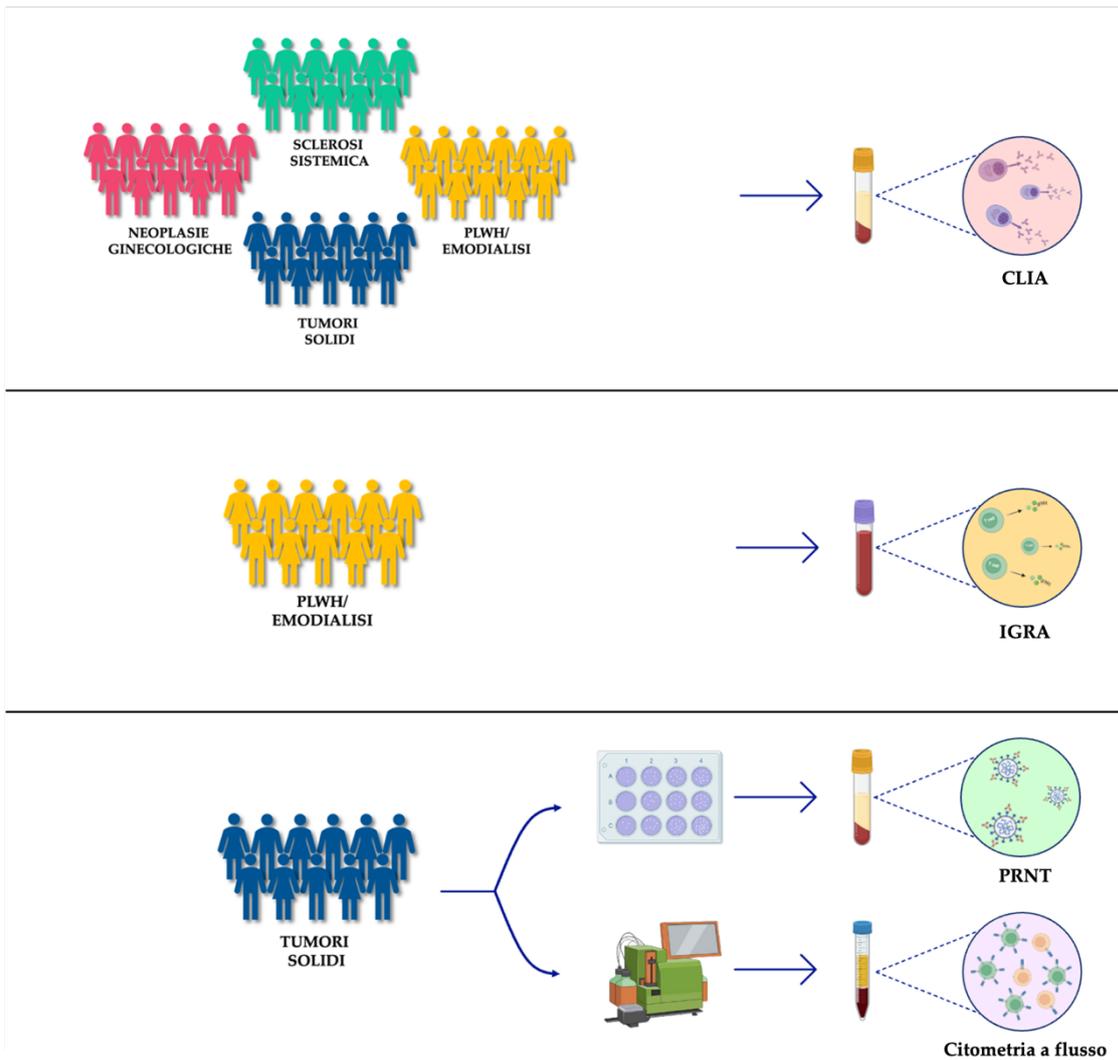


Figura 20. Schematizzazione del disegno dello studio. PLWH: persone che vivono con HIV, CLIA: test di chemio-immunoluminescenza indiretta, PRNT: plaque reduction neutralization test.

3.6 Analisi statistica

Le variabili categoriche sono state espresse come frequenze assolute e percentuali. Le variabili quantitative sono state espresse come mediane e range interquartile (IQR).

Per valutare le differenze tra i gruppi sono stati utilizzati il t-test di Student per le distribuzioni normali, il test di Mann-Whitney e il test di Kruskal-Wallis per le distribuzioni non normali. In caso di confronti multipli sono state applicate le correzioni opportune (Bonferroni, Dunn). Per valutare le differenze tra le variabili dicotomiche o categoriche sono stati utilizzati il test chi-quadro o il test esatto di Fisher. Il test di correlazione di Pearson o Spearman è stato utilizzato per le correlazioni bivariate.

Nell'analisi del gruppo dei pazienti con SSc per valutare la predittività del trattamento sulla risposta umorale è stato costruito un modello di regressione logistica, la variabile dipendente è stata espressa come odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza è stato stabilito al 95% (95% CI).

Per l'analisi dei PLWH e dei soggetti dializzati è stato costruito un modello di regressione multipla per stimare i coefficienti beta (β) e gli intervalli di confidenza associati (IC) dei fattori che potessero eventualmente influenzare l'andamento dei titoli anticorpali nei tempi analizzati dopo la seconda dose di vaccino. Le variabili incluse nel modello erano le seguenti: sesso, età, patologia, titoli anticorpali 21 giorni dopo la prima dose di vaccino, tempo dalla seconda dose di vaccino (t7, t14, t21, t90, t270); termini di interazione tra patologia e tempo dalla seconda dose.

Le analisi sono state eseguite utilizzando i software STATA 17.0 (StataCorp LLC, 4905 Lakeway Drive, College Station, 322 Texas, USA), SPSS versione 27.0 e GraphPad Prism 9.

Infine, nell'analisi dei pazienti con tumori solidi le differenze di distribuzione delle diverse combinazioni di citochine tra gruppi e sottogruppi sono state eseguite utilizzando il test di permutazione non parametrico con il software SPICE, distribuito dal National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH).

Per tutte le analisi un p-value < 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

4.1 Pazienti con neoplasie ginecologiche

Quarantaquattro pazienti con età mediana di 61 anni (IQR 55.5–68.5), BMI 24 kg/m² (19–45), sono state arruolate per questa parte dello studio. Trentatré pazienti (75%) avevano comorbidità, tra cui disturbi della tiroide (36.4%), patologie cardiovascolari (22.7%) e malattie respiratorie (6.8%). Il tumore primario era ovarico in 28 pazienti (63.6%), endometriale in 9 (20.4%) e cervicale in 7 pazienti (16%). Secondo la stadiazione FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (Abu-Rustum *et al.*, 2011) 12 pazienti (27.3%) mostravano uno stadio I, 8 (18.2%) stadio II, 20 (45.5%) stadio III e 4 (9.1) pazienti avevano un tumore al IV stadio. Al momento della vaccinazione 30 pazienti (68.2%) erano in trattamento con chemioterapia mentre 14 (31.8%) avevano completato la terapia nei 6 mesi precedenti. La malattia era in progressione in 23 pazienti (52.3%), mentre era stabile o in remissione (parziale o completa) nelle restanti pazienti.

Il gruppo delle pazienti è stato confrontato con un gruppo di 44 donatrici sane vaccinate nello stesso periodo. L'età mediana del gruppo di controllo era 60 (50-66) anni e il BMI era 24 (18-42) kg/m². Ventotto donatrici sane (63.6%) riferivano comorbidità, inclusi disturbi della tiroide (31.8%), patologie cardiovascolari (13.6%) e malattie respiratorie (9.1%).

Fra i dati demografici delle pazienti e il gruppo di controllo non sono state riscontrate differenze statisticamente significative. I dati demografici e clinici sono riportati in Tabella 2.

Variabile	Pazienti (n=44)	Donatrici (n=44)	p-value
Età (anni)	61 (55.5–68.5)	60 (50–66)	0.77
Peso (kg)	64 (60.5–69)	65 (58–68)	0.88
BMI (kg/m²)	24 (19–45)	24 (18–42)	
18–25	28 (63.6%)	30 (68.2%)	
25–30	11 (25%)	10 (22.7%)	0.87
>30	5 (11.4%)	4 (9.1%)	
Comorbidità	33 (75%)	28 (63.6%)	
Disordini della tiroide	16 (36.4%)	14 (31.8%)	
Patologie cardiovascolari	10 (22.7%)	6 (13.6%)	0.25
Patologie respiratorie	3 (6.8%)	4 (9.1%)	
Altre patologie	5 (11.4%)	4 (9.1%)	
Tipologia di tumore			
Ovaio	28 (63.6%)		
Endometrio	9 (20.4%)		
Cervice	7 (16%)		
FIGO stage			
I	12 (27.3%)		
II	8 (18.2%)		
III	20 (45.5%)		
IV	4 (9.1%)		
Chemioterapia			
In corso	30 (68.2%)		
Entro i 6 mesi precedenti	14 (31.8%)		
Malattia in progressione	23 (52.3%)		

Tabella 2. Dati demografici e clinici della popolazione di studio. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. BMI: indice di massa corporea; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Dopo la vaccinazione non sono stati registrati gravi effetti avversi. Il dolore nel sito di iniezione è stato l'effetto collaterale più comunemente riportato sia dopo la prima che dopo la seconda dose. Anche per quanto riguarda gli eventi avversi dopo la vaccinazione non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

La Tabella 3 riassume gli effetti collaterali riportati dai soggetti arruolati dopo la prima e la seconda dose del vaccino.

Effetti collaterali	Pazienti (n=44)	Donatrici (n=44)	p-value
Dopo la seconda dose			
Dolore nel sito di iniezione	20 (45.4%)	19 (43.2%)	0.83
Astenia	15 (34%)	14 (31.8%)	0.82
Dolori muscolo scheletrici	10 (22.7%)	11 (25%)	0.80
Mal di testa	4 (9%)	3 (6.8%)	0.69
Nausea/vomito	1 (2.2%)	0	0.50
Febbre	2 (4.4%)	2 (4.4%)	1
Brividi	2 (4.4%)	2 (4.4%)	1
Dopo la prima dose			
Dolore nel sito di iniezione	22 (50%)	20 (45.4%)	0.67
Astenia	12 (27.3%)	10 (22.7%)	0.62
Dolori muscolo scheletrici	8 (18.2%)	10 (22.7%)	0.60
Mal di testa	5 (11.4%)	3 (6.8%)	0.46
Nausea/vomito	3 (6.8%)	3 (6.8%)	1
Febbre	0	1 (2.2%)	0.50

Tabella 3. Effetti collaterali riferiti dopo la prima e la seconda dose di vaccino da pazienti e donatrici.

Le variabili sono riportate come numeri e percentuali.

4.1.1 Risposta umorale nelle pazienti con neoplasie ginecologiche

I titoli di IgG sono stati definiti bassi per risultati < 780 BAU/ml, intermedi per valori compresi fra 780 e 2080 BAU/ml e alti per valori > 2080 BAU/ml.

Dopo 1 mese dalla seconda dose di vaccino il titolo anticorpale era basso in 9 (20,5%) pazienti, intermedio in 21 (47.7%) e alto in 14 (31.8%). Dopo 3 mesi dalla vaccinazione il titolo anticorpale era nullo in 2 (4.5%) pazienti, basso in 26 (59.1%), intermedio in 13 (29.5%) e alto in 3 (6.8%). Nella Tabella 4 viene riportata la relazione tra i titoli anticorpali e diverse variabili, tra cui l'età, il peso, le comorbidity, la malattia progressiva, lo stadio FIGO e la chemioterapia in corso durante la vaccinazione.

Variabile	Titolo anticorpale 1 mese dopo la II dose				Titolo anticorpale 3 mesi dopo la II dose				
	Basso (n=9)	Intermedio (n=21)	Alto (n=14)	p-value	Nulla (n=2)	Basso (n=26)	Intermedio (n=16)	Alto (n=3)	p-value
Età (anni)	58 (56-74)	62 (57-68)	58 (48.2-66.2)	0.569	58.5 (57.2-59.8)	61.5 (56.2-69.5)	64 (57-68)	46 (44-63.5)	0.799
Peso (kg)	72(65-80)	62(58;64.5)	65.5 (62-69)	0.025	81 (77-85)	63 (58-66)	66 (62-69)	69 (65-69)	0.131
BMI (Kg/m²)									
18-25	3 (33.3%)	14 (66.7%)	11 (78.6%)	0.106	0	16 (61.5%)	10 (76.9%)	2 (66.7%)	0.311
25-30	3 (33.3%)	5 (23.8%)	3 (21.4%)		1 (50%)	6 (23.1%)	3 (23.1%)	1 (33.3%)	
>30	3 (33.3%)	2 (9.5%)	0		1 (50%)	4 (15.4%)	0	0	
Comorbidità	7 (77.8%)	18 (85.8%)	8 (57.1%)	0.269	1 (50%)	21 (80.8%)	10 (76.9%)	1 (33.3%)	0.269
Malattia in progressione	6 (66.7%)	8 (38.1%)	9 (64.3%)	0.197	2 (100%)	11 (42.3%)	8 (61.5%)	2 (66.7%)	0.313
Chemioterapia in corso	6 (66.7%)	14 (66.7%)	10 (71.4%)	0.951	2 (100%)	18 (69.2%)	9 (69.2%)	1 (33.3%)	0.452
FIGO stage									
I	1 (11.1%)	9 (42.8%)	2 (14.3%)	0.690	1 (50%)	6 (23.1%)	3 (23.1%)	2 (66.7%)	0.281
II	2 (22.2%)	3 (14.3%)	3 (21.4%)		0	4 (15.4%)	4 (30.8%)	0	
III	4 (44.4%)	8 (38.1%)	8 (57.1%)		0	13 (50%)	6 (46.2%)	1 (33.3%)	
IV	2 (22.2%)	1 (4.8%)	1 (7.1%)		1 (50%)	3 (11.5%)	0	0	

Tabella 4. Relazione tra i titoli anticorpali e diverse variabili cliniche e demografiche che possono rappresentare fattori di rischio. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. BMI: indice di massa corporea; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Andando a stratificare la popolazione in base al BMI abbiamo osservato che le pazienti con BMI <30 kg/m² al t1 mostravano un titolo anticorpale più alto rispetto alle pazienti con BMI > 30 kg/m² (p = 0.016). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra il titolo anticorpale e le altre variabili analizzate, ovvero la malattia progressiva, le comorbidità, lo stadio FIGO e la chemioterapia in corso. Abbiamo inoltre osservato che le pazienti con età > 50 anni mostravano livelli di anticorpi inferiori rispetto alle pazienti che avevano meno di 50 anni sia 1 mese (p = 0.018) che 3 mesi (p = 0.004) dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino (Tabella 5).

Variabile	Titolo anticorpale (BAU/ml)			
	1 mese dopo la II dose	p-value	3 mesi dopo la II dose	p-value
Età				
<50	3978 (2301-6733)	0.018	1765.4 (1175.2-2184)	0.004
≥50	1648.4 (774.8-2194.4)		504.4 (299-969.8)	
BMI				
<30	1973.4 (1055.6-5062.2)	0.016	603.2 (421.2-1450.8)	0.156
≥30	686.4 (468-1502.8)		442 (278.2-556.4)	
Comorbidità				
Si	1570.4 (837.2-2028)	0.111	496.6 (312-1040)	0.147
No	2756 (2077.4-5005)		889.2 (527.8-1812.2)	
Malattia in progressione				
Si	1887.6 (972.4-6084)	0.592	587.6 (270.4-1739.4)	0.681
No	1768 (917.8-2384.2)		512.2 (439.4-946.4)	
Chemioterapia in corso				
Si	1908.4 (938.6-4355)	0.871	527.8 (439.4-946.4)	0.186
No	1669.2 (863.2-2724.8)		884 (444.6-1591.2)	
FIGO stage				
I	1786.2 (1427.4-2116.4)	0.507	837.2 (520-1206.4)	0.181
II	1419.6 (689-3549)		741 (325-1461.2)	
III	2033.2 (988-5946.2)		527.8 (434.2-1580.8)	
IV	1097.2 (626.6-1666.6)		223.6 (143-335.4)	

Tabella 5. Titoli anticorpali 1 e 3 mesi dopo la vaccinazione nelle pazienti stratificate in base ad alcuni potenziali fattori di rischio. I titoli anticorpali sono riportati come mediana (IQR). BMI: indice di massa corporea; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics, BAU: Binding antibody units.

Infine, sono stati confrontati i titoli anticorpali al t1 e al t3 fra le pazienti e il gruppo di controllo, i dati sono riportati nella Tabella 6.

Dopo 1 mese dalla seconda dose non sono state osservate differenze significative, mentre il titolo anticorpale al t3 era più basso nelle pazienti rispetto alle donatrici sane ($p < 0.001$).

	Titolo anticorpale (BAU/ml)		
	Pazienti (n=44)	Controlli sani (n=44)	p-value
1 mese dopo la II dose	1846 (897-3346.2)	2035.8 (1682.2-3437.2)	0.101
3 mesi dopo la II dose	556.4 (400.4-1365)	1430 (962-2030.6)	<0.001

Tabella 6. Confronto fra i titoli anticorpali di pazienti e donatrici sane. I valori sono riportati come mediana (IQR).

4.2 Pazienti con Sclerosi Sistemica

Sono stati inclusi in queste analisi 78 pazienti con SSc, età mediana 50 (36 - 61) anni, 65 (83.3%) femmine, e 35 donatori sani (HD) “matchati” per sesso ed età. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti affetti da SSc sono riportate nella Tabella 7.

Variabile	Pazienti con SSc (n=78)
Età (anni)	50 (36-61)
Femmine, n (%)	65 (83.3%)
dcSSc n (%)	33 (42.3%)
Durata della malattia (anni)	13 (7-16)
mRSS, mediana (IQR)	11 (8-16)
Autoanticorpi SSc-specifici	
Anti-topoisomerasi I, n (%)	27 (34.6%)
Anti-centromeri, n (%)	21 (26.9%)
Anti-RNAPolimerase III, n (%)	2 (2.6%)
Nessuno, n (%)	28 (35.9%)
Capillaroscopia della plica ungueale	
Precoce, n (%)	16 (20.5%)
Attiva, n (%)	20 (25.6%)
Tardiva, n (%)	42 (53.8%)
DAI, mediana (IQR)	1.42 (0.76-2.5)
DSS, mediana (IQR)	4 (2-5)
Storia di DUs, n (%)	42 (53.8%)
DUs attiva, n (%)	6 (7.7%)
ILD, n (%)	61 (78.2%)
PAH, n (%)	7 (9%)
Terapia con immunosoppressori, n (%)	31 (39.7%)
Prednisone o equivalente	
5 mg/die, n (%)	16 (20.5%)
10 mg/die, n (%)	13 (16.7%)
MTX, n (%)	6 (7.7%)
MMF, n (%)	4 (5.1%)
RTX*, n (%)	8 (10.3%)

Tabella 7. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con SSc. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. SSc: sclerosi sistemica; dcSSc: sclerosi sistemica cutanea diffusa; mRSS: punteggio Rodnan Skin modificato; DAI: Indice di attività della malattia; DSS: scala di gravità della malattia; DU: ulcere digitali; ILD: malattia polmonare interstiziale; PAH: ipertensione arteriosa polmonare; MTX: methotrexate; MMF: micofenolato mofetile; RTX: rituximab; IQR: range interquartile. *Pazienti affetti da SSc trattati con RTX >6 mesi prima della prima dose di vaccino.

I pazienti in trattamento con immunosoppressori erano 31 (39.7%), 16 (20.5%) erano in trattamento con prednisone 5 mg/die, 13 (16.7%) in trattamento con prednisone 10 mg/die, 6 (7.7%) erano trattati con methotrexate (MTX), 4 (5.1%) con micofenolato mofetile (MMF) e 8 (10.3%) erano in terapia con rituximab (RTX).

4.2.1 Risposta umorale nei pazienti con SSc

Il tasso di sieropositività era paragonabile nei pazienti SSc rispetto ai donatori al t1 (96.2% vs 100%) ma significativamente più basso nel gruppo dei pazienti al t3 (93.6% vs 100%; $p < 0.05$). I titoli anticorpali rilevati nei pazienti erano statisticamente più bassi rispetto ai donatori al t1 ($p < 0.001$) ma non al t3. La Tabella 8 riporta il tasso di sieropositività e i titoli anticorpali rilevati nei pazienti SSc e nei donatori sani. La Figura 21 mostra i livelli sierici mediani di IgG a t1 e t3 nei pazienti SSc e HD.

Variabile	SSc (n=78)	HD (n=35)	p-value
Tasso di sieroconversione al t1, n (%)	75 (96.2%)	35 (100%)	ns
Tasso di sieroconversione al t, n (%)	73 (93.6%)	35 (100%)	< 0.05
Titolo anticorpale al t1 (BAU/ml), mediana (IQR)	1705 (851-2440)	4238 (2119-5382)	< 0.001
Titolo anticorpale al t3 (BAU/ml), mediana (IQR)	557.5 (225-1090)	358.8 (177.06-1021.8)	ns

Tabella 8. Tassi di sieropositività e livelli di anticorpi della popolazione di studio. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. SSc: sclerosi sistemica; HD: controlli sani; IQR: range interquartile, BAU: Binding antibody units.

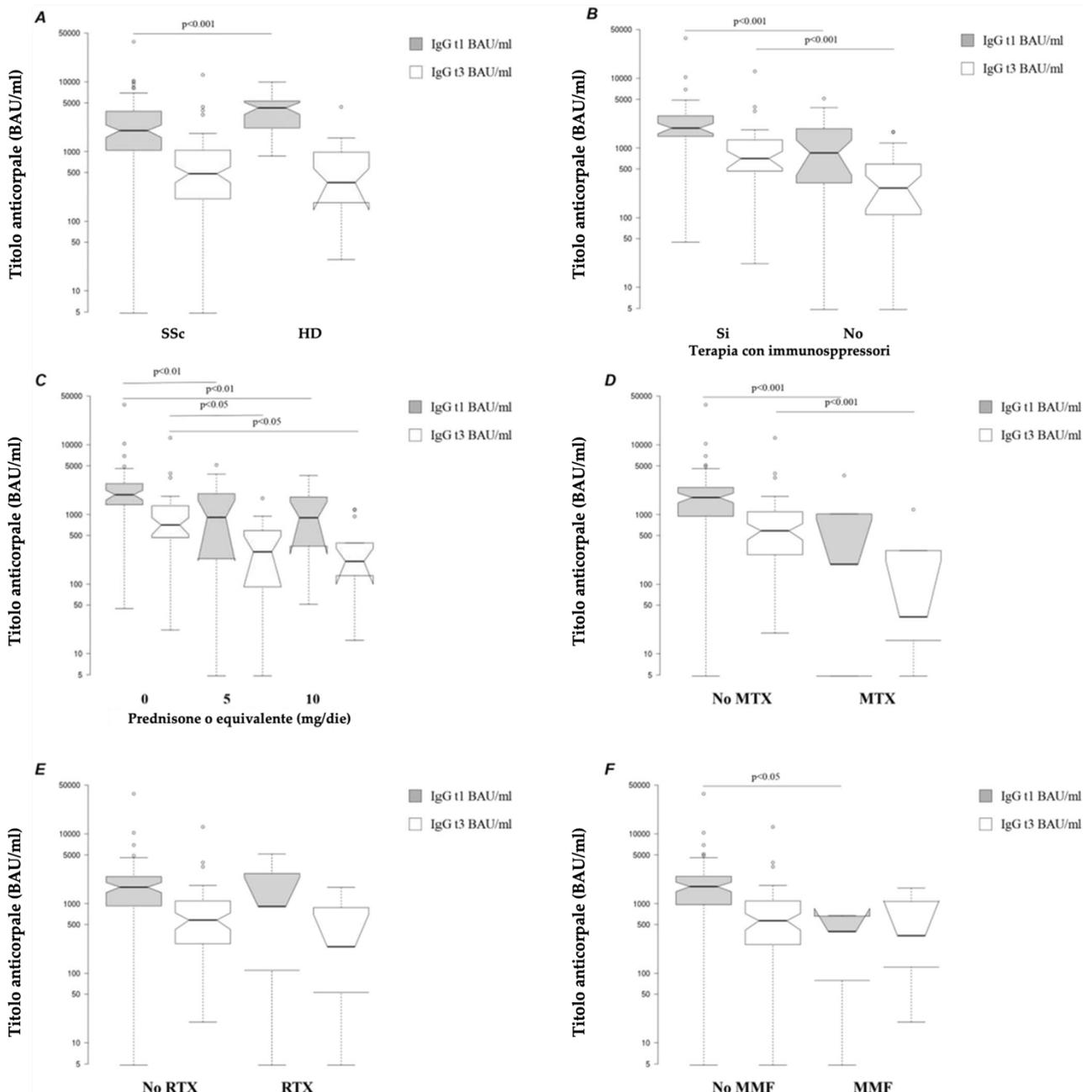


Figura 21. Titoli anticorpali dopo 1 e 3 mesi dalla seconda dose di vaccino. Livelli di anticorpi nei pazienti con SSc e nei donatori sani (A). Livelli anticorpi nei pazienti con SSc trattati e non trattati con diversi immunosoppressori (B–F). SSc: sclerosi sistemica, HD: donatori sani, MTX: methotrexate, RTX: rituximab, MMF: micofenolato mofetile, BAU: Binding antibody units.

Confrontando il tasso di sieropositività dei soli pazienti SSc non sottoposti a terapia immunosoppressiva (n=47) con i donatori sani non sono state rilevate differenze significative né al t1 né al t3. Tuttavia, quando i titoli anticorpali di questi due sottogruppi sono stati confrontati, i pazienti con SSc non sottoposti a terapia immunosoppressiva

mostravano livelli sierici di IgG statisticamente più bassi rispetto agli HD al t1 ($p<0.001$), mentre i livelli di anticorpi erano significativamente più alti nel sottogruppo dei pazienti rispetto agli HD al t3 ($p<0.01$).

Durante il corso dello studio, un totale di 11 (14.1%) pazienti ha contratto l'infezione da SARS-CoV-2, a una distanza mediana di 7 mesi (7-8) dalla prima dose di vaccino. Sei (54.5%) di questi pazienti erano in trattamento con immunosoppressori e 1 è deceduto a causa dell'infezione. Analizzando il gruppo dei pazienti SSc che hanno sviluppato l'infezione da SARS-CoV-2, è stato osservato che questi mostravano al t1, ma non al t3, titoli anticorpali significativamente più bassi rispetto ai pazienti che non hanno contratto l'infezione ($p<0.01$).

Non sono state rilevate differenze significative né al t1, né al t3 stratificando i pazienti in base alle diverse caratteristiche cliniche. Nessuna correlazione è stata riscontrata tra il tasso di sieroconversione e il livello di anticorpi in relazione all'età, alla durata della malattia e alle caratteristiche cliniche della malattia analizzate (es. punteggio Rodnan Skin modificato – mRSS, indice di attività della malattia – DAI, scala di gravità della malattia – DSS, sottogruppo di malattia, pattern di videocapillaroscopia periungueale – NVC, specificità degli autoanticorpi, presenza o storia di ulcere digitali – DU, ipertensione arteriosa polmonare – PAH, malattia polmonare interstiziale – ILD) Inoltre nessun paziente ha manifestato riacutizzazioni della malattia dopo la vaccinazione.

4.2.2 Tasso di sieropositività e livelli sierici di IgG nei pazienti con SSc in base alle terapie con immunosoppressori

I pazienti con SSc trattati con immunosoppressori mostravano complessivamente un tasso di sieropositività ($p<0.05$) e un titolo anticorpale più basso rispetto ai pazienti non trattati sia al t1 che al t3 ($p<0.001$).

La Figura 21-B mostra i livelli sierici mediani di IgG nei pazienti con SSc in trattamento con terapia immunosoppressiva e nei pazienti con SSc non trattati.

Per valutare se i diversi regimi terapeutici potessero avere un effetto sulla produzione di anticorpi dopo la vaccinazione, i pazienti sono stati stratificati in base al trattamento ricevuto.

I pazienti SSc in trattamento con steroidi mostravano un tasso di sieropositività significativamente inferiore rispetto ai pazienti SSc non in trattamento con steroidi, sia al t1 che al t3 era ($p<0.05$). Il livello di anticorpi era significativamente più basso nei pazienti con SSc in trattamento con 10 mg/die o 5 mg/die di prednisone o equivalenti rispetto ai pazienti con SSc non in trattamento con steroidi sia al t1 ($p<0.01$) che al t3 ($p<0.05$). Non sono state rilevate differenze significative confrontando i pazienti in trattamento con 10 mg/die e 5 mg/die di prednisone o equivalente né al t1 né al t3. La Figura 21-C mostra i livelli sierici mediani di IgG in questi gruppi di pazienti.

Nei pazienti con SSc trattati con MTX il tasso di sieropositività e il titolo anticorpale sia al t1 che al t3 erano significativamente più bassi rispetto ai pazienti non trattati con MTX ($p<0.001$) (Figura 21-D).

Nessuna differenza significativa, né al t1 né al t3, è stata osservata confrontando il tasso di sieropositività e i livelli di anticorpi dei pazienti SSc in trattamento con RTX rispetto a quelli non in trattamento con RTX. La Figura 21-E mostra i livelli sierici mediani di IgG nei pazienti SSc trattati con RTX e nei pazienti SSc non trattati.

Nei pazienti SSc in trattamento con MMF il tasso di sieropositività era significativamente più basso rispetto ai pazienti SSc non in trattamento con MMF al t1 ($p<0.05$) ma non al t3. Inoltre, i pazienti SSc trattati con MMF mostravano al t1 titoli anticorpali più bassi rispetto ai pazienti SSc non in trattamento con MMF ($p<0.05$). Diversamente, al t3, sia i tassi di sieropositività che il titolo anticorpale erano simili tra i pazienti trattati e quelli non trattati con MMF (Figura 21-E).

Nell'analisi di regressione logistica sono stati inclusi i trattamenti immunosoppressivi e solo il MTX è risultato significativo ($p<0.05$). La Tabella 9 riassume l'analisi del modello di regressione.

Trattamento	OR (CI 95%)	p-value
Corticosteroidi	1.362 (0.063-29.322)	ns
Methotrexate	39.912 (1.772-898.728)	ns
Rituximab	2.347 (0.139-39.629)	>0.05
Micofenolato mofetile	23.644 (1.088-513.767)	ns

Tabella 9. Analisi di regressione logistica per verificare la predittività di una mancata risposta alla vaccinazione in base al trattamento ricevuto. I dati relativi alla regressione sono espressi come odds ratio (OR) e intervallo di confidenza al 95% (CI al 95%).

4.3 Pazienti emodializzati e PLWH

Una coorte di pazienti composta complessivamente da 57 PLWH e pazienti emodializzati è stata confrontata con un gruppo controllo costituito da 39 operatori sanitari vaccinati nello stesso periodo.

L'età mediana del gruppo PLWH era di 65 anni (58-73). Inoltre, 19/26 erano maschi con una mediana di 28 anni (20-32) dalla diagnosi di HIV-1. Tutti i pazienti arruolati erano in trattamento con terapia antiretrovirale da una mediana di 25 anni (IQR 20-28). Tredici soggetti avevano una pregressa diagnosi di AIDS, secondo la classificazione CDC. Il livello plasmatico di HIV-RNA al basale era inferiore a 37 copie/ml in tutti i soggetti. Il profilo immunologico era rappresentato da un nadir mediano di linfociti T CD4+ di 87 (42-249) cellule/ μ L, una conta mediana di linfociti T CD4+ di 639 (451-786) cellule/ μ L al momento dell'arruolamento e una percentuale media di linfociti T CD4+ di 28 (20-38). Cinque individui avevano una coinfezione da HCV. Inoltre, 15 PLWH erano caratterizzati da almeno una comorbidity, la più diffusa era la dislipidemia, seguita da ipertensione, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari. La maggior parte dei PLWH arruolati era in trattamento con un regime basato su inibitori dell'integrasi (Integrase strand transfer inhibitors - INSTI), seguito da una terapia basata su DRVc (darunavir/cobicistat). Le caratteristiche cliniche e demografiche dei PLWH sono riportate in Tabella 10.

PLWH (n=26)	
Maschi, n, (%)	17 (71%)
Età, (anni), mediana (IQR)	65 (58-72)
Distanza dalla prima diagnosi, (anni), mediana (IQR)	28 (20-32)
TARV, (anni), mediana (IQR)	25 (20-28)
CD4+ nadir, mediana, (IQR)	87 (42-249)
CD4+ %, mediana, (IQR)	28 (20-38)
CD4+, mediana, (IQR)	639 (451-786)
Coinfezione con HCV, n, (%)	5 (21%)
Comorbidità, n, (%)	15 (63%)
Diabete, n, (%)	3 (20%)
Dislipidemia, n, (%)	8 (53%)
CVD, n, (%)	4 (27%)
Ipertensione, n, (%)	7 (47%)

Tabella 10. Caratteristiche cliniche e demografiche dei PLWH. TARV: terapia antiretrovirale, HCV: virus dell'epatite C, CVD: malattie cardiovascolari, IQR: range interquartile. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali.

Nel gruppo dei soggetti emodializzati, 20/31 pazienti (62.5%) erano maschi; l'età mediana era di 64 anni (55-78). La durata del periodo di dialisi pre-trapianto (dialysis vintage) era di 47 mesi (23-98). L'accesso vascolare per l'emodialisi era una fistola arterovenosa in 26 pazienti e un catetere venoso centrale per gli altri 6 pazienti. Ventisei soggetti (81.3%) ricevevano MHD trisettimanale, mentre i restanti 6 ricevevano un trattamento bisettimanale. Le modalità di dialisi adottate erano l'emodiafiltrazione on-line (37.5%) e la bicarbonato-dialisi (62.5%). Il sistema anticoagulante del circuito extracorporeo era basato sull'utilizzo di eparina a basso peso molecolare (LMWH) in tutti i pazienti. Sei pazienti avevano un precedente trapianto di rene, ma in ogni caso avevano iniziato la MHD almeno 18 mesi prima dello studio. Le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti emodializzati sono riportate in Tabella 11.

Pazienti emodializzati (n=31)	
Età (anni), mediana (IQR)	64 (55-78)
Femmine, n, (%)	12 (37.5%)
BMI (Kg/m²) mediana (IQR)	22.4 (20.4-25.1)
Durata della dialisi pre-trapianto (mesi), mediana (IQR)	47 (23-98)
Trapianto di rene, n, (%)	6 (18.7%)
Tipo di accesso vascolare	
Fistola arterovenosa n, (%)	26 (81.3%)
Catetere venoso centrale n, (%)	6 (18.7%)
Frequenza dell'emodialisi	
3 volte a settimana n, (%)	26 (81.3%)
2 volte a settimana n, (%)	6 (18.7%)
Modalità di emodialisi	
Bicarbonato-dialisi n, (%)	20 (62.5%)
Emodiafiltrazione on-line n, (%)	12 (37.5%)

Tabella 11. Caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti emodializzati. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. BMI: indice di massa corporea

I PLWH e i pazienti emodializzati sono stati analizzati come un singolo gruppo (PLWH/emodialisi): nel gruppo dei pazienti l'età mediana era maggiore rispetto al gruppo di controllo (69 vs. 46 anni, $p < 0.001$) e il sesso maschile era più rappresentato (69% vs. 25%, $p < 0.001$).

4.3.1 Risposta umorale nei pazienti emodializzati e PLWH

Ventuno giorni dopo la prima dose i livelli di anticorpi erano più bassi nei pazienti rispetto ai donatori sani, così come al t7, t14, t21 e t90 ($p < 0.001$) mentre al t270 non è stata raggiunta la significatività statistica ($p = 0.052$) (Fig. 22). Nella Tabella 12 è riportato il titolo di anticorpi rilevato a tutti i tempi analizzati.

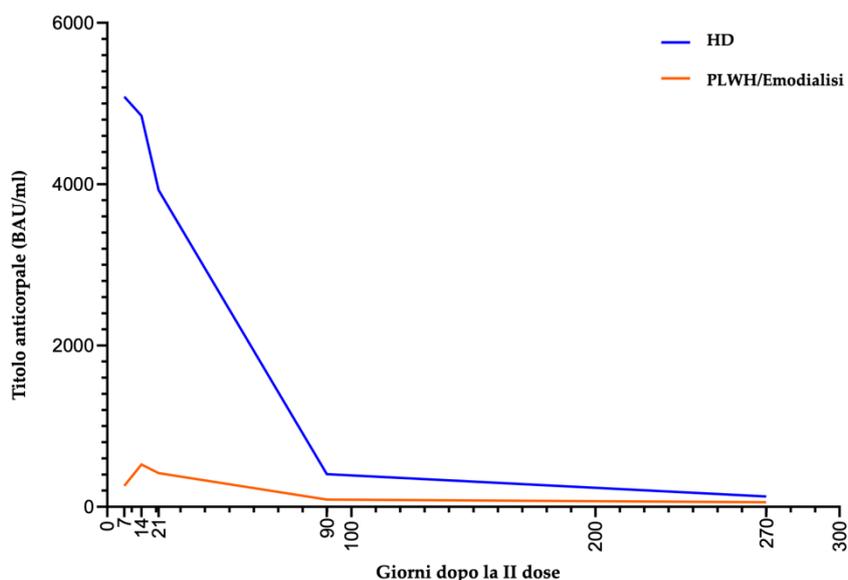


Figura 22. Trend dei valori medi dei titoli anticorpali a 7, 14, 21, 90 e 270 giorni dopo la seconda dose di vaccino negli HD (linea blu) e nei PLWH/Emodialisi (linea arancione). HD: donatori sani, PLWH: persone che vivono con HIV, BAU: Binding Antibody Units.

Variabile	PLWH/Emodialisi (n=39)	HD (n=57)	p-value
Maschi, n (%)	27 (69%)	14 (25%)	<0.001
Età (anni)	69 (58 - 76)	46 (34 - 59)	<0.001
Titolo anticorpale (BAU/ml), mediana (IQR)			
t21 dopo la I dose	28.6 (8.814 - 70.2)	386.1 (210.6 - 651.3)	<0.001
t7 dopo la II dose	261.3 (56.94 - 774.8)	5083 (3172 - 7150)	<0.001
t14 dopo la II dose	525.2 (248.3 - 1404)	4849 (3172 - 6344)	<0.001
t21 dopo la II dose	418.6 (163.93 - 781.95)	3926 (2262 - 5694)	<0.001
t90 dopo la II dose	88.92 (39.78 - 228.02)	405.6 (191.88 - 1021.8)	<0.001
t270 dopo la II dose	56.4 (31.8 - 152)	128.5 (84.11 - 203)	0.052

Tabella 12. Caratteristiche della popolazione di studio e titoli anticorpali rilevati. PLWH: persone che vivono con HIV; HD: donatori sani, BAU: Binding Antibody Units. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali.

Il modello di regressione ha dimostrato che né il genere maschile (β 27,8, IC 95% -538,44, 594,00, $p=0.923$) né l'età (β -15,3, IC 95% -35,95, 5,31, $p=0.146$) avevano influenzato i livelli di anticorpi osservati.

All'analisi multivariata, i pazienti avevano livelli significativamente più bassi di anticorpi rispetto ai donatori sani (β -3351,8, IC 95% -4202,9 - -2500,7), è stata inoltre riscontrata una

correlazione fra i titoli anticorpali rilevati 21 giorni dopo la prima dose e i livelli successivi alla seconda dose (β 2,3, IC 95% 1,5 – 3,1). I valori rilevati al t7 sono stati utilizzati come riferimento per valutare l'andamento dei titoli anticorpali nel corso dello studio. Il modello mostrava una diminuzione significativa delle IgG, rispetto al t7, al t21 (β 997,2, IC 95% 1.520,5 – 473,9), al t90 (β -4.596,1, IC 95% -5.194,8 – -3.997,4) e al t270 (β -5.079,0, 95%CI - 5.834,0 – -4.324,1) sia nei pazienti che nel gruppo di controllo, sebbene nel gruppo dei pazienti i livelli di anticorpi fossero più bassi rispetto ai donatori a tutti i *time point* esaminati (T14: β 1.317,9, 95%CI 509,7 – 2.126,1; T90: β 4.373,1, 95% IC 3.454,3 – 5.291,8; T270: β 4.798,6, IC al 95% 3.740,9 – 5.856,3). Nella Tabella 13 sono riportati i coefficienti beta stimati (β) e gli intervalli di confidenza (CI) associati dei fattori che influenzano i livelli di anticorpi dopo la seconda dose di vaccino.

	β (95% CI)	p-value
Gruppo		
HD	Ref.	-
PLWH/Emodialisi	-3351.78 (-4202.87, -2500.69)	<0.001
Genere		
Femmine	Ref.	-
Maschi	27.8 (-538.44, 594.00)	0.923
Età (anni)	-15.3 (-35.95, 5.31)	0.146
Giorni dopo la II dose		
t7	Ref.	-
t14	-1530.42 (-676.46, 369.63)	0.565
t21	-997.21 (-1520.53, -473.89)	<0.001
t90	-4596.11 (-5194.82, -3997.41)	<0.001
t270	-5079.03 (-5833.97, -4324.09)	<0.001
Titolo anticorpale 21 giorni dopo II dose, BAU/ml	2.34 (1.55, 3.13)	<0.001
T*Group		
7* PLWH/Emodialisi	Ref.	-
14* PLWH/Emodialisi	676.07 (-136.99, 1489.14)	0.103
21* PLWH/Emodialisi	1317.91 (509.66, 2126.16)	0.001
90* PLWH/Emodialisi	4373.07 (3454.34, 5291.81)	<0.001
270* PLWH/Emodialisi	4798.57 (3740.87, 5856.27)	<0.001

Tabella 13. Modello di regressione lineare multipla per i titoli anticorpali. PLWH: persone che vivono con HIV, HD: donatori sani, BAU: Binding Antibody Units, β : Coefficiente Beta; CI: Intervallo di confidenza, Ref.: Reference.

4.3.2 Risposta cellulo-mediata (IGRA)

Cinquantuno soggetti sono stati inclusi nell'analisi della risposta cellulo-mediata al t270. Nessuna differenza significativa è stata osservata confrontando i pazienti e il gruppo di controllo che sono quindi stati analizzati come un unico gruppo. Il 46% dei soggetti era in grado di produrre IFN-gamma in seguito a stimolazione dei linfociti T. Stratificando la popolazione in base alla reattività all'IGRA, il gruppo "reactive" mostrava livelli anticorpali più elevati rispetto ai "non reactive" ($p=0.009$), i risultati sono riportati in Figura 23 e nella Tabella 14.

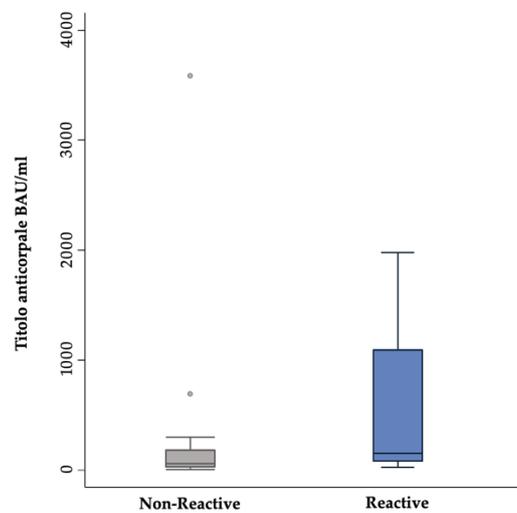


Figura 23. Titoli anticorpali 270 giorni dopo la seconda dose di vaccino nei soggetti non-reactive e reactive. Il box plot mostra le mediane, gli IQR e gli outlier. Non-reactive: soggetti in cui non è stata rilevata alcuna risposta cellulo-mediata, reactive: soggetti in cui è stata rilevata una risposta cellulo-mediata, BAU: Binding Antibody Units.

Variabile	Non-Reactive (n=27)	Reactive (n=24)	p-value
Soggetti emodializzati, n, (%)	14 (51.9%)	15 (62.5%)	0.44
Maschi, n, (%)	9 (33.4%)	13 (61.9%)	0.13
Età (anni), mediana (IQR)	57 (50 - 72)	55.5 (38 - 67)	0.47
Titolo anticorpale (BAU/ml), mediana (IQR)	61.4 (23.4 189)	177.5 (81.7 1160)	0.009

Tabella 14. Caratteristiche del sottogruppo di individui arruolati per il test IGRA. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. BAU: Binding Antibody Units.

4.4 Pazienti con tumori solidi

Sessantasei pazienti oncologici (cancer patients, CPs) afferenti all'Unità Operativa di Oncologia dell'Ospedale Policlinico Umberto I sono stati arruolati per lo studio. Tra questi, 47 erano stati vaccinati con tre dosi di vaccino a mRNA (CPs-3) mentre 19 avevano ricevuto un'ulteriore quarta dose (CPs-4).

Come gruppo di controllo, sono stati arruolati 27 donatori sani (healthy donors, HD) abbinati per età e genere vaccinati con tre dosi di vaccino a mRNA nello stesso periodo dei pazienti.

Nel gruppo CPs-3, 21 (45%) erano in trattamento con immunoterapia, di cui 11 (23%) erano sottoposti solo a immunoterapia e 10 (21,2%) ad una combinazione di chemio- e immunoterapia, 20 (43%) a chemioterapia e 6 (12,8%) erano in terapia con farmaci biologici. Nel gruppo CPs-4, 3 (16%) erano in trattamento con immunoterapia, 9 (47%) chemioterapia, 3 (16%) sia con chemioterapia che immunoterapia e 4 (41%) erano trattati con farmaci biologici.

Infine, il 64% e il 58% dei pazienti dei gruppi CPs-3 e CPs-4, rispettivamente, riferiva una pregressa infezione da SARS-CoV-2 dopo la terza dose di vaccino. Allo stesso modo, il 58% dei donatori sani riferiva una precedente infezione da SARS-CoV-2 dopo la terza dose di vaccino. Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio sono riportate nella Tabella 15.

Variabile	CPs-3 (n=47)	CPs-4 (n=19)	HD (n=27)
Età (anni), mediana (IQR)	60 (51-69)	58 (55-65)	57 (48-62)
Maschi/Femmine	25/22	5/14	9/18
Pregressa infezione da SARS-CoV-2	30	11	15
Durata della terapia (mesi), mediana (IQR)	7 (2-22)	18 (4-36)	
Immunoterapia	21	7	
Tumore primitivo			
Polmone	18	3	
Mammella	9	10	
Colon	4	3	
Vescica	3	0	
Testa-collo	2	0	
Prostata	2	0	
Retto	2	0	
Stomaco	2	0	
Esofago	1	0	
Rene	1	0	
Ovaio	1	0	
Pancreas	1	2	
Cute	0	1	
Surrene	1	0	
Comorbidità si/no	28/19	13/6	
Cardiovascolari	19	12	
Endocrinologiche	8	4	
Gastrointestinali	5	2	
Pneumologiche	4	1	
Patologie autoimmuni	2	1	
Neurologiche	1	2	
Infettive	1	1	
Psicologiche/psichiatriche	1	0	
Urologiche	1	0	

Tabella 15. Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione di studio. Le variabili continue sono riportate come mediane (IQR), le variabili categoriche sono riportate come numeri e percentuali. CPs-3: pazienti affetti da cancro che hanno ricevuto 3 dosi di vaccino; CPs-4: pazienti affetti da cancro che hanno ricevuto 4 dosi di vaccino; HD: donatori sani; n: numero; IQR: range interquartile.

4.4.1 Risposta umorale nei pazienti con tumori solidi

Un anno dopo aver ricevuto la terza dose di vaccino anti-SARS-CoV-2, i titoli anticorpali osservati erano inferiori nel gruppo CPs-3 rispetto al gruppo CPs-4 ($p=0.0209$). Inoltre, dal

confronto con i donatori sani, soltanto il gruppo CPs-3 risultava avere livelli di anticorpi inferiori ($p = 0.0079$), mentre non sono state osservate differenze significative tra CPs-4 e HD (Figura 24-A).

Tutti i gruppi sono stati stratificati in base alla pregressa infezione da SARS-CoV-2, da questa analisi è stato riscontrato un titolo anticorpale più basso nei pazienti naïve rispetto ai pazienti experienced all'interno del gruppo CPs-3 ($p=0.0004$) (Figura 24-B). Al contrario, non sono state osservate differenze tra soggetti naïve ed experienced dei gruppi CPs-4 e HD (Figura 24-B). Inoltre, nei naïve del gruppo CPs-3, i titoli anticorpali erano più bassi rispetto ai naïve sia del gruppo CPs-4 ($p=0.0060$) che degli HD ($p=0.0380$) (Figura 24-B). Quando sono stati comparati i titoli anticorpali dei soggetti experienced non è stata trovata alcuna differenza significativa fra i soggetti dei diversi gruppi (Figura 24-B).

Infine, stratificando i pazienti in base al trattamento ricevuto, sono stati rilevati titoli anticorpali più bassi nel sottogruppo dei CPs-3 rispetto ai CPs-4 trattati con immunoterapia ($p=0.0043$). Confrontando i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 in trattamento con immunoterapia con gli HD, il primo mostrava titoli anticorpali inferiori ($p=0.0085$). Non sono state riscontrate differenze significative nella produzione di anticorpi confrontando il sottogruppo CPs-4 in trattamento con immunoterapia con HD, così come con i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 non trattati con immunoterapia (Figura 24-C).

4.4.2 Anticorpi neutralizzanti

Esaminando i titoli PRNT50 verso il ceppo Wuhan, è stato osservato un titolo inferiore nel gruppo CPs-3 rispetto agli HD, sebbene non si raggiunga la significatività statistica ($p=0.07$) (Figura 24-D). È stato osservato un titolo PRNT50 inferiore verso il ceppo Wuhan tra i pazienti naïve rispetto ai pazienti experienced del gruppo CPs-3 ($p < 0.0001$) (Figura 24-E). Al contrario, non sono state osservate differenze significative tra soggetti naïve ed experienced nei gruppi CPs-4 e HD (Figura 24-E). Inoltre nel sottogruppo di CP-3 naïve un titolo PRNT50 più basso verso il ceppo Wuhan è stato osservato rispetto a quello degli HD naïve ($p = 0.0045$) (Figura 24-E). Comparando invece i sottogruppi di CPs-4 e HD naïve non sono state trovate differenze nel titolo PRNT50 verso il ceppo Wuhan, così come tra i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 experienced rispetto agli HD experienced (Figura 24-E).

Infine, stratificando i pazienti in base al trattamento con immunoterapia non sono state riscontrate differenze nel titolo PRNT50 rilevato verso il ceppo Wuhan (Figura 24-F). Tuttavia il valore PRNT50 misurato verso il ceppo Wuhan, nel sottogruppo dei CPs-3 sottoposto a immunoterapia era inferiore rispetto a quello osservato negli HD, sebbene la significatività statistica non sia stata raggiunta ($p = 0.0731$) (Figura 24-F).

Il titolo PRNT50 contro il ceppo Omicron è stato misurato per tutti i soggetti naïve all'infezione. Complessivamente, il titolo PRNT50 contro Omicron era inferiore al titolo PRNT50 contro Wuhan ($p < 0.0001$). Inoltre, il titolo PRNT50 contro Omicron era più basso nel gruppo CPs-3 rispetto agli HD, nonostante la differenza non sia statisticamente significativa ($p = 0.0817$). Infine, non è stata osservata alcuna differenza tra CPs-4 e HD (Figura 24-G).

I valori mediani (IQR) relativi ai titoli anticorpali rilevati (CLIA e PRNT) sono riportati nella Tabella 16.

	CPs-3		CPs-4		HD	
Titolo anticorpale (BAU/ml)	1300 (543-4640)		2510 (1630-7790)		2810 (1880-10100)	
PRNT50 - Wuhan	640 (400-1280)		1280 (640-5120)		2560 (1280-2560)	
PRNT50 - Omicron	20 (10-120)		40 (40-640)		160 (125-800)	
	Experienced	Naïve	Experienced	Naïve	Experienced	Naïve
Titolo anticorpale (BAU/ml)	2000 (1155-6090)	543 (233-1440)	3450 (1630-12600)	2160 (1505-3370)	2810 (2200-6650)	3535 (471-11900)
PRNT50 - Wuhan	1280 (640-5120)	160 (80-480)	2560 (640-5120)	640 (400-1280)	2560 (1280-2560)	1920 (400-5120)
	Immunotherapy	Non Immunotherapy	Immunotherapy	Non Immunotherapy		
Titolo anticorpale (BAU/ml)	1250 (589-2220)	1838 (437-5893)	5320 (2623-18175)	2220 (1219-5650)	2810 (1880-10100)	
PRNT50 - Wuhan	1280 (160-2560)	960 (160-5120)	1600 (640-12800)	1280 (480-3840)	2560 (1280-2560)	
PRNT50 - Omicron	30 (12.5-70)	20 (10-160)	-	40 (25-5280)	160 (125-800)	

Tabella 16. Titoli anticorpali rilevati tramite saggio CLIA e PRNT nella popolazione di studio stratificata per numero di dosi ricevute, progressa infezione da SARS-CoV-2 e trattamento con immunoterapia. I dati sono riportati come mediane (IQR), il titolo PRNT50 è espresso come il reciproco della diluizione più alta in grado di ridurre il numero di unità formanti placca del 50% rispetto al controllo virale. CPs-3: pazienti affetti da cancro che hanno ricevuto 3 dosi di vaccino, CPs-4: pazienti affetti da cancro che hanno ricevuto 4 dosi di vaccino, HD: donatori sani, IQR: range interquartile, BAU: binding antibody units, PRNT: Plaque Reduction Neutralization Test.

4.4.3 Correlazione fra i titoli anticorpali rilevati attraverso test CLIA e PRNT50

Considerando l'intera popolazione studiata, una correlazione positiva è stata rilevata tra i livelli di anticorpi anti-Spike e i titoli di anticorpi neutralizzanti sia verso il ceppo Wuhan ($\rho=0.8661$, $p<0,0001$) (Figura 24-H) che verso la variante Omicron ($\rho=0.7356$, $p<0.0001$) (Figura 24-I). Anche quando i gruppi CPs e HD sono stati valutati separatamente è stata osservata una correlazione positiva tra il livello di anticorpi determinati con test CLIA ed i titoli neutralizzanti verso i ceppi Wuhan e Omicron per entrambi i gruppi (CPs: $\rho=0.8847$, $p<0.0001$; HD: $\rho=0.7242$, $p<0.0001$).

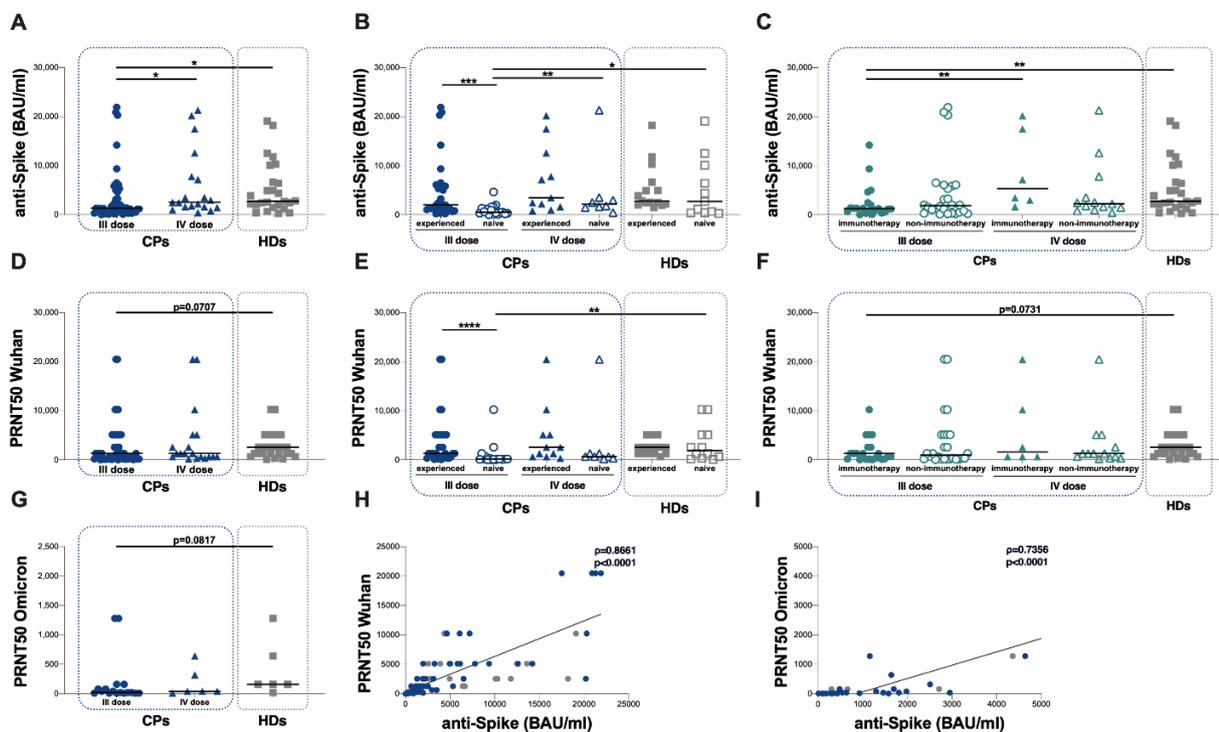


Figura 24. Valutazione della risposta umorale nella popolazione di studio. I titoli di anticorpi nei CPs sono stati analizzati in base a (A) il numero di dosi di vaccino ricevute (B) pregressa infezione da SARS-CoV-2 e (C) immunoterapia. Il valore PRNT50 verso il ceppo Wuhan nei CPs è stato valutato in base a (D) il numero di dosi di vaccino ricevute, (E) pregressa infezione da SARS-CoV-2 e (F) immunoterapia (G) Il valore PRNT50 verso la variante Omicron nei CPs è stato valutato in base al numero dose di vaccino ricevute. (H) Correlazione positiva tra gli anticorpi rilevati tramite CLIA e PRNT50 contro il ceppo Wuhan. La correlazione lineare è stata valutata utilizzando il test di regressione ($R^2=0.5848$, $p<0.0001$). (I) Correlazione positiva tra gli anticorpi rilevati tramite CLIA e PRNT50 contro la variante Omicron. La correlazione lineare è stata valutata utilizzando il test di regressione ($R^2=0.9075$, $p<0.0001$).

CPs: cancer patients; HDs: healthy donors; BAU: binding antibody units; PRNT50: Plaque Reduction Neutralization Test. ****: $p<0.0001$; ***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; *: $p<0.05$.

4.4.4 Risposta cellulo-mediata nei pazienti con tumori solidi

Per lo studio della risposta cellulo-mediata nei pazienti con tumori solidi sono state valutate le percentuali di linfociti T CD4+ e CD8+ produttori IFN γ , IL2 e TNF α . Abbiamo innanzi tutto confrontato i dati delle stimolazioni wild-type e omicron per ciascun gruppo incluso nella popolazione oggetto di studio. Come mostrato nella Figura 25-A, in ognuno dei tre gruppi arruolati (CPs-3, CPs-4 e HD) non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nelle percentuali di cellule responding e triple-positive stimulate con peptidi wild-type o omicron (Tabella 17). Percentuali inferiori di linfociti T CD4+ responding sono state riscontrate in entrambi i sottogruppi, CPs-3 e CPs-4, rispetto agli HD a seguito della stimolazione con i peptidi wild-type ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) e omicron ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) (Figura 25-A), nonché percentuali inferiori di linfociti T CD8+ responding sia dopo la stimolazione con i peptidi wild-type ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) che per la stimolazione con i peptidi omicron ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) (Figura 25-A). Inoltre, i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 mostravano percentuali più basse di linfociti T CD4+ triple-positive rispetto agli HD sia per la stimolazione con peptidi wild-type ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) che per la stimolazione con peptidi omicron ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) così come una percentuale inferiore di linfociti T CD8+ triple-positive sia in seguito a stimolazione con peptidi wild-type ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) che omicron ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, rispettivamente) (Figura 25-A). Tutti i valori mediani e gli IQR sono riportati nella Tabella 17.

Infine, è stata confrontata la qualità della risposta cellulo mediata nei pazienti e nei donatori sani. In entrambi i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 è stata osservata una distribuzione non uniforme di sottogruppi di linfociti T, con una predominanza di linfociti T monofunzionali produttori TNF α (IFN γ -IL2-TNF α +) sia in seguito alla stimolazione con i peptidi wild-type che omicron. Contrariamente, nel gruppo di controllo, la distribuzione di linfociti T era più eterogenea relativamente alla capacità di produrre citochine (Figura 25-B). Infatti, confrontando la distribuzione dei linfociti T CD4+ dei sottogruppi CPs-3 e CPs-4 con gli HD, è stata osservata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.0001$) così come nella distribuzione dei linfociti T CD8+ ($p < 0.0001$) (Figura 25-B).

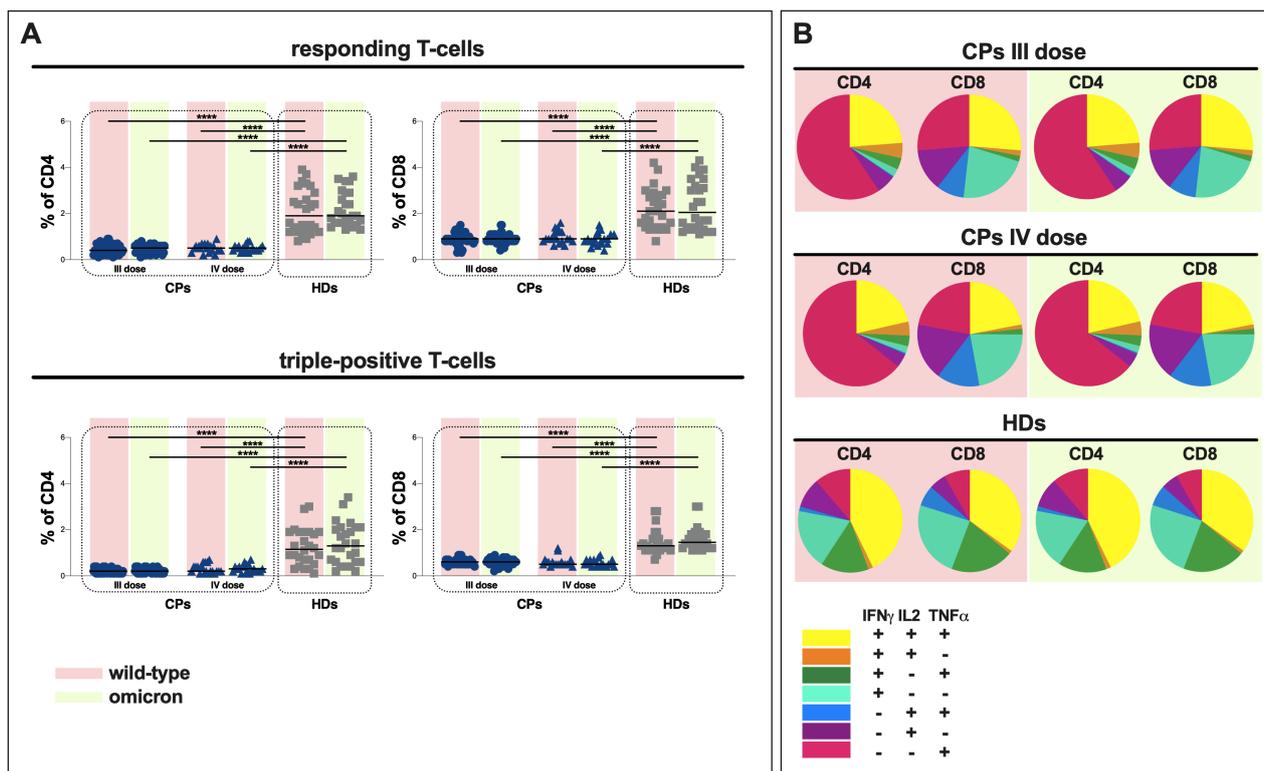


Figura 25. Valutazione della risposta cellulo mediata nella popolazione di studio. (A) Percentuali di linfociti T responding e triple-positive in CPs e HD. (B) Grafici a torta che rappresentano l'analisi delle citochine prodotte dai linfociti T in CPs e HD. In rosa e verde sono riportati i dati riguardanti la stimolazione utilizzando i peptidi wild-type e omicron rispettivamente. CPs: cancer patients; HDs: donatori sani. ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

	CPs (n=66)				HD (n=26)	
	CPs-3 (n=47)		CPs-4 (n=19)			
Responding T-cells						
% of CD4	0.4 (0.3-0.6)	0.5 (0.3-0.6)	0.5 (0.4-0.6)	0.5 (0.4-0.6)	1.9 (1.2-3.0)	1.9 (1.6-2.9)
% of CD8	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-0.9)	0.9 (0.8-1.2)	0.9 (0.7-1.1)	2.1 (1.4-2.8)	2.1 (1.4-3.3)
Triple-positive T-cells						
% of CD4	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.2-0.4)	0.3 (0.2-0.4)	1.2 (0.7-1.9)	1.3 (0.6-2.1)
% of CD8	0.6 (0.5-0.7)	0.6 (0.5-0.7)	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.4-0.7)	1.3 (1.1-1.6)	1.5 (1.3-1.8)

Tabella 17. Percentuali di linfociti T responding e triple-positive nella popolazione di studio. I dati sono mostrati come mediane (IQR). Le colonne rosa mostrano i dati per la stimolazione con peptidi wild-type e le colonne verdi mostrano i dati per la stimolazione con peptidi omicron. CPs: cancer patients; HD: donatori sani; CPs-3: pazienti oncologici che hanno ricevuto tre dosi di vaccino al momento dell'arruolamento; CPs-4: pazienti oncologici che hanno ricevuto quattro dosi di vaccino al momento dell'arruolamento.

In base alla precedente infezione da SARS-CoV-2, i CPs e gli HD sono stati stratificati in due sottogruppi: experienced e naïve. Nei sottogruppi dei CPs-3 e CPs-4, sono state osservate percentuali più elevate di linfociti T che responding negli experienced rispetto naïve sia in seguito alla stimolazione con i peptidi wild-type che omicron (per il gruppo CPs-3 CD4+: $p=0.0373$ e $p=0.0482$, rispettivamente; CD8+: $p=0.0169$ e $p=0.0402$, rispettivamente. Per il gruppo CPs-4 CD4+: $p=0.0559$ e $p=0.0485$, rispettivamente; CD8: $p=0.0422$ e $p=0.0371$, rispettivamente) (Figura 26). Allo stesso modo, sono state osservate percentuali più elevata di linfociti T triple-positive dopo la stimolazione con i peptide wild-type e omicron nei CPs experienced rispetto ai naïve (per il gruppo CPs-3 CD4+: $p=0.0373$ e $p=0.0131$, rispettivamente; CD8+: $p=0,0402$ e $p=0,0003$, rispettivamente. Per il gruppo CPs-4 CD4+: $p=0,0061$ e $p=0,0379$, rispettivamente; CD8+: $p=0,0127$ e $p = 0,0306$, rispettivamente) (Figura 26). Confrontando le percentuali di linfociti T stimolati negli HD experienced e naïve non sono state riscontrate differenze significative. Quando sono stati comparati con gli HD, i CPs mostravano percentuali più basse di linfociti T responding e triple-positive sia nel sottogruppo experienced che naïve indipendentemente dal numero di dosi di vaccino ricevute (Figura 26, Tabella 18).

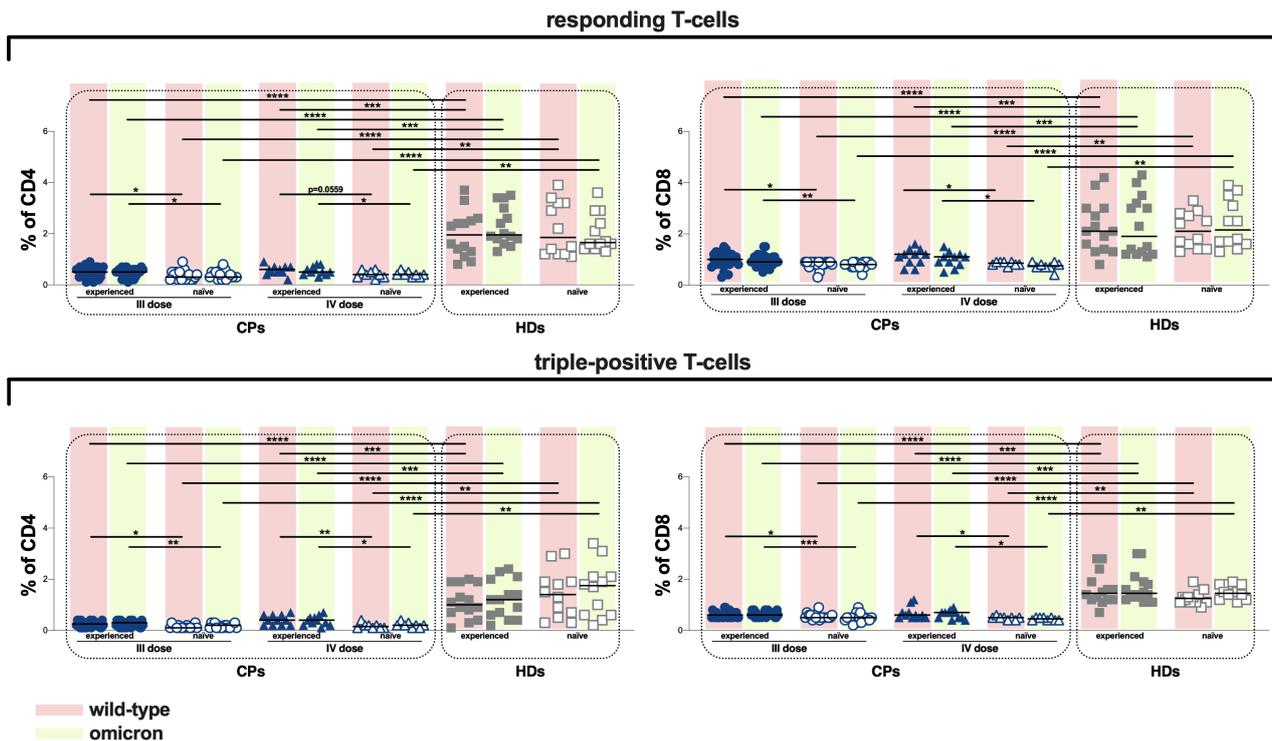


Figura 26. Valutazione della risposta cellulo mediata nei CPs e negli HD stratificati in base alla precedente infezione da SARS-CoV-2. In rosa e verde sono riportati i dati riguardanti la stimolazione utilizzando i peptidi wild-type e omicron rispettivamente. CPs: cancer patients; HDs: donatori sani. ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

	CPs (n=66)				HD (n=26)							
	CPs-3 (n=47)		CPs-4 (n=19)		Experienced		Naïve					
	Experienced	Naïve	Experienced	Naïve	Experienced	Naïve	Experienced	Naïve				
Responding T-cells												
% of CD4+	0.5 (0.3-0.6)	0.5 (0.4-0.6)	0.3 (0.2-0.5)	0.3 (0.3-0.5)	0.6 (0.5-0.7)	0.5 (0.4-0.7)	0.4 (0.3-0.6)	0.4 (0.3-0.5)	2.0 (1.3-2.5)	2.0 (1.8-3.1)	1.9 (1.2-3.2)	1.7 (1.5-2.8)
% of CD8+	1.0 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-0.9)	0.8 (0.7-0.9)	1.2 (0.9-1.4)	1.1 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-0.9)	0.8 (0.7-0.9)	2.1 (1.4-3.0)	1.9 (1.2-3.3)	2.1 (1.5-2.8)	2.2 (1.6-3.4)
Triple-positive T-cells												
% of CD4+	0.3 (0.2-0.3)	0.3 (0.2-0.3)	0.1 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.2)	0.4 (0.2-0.6)	0.4 (0.2-0.5)	0.2 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.3)	1.0 (0.6-1.9)	1.2 (0.6-2.0)	1.4 (0.6-1.9)	1.8 (0.6-2.1)
% of CD8+	0.6 (0.5-0.7)	0.6 (0.6-0.7)	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.4-0.5)	0.6 (0.5-0.7)	0.7 (0.5-0.7)	0.5 (0.4-0.5)	0.5 (0.4-0.5)	1.5 (1.2-2.0)	1.4 (1.3-2.0)	1.3 (1.1-1.4)	1.5 (1.3-1.8)

Tabella 18. Percentuali di linfociti T responding e triple-positive nella popolazione di studio in base alla progressa infezione da SARS-CoV-2.

I dati sono mostrati come mediane (IQR). Le colonne rosa mostrano i dati per la stimolazione con peptidi wild-type e le colonne verdi mostrano i dati per la stimolazione con peptidi omicron. CPs: cancer patients; HD: donatori sani; CPs-3: pazienti oncologici che hanno ricevuto tre dosi di vaccino al momento dell'arruolamento; CPs-4: pazienti oncologici che hanno ricevuto quattro dosi di vaccino al momento dell'arruolamento.

Infine i CPs sono stati stratificati in base al trattamento ricevuto. Percentuali più elevate di linfociti T responding e triple-positive sono state osservate nei CPs trattati con immunoterapia rispetto ai CPs non sottoposti a immunoterapia (Figura 27, Tabella 19). Rispetto agli HD, sono state rilevate percentuali più basse di linfociti T responding e triple-positive nei CPs non in trattamento con immunoterapia in entrambi i sottogruppi CPs-3 e CPs-4 (Figura 27, Tabella 19). Infine, nel sottogruppo CPs-3 sottoposto a immunoterapia è stata osservata una percentuale inferiore di linfociti T responding e triple-positive rispetto agli HD (Figura 27, Tabella 19), mentre nel sottogruppo CPs-4 trattato con immunoterapia non è stata trovata alcuna differenza nelle percentuali di linfociti T responding e triple-positive rispetto agli HD (Figura 27, Tabella 19).

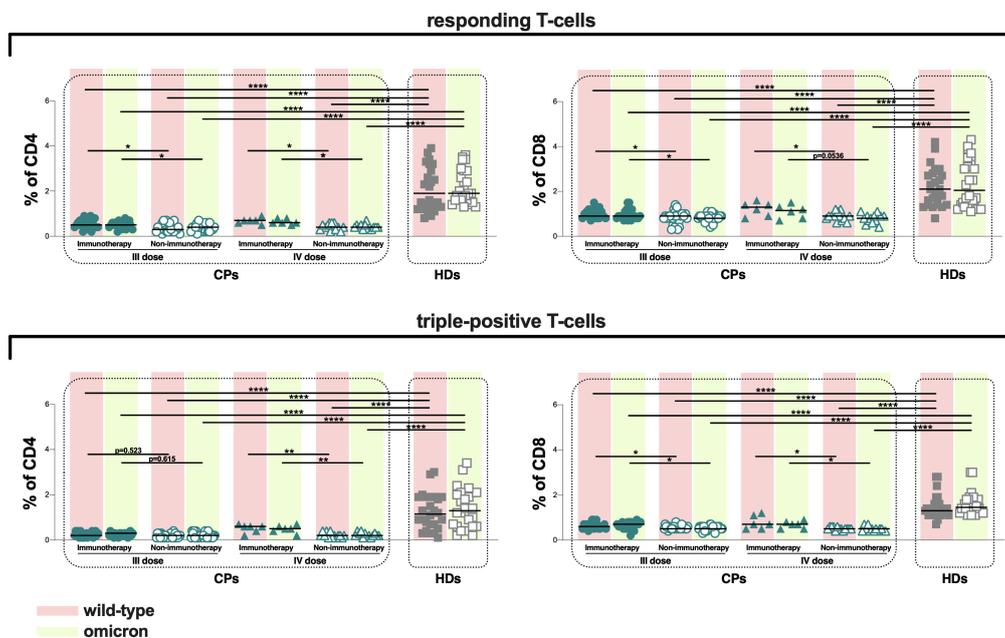


Figura 27. Valutazione della risposta cellulo mediata nei CPs e negli HD stratificati in base all'immunoterapia. In rosa e verde sono riportati i dati riguardanti la stimolazione utilizzando i peptidi wild-type e omicron rispettivamente. CPs: cancer patients; HDs: donatori sani. ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

		CPs (n=66)							
		CPs-3 (n=47)				CPs-4 (n=19)			
		Immunotherapy		Non-immunotherapy		immunotherapy		Non-immunotherapy	
Responding T-cells									
% of CD4+		0.5 (0.4-0.7)	0.5 (0.4-0.6)	0.3 (0.2-0.5)	0.4 (0.3-0.5)	0.7 (0.6-0.8)	0.6 (0.6-0.8)	0.4 (0.3-0.6)	0.4 (0.4-0.5)
% of CD8+		0.9 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.7-1.0)	0.8 (0.7-0.9)	1.3 (0.9-1.5)	1.2 (0.8-1.4)	0.9 (0.8-1.0)	0.8 (0.7-0.9)
Triple-positive T-cells									
% of CD4+		0.2 (0.2-0.4)	0.3 (0.2-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.3 (0.1-0.3)	0.6 (0.4-0.6)		0.2 (0.1-0.3)	
% of CD8+		0.6 (0.5-0.7)	0.7 (0.5-0.8)	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.5-0.6)	0.7 (0.5-1.1)	0.7 (0.5-0.8)	0.5 (0.5-0.5)	0.5 (0.4-0.5)

Tabella 19. Percentuali di linfociti T responding e triple-positive nei CPs stratificati in base all'immunoterapia. I dati sono mostrati come mediane (IQR). Le colonne rosa mostrano i dati per la stimolazione con peptidi wild-type e le colonne verdi mostrano i dati per la stimolazione con peptidi omicron. CPs: cancer patients; HDs: donatori sani; CPs-3: pazienti oncologici che hanno ricevuto tre dosi di vaccino al momento dell'arruolamento; CPs-4: pazienti oncologici che hanno ricevuto quattro dosi di vaccino al momento dell'arruolamento.

5. DISCUSSIONE

La pandemia di COVID-19 ha reso necessario un rapido sviluppo di vaccini e la conseguente attuazione di campagne di vaccinazione. A novembre 2023 più di 5 miliardi di persone hanno completato la serie di vaccinazioni primarie (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*). Il ruolo preventivo dei vaccini anti-SARS-CoV-2 ha una grande rilevanza soprattutto per le popolazioni fragili, per le quali il COVID19 rappresenta ancora una minaccia. I soggetti con fragilità possono essere meno reattivi o mostrare una risposta immunitaria più variabile alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 (Bessen *et al.*, 2022; Guardiani *et al.*, 2022; Moreno *et al.*, 2022; Barnes *et al.*, 2023; Udomkarnjananun *et al.*, 2023).

Inoltre, la maggior parte di questi pazienti, segue regimi terapeutici che possono alterare ulteriormente la risposta immunitaria nei confronti del vaccino. Vista l'importanza che questo argomento riveste, lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di valutare, in momenti diversi della pandemia, lo stato sierologico e l'immunogenicità della vaccinazione in diverse coorti di pazienti fragili e verificare gli effetti delle terapie farmacologiche sulle risposte umorali e/o cellulari. Dal momento che lo studio ha preso in esame diverse categorie di soggetti fragili, la discussione dei dati è stata suddivisa per ogni gruppo analizzato.

Pazienti con neoplasie ginecologiche

I pazienti oncologici costituiscono una popolazione estremamente complessa a causa della malattia e delle terapie somministrate. Quando si prende in esame un paziente oncologico non si fa riferimento a una sola malattia, quanto piuttosto a diversi sottotipi istologici di malattie, con caratteristiche e profili molecolari distinti.

La sicurezza dei vaccini e le evidenze disponibili in questi pazienti sono limitate, al momento ci sono dati sufficienti per considerare il vaccino sicuro in questa sottopopolazione, ma le informazioni sulla durata dell'immunogenicità sono ridotte sia nella popolazione generale sia nei pazienti oncologici (Barnes *et al.*, 2023).

Dalle analisi condotte sulle pazienti con neoplasie ginecologiche il vaccino risulta essere ben tollerato sia dalle pazienti che dal gruppo di controllo; infatti, gli effetti avversi riportati

erano soltanto lievi, un dato in linea con quanto già riportato in letteratura (Polack *et al.*, 2020; Baden *et al.*, 2021; Forster *et al.*, 2021).

Tutte le pazienti arruolate hanno mostrato una sierconversione adeguata e nessuna di loro ha contratto l'infezione da SARS-CoV-2 nel corso dello studio.

Studi simili hanno dimostrato che dopo una singola somministrazione di vaccino il tasso di sierconversione era più basso nei pazienti oncologici (Goshen-Lago *et al.*, 2021; Palich *et al.*, 2021), in particolare nei soggetti con più di 65 anni e sottoposti a chemioterapia, rispetto al gruppo di controllo (Palich *et al.*, 2021); tuttavia, dopo la seconda dose di vaccino in tutti i pazienti si verificava sierconversione (Goshen-Lago *et al.*, 2021).

Nella popolazione da noi esaminata non abbiamo osservato differenze in termini di titoli anticorpali un mese dopo la seconda dose di vaccino, tuttavia, nel gruppo delle pazienti i livelli di anticorpi sono diminuiti più rapidamente rispetto al gruppo di controllo. Questo dato, in accordo con quanto riportato in letteratura (Massarweh *et al.*, 2021; De Placido *et al.*, 2022) sottolinea la maggiore vulnerabilità e la necessità di ulteriori richiami per le pazienti con neoplasie ginecologiche.

Inoltre, nella nostra popolazione di studio, le pazienti con età maggiore di 50 anni e BMI superiore o uguale a 30 kg/m² avevano livelli di anticorpi più bassi, evidenziando un sottogruppo particolarmente fragile che potrebbe beneficiare di un adattamento del piano vaccinale per mantenere una protezione adeguata dall'infezione.

Nessuna differenza è stata rilevata stratificando la popolazione in base alla stadiazione FIGO, alle comorbidità, lo stato della malattia (stabile o in progressione) o al trattamento con chemioterapici (in corso o precedente). Quest'ultimo dato è in contrasto con altri studi effettuati su pazienti vaccinati nello stesso periodo, che hanno rilevato nel trattamento chemioterapico attivo un fattore fortemente associato alla mancata sierconversione (Palich *et al.*, 2021). Questa differenza potrebbe essere legata alla ridotta numerosità campionaria e alla mancanza di osservazioni successive ai tre mesi dopo la seconda dose.

Pazienti con sclerosi sistemica

Per quanto riguarda i pazienti con SSc, abbiamo osservato 1 mese dopo la seconda dose di vaccino un tasso di sierconversione simile a quello del gruppo di controllo, ma

significativamente più basso dopo 3 mesi. Relativamente al titolo anticorpale abbiamo osservato un andamento opposto, con livelli di IgG più bassi nei pazienti al t1 e simile a quelli dei donatori sani al t3.

Anche questa popolazione, quindi, è stata in grado di attivare la risposta umorale dopo la vaccinazione e inoltre le caratteristiche cliniche dei pazienti non hanno influenzato il tasso di sieropositività come già dimostrato in altri lavori (Sampaio-Barros *et al.*, 2021).

Inoltre, nel periodo di osservazione, nessun paziente ha riportato riacutizzazioni della malattia, dunque, la vaccinazione non ha avuto effetto sul decorso della malattia.

Sette mesi dopo la somministrazione della prima dose, 11 pazienti hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2, di questi soltanto uno è andato incontro a una sintomatologia severa e questo conferma l'efficacia del vaccino. Confrontando questi pazienti con quelli che non hanno contratto l'infezione, abbiamo rilevato nel primo gruppo un livello di anticorpi significativamente più basso al t1, un dato che conferma il ruolo protettivo della risposta umorale sviluppata dopo la vaccinazione.

Il confronto fra i pazienti affetti da SSc trattati e non trattati con immunosoppressori ha mostrato sia un tasso di sieropositività che un titolo anticorpale inferiore nei pazienti trattati. Anche questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura, infatti numerosi studi hanno dimostrato che gli individui immunocompromessi, sia per la patologia di base che per la terapia alla quale sono sottoposti, hanno una risposta immunitaria più debole dopo la vaccinazione rispetto agli immunocompetenti (Agha *et al.*, 2021; Boyarsky *et al.*, 2021; Oyaert *et al.*, 2022).

In accordo con altri studi, abbiamo rilevato che tutti i trattamenti, ad eccezione del RTX inducevano nel gruppo dei pazienti una risposta anticorpale inferiore rispetto a quella rilevata nel gruppo di controllo (Braun-Moscovici *et al.*, 2021; Haberman *et al.*, 2021). Questo dato suggerisce in primo luogo che anche il trattamento con basse dosi di prednisone può influire negativamente sulla risposta alla vaccinazione, e inoltre, sebbene il MTX sia stato interrotto in prossimità della vaccinazione, il periodo di sospensione sembrerebbe troppo breve per non avere un effetto sulla risposta umorale.

PLWH e pazienti emodializzati

Per i PLWH e i pazienti emodializzati è stato possibile monitorare più a lungo l'andamento della risposta immunitaria, in particolare quella umorale.

In questo gruppo di pazienti, i titoli anticorpali si sono mantenuti sempre inferiori rispetto ai donatori sani ad eccezione dei valori rilevati 270 giorni dopo la seconda dose. Il tasso di sieroconversione ha raggiunto il suo picco 14 giorni dopo la seconda dose per il gruppo dei pazienti (91%) che era invece del 100% per il gruppo di controllo.

Pur avendo osservato immunogenicità in entrambi i gruppi, ancora una volta le nostre osservazioni confermano che gli individui con una condizione medica di base sviluppano e mantengono una risposta anticorpale più debole dopo la vaccinazione rispetto ai soggetti sani. Come confermato da altri lavori, i PLWH sono in grado di sviluppare una risposta umorale in seguito alla somministrazione del vaccino, sebbene più debole se confrontata con quella di persone immunocompetenti (Levy *et al.*, 2021; Antinori *et al.*, 2022). Inoltre, dal lavoro di Antinori *et al.*, in questi soggetti, la produzione di anticorpi è fortemente correlata alla conta dei linfociti T CD4+ al momento della vaccinazione, suggerendo che la valutazione di questo parametro potrebbe essere utilizzata per regolare la strategia vaccinale in questa specifica categoria di individui. Allo stesso modo, una minore immunogenicità del vaccino è stata dimostrata anche nei pazienti affetti da ESKD, che mostrano una minore entità della risposta umorale rispetto alla popolazione generale (Grupper *et al.*, 2021; Lesny *et al.*, 2021; Lin and Hung, 2023).

Coerentemente con altri dati presenti in letteratura, a partire da 21 giorni dopo la seconda dose, abbiamo osservato un declino dei livelli di anticorpi, sebbene questo fosse maggiore nel gruppo dei pazienti (Anand *et al.*, 2020; Brisotto *et al.*, 2021; Israel *et al.*, 2021; Brumme *et al.*, 2022). Infine, l'analisi multivariata ha confermato che nonostante l'età mediana dei pazienti fosse più alta rispetto al gruppo di controllo e che i soggetti arruolati fossero più frequentemente maschi, questi fattori non hanno influenzato l'andamento della risposta umorale nella nostra popolazione di studio.

Per quanto riguarda l'analisi della risposta cellulo-mediata, non sono state rilevate differenze significative confrontando pazienti e donatori, ma abbiamo rilevato nei soggetti

in grado di produrre IFN- γ un più alto livello di anticorpi. Questa osservazione sembra indicare un'associazione fra la persistenza della risposta cellulo-mediata e quella umorale dopo la vaccinazione sebbene i dati a riguardo presenti in letteratura siano fra loro contrastanti (Uwamino *et al.*, 2022; Sabetta *et al.*, 2023). Nel nostro studio abbiamo avuto modo di misurare la risposta cellulare solo al t270, quindi, non è possibile stabilire con certezza se la risposta cellulo-mediata diminuisca in maniera concomitante al livello di anticorpi.

Inoltre, la bassa percentuale di soggetti in grado di produrre una risposta cellulare rilevabile potrebbe essere legata al tipo di test utilizzato che non consente di definire le diverse popolazioni linfocitarie e le citochine prodotte in risposta alla vaccinazione.

Pazienti con tumori solidi

I pazienti oncologici sia a causa del loro stato di immunosoppressione che di eventuali comorbidity risultano essere più suscettibili alle infezioni e alle loro potenziali complicazioni (Garassino, Jennifer G Whisenant, *et al.*, 2020; L. Zhang *et al.*, 2020).

In quest'ultima popolazione abbiamo indagato la risposta umorale e cellulo-mediata un anno dopo la terza dose di vaccino in pazienti che avessero ricevuto almeno tre dosi.

Innanzitutto, abbiamo osservato che la risposta umorale era più debole nei pazienti che avevano ricevuto tre dosi di vaccino rispetto ai donatori sani e ai pazienti che avevano ricevuto una dose aggiuntiva, mentre i titoli anticorpali erano paragonabili in questi ultimi due gruppi. Pur non avendo rilevato differenze significative confrontando i livelli di anticorpi neutralizzanti abbiamo osservato un *trend* paragonabile a quello osservato per gli anticorpi *binding*. La mancanza di significatività potrebbe essere legata sia alla piccola dimensione del campione che al tipo di test eseguito, automatizzato per la valutazione degli anticorpi leganti e manuale per i neutralizzanti. Alla luce di queste osservazioni abbiamo deciso di verificare se vi fosse una correlazione tra i risultati ottenuti con CLIA e PRNT. Sia per il ceppo Wuhan che per la variante Omicron abbiamo riscontrato una correlazione positiva, sebbene i titoli degli anticorpi neutralizzanti contro la variante Omicron fossero inferiori a quelli rilevati per il ceppo Wuhan (dato non mostrato). I nostri dati sono in accordo con altri studi nei quali è stata osservata una minore produzione di anticorpi nei

pazienti oncologici rispetto al gruppo di controllo dopo una sola dose *booster* di vaccino a mRNA (Ligumsky *et al.*, 2022; Liatsou *et al.*, 2023).

Nella nostra coorte i pazienti mostravano una risposta cellulo-mediata complessivamente ridotta rispetto ai donatori sani. Indipendentemente dalla dose di vaccino ricevuta e dalla variante virale utilizzata per la stimolazione dei PBMC, la produzione di citochine da parte dei linfociti T CD4+ e CD8+ era minore nei pazienti.

Anche in questo caso i risultati sono in linea con altri studi che hanno analizzato la risposta cellulo-mediata dopo la vaccinazione in pazienti con tumori solidi ed ematologici (Fendler *et al.*, 2021; Luxenburger and Thimme, 2021). I pazienti mostravano inoltre una diversa distribuzione dei sottogruppi di linfociti T, con percentuali più elevate di cellule secernenti TNF- α rispetto ai donatori sani. Questa condizione è generalmente associata a una minore protezione contro le infezioni come già documentato per altre popolazioni immunocompromesse (Seder, Darrah and Roederer, 2008).

Con l'allentamento delle misure pubbliche adottate per ridurre i casi di COVID-19 molti pazienti hanno contratto l'infezione. I pazienti inclusi nello studio a cui erano state somministrate tre dosi di vaccino, naïve all'infezione, mostravano una risposta umorale ridotta rispetto a quelli con pregressa infezione e più bassa rispetto ai donatori sani senza un'infezione precedente. Dalle nostre osservazioni, la precedente infezione così come la somministrazione di una dose aggiuntiva porta il titolo anticorpale dei pazienti oncologici a un livello paragonabile a quello osservato nei soggetti sani. Complessivamente i pazienti *experienced* mostravano una risposta cellulo-mediata più vigorosa rispetto ai naïve suggerendo la possibilità di un effetto di potenziamento dell'infezione naturale sulla risposta cellulare. Tuttavia, includendo nel confronto i donatori sani, a parità di pregressa infezione, la risposta cellulo-mediata era inferiore nei pazienti.

Abbiamo infine valutato se la terapia potesse avere un'influenza sulla risposta immunitaria alla vaccinazione, ipotizzando una diversa immunogenicità indotta dal vaccino tra pazienti sottoposti a chemioterapia e immunoterapia. In particolare, i pazienti oncologici inclusi nello studio in trattamento con immunoterapia erano sottoposti a terapia anti-*programmed cell death ligand 1* (PD-L1) per rinvigorire il sistema immunitario (Retnakumar, Chauvin and

Bayry, 2023). Globalmente abbiamo riscontrato una risposta umorale simile tra i pazienti sottoposti e non sottoposti a immunoterapia. Questo dato è in contrasto con studi precedenti nei quali pazienti oncologici trattati con *immune checkpoint inhibitors* (ICI) mostravano tassi di sierconversione e livelli di anticorpi più elevati rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia sia dopo la vaccinazione antinfluenzale che dopo 2 dosi di vaccino anti-SARS-CoV-2 (Keam *et al.*, 2020; Fenioux *et al.*, 2022). Questo risultato, apparentemente discordante potrebbe essere spiegato dal fatto che, nella nostra stratificazione, sono stati inclusi nel gruppo “immunoterapia” anche pazienti sottoposti a una combinazione di chemio- immunoterapia che potrebbero avere una risposta ridotta. L’effetto della terapia anti-PD-L1 è invece stato osservato sulla risposta cellulo-mediata che risulta essere più forte nei pazienti sottoposti a immunoterapia a prescindere dal numero di dosi ricevute. Questo risultato è coerente con lo scopo dell’ anti-PD-L1, ossia quello di stimolare la risposta immunitaria cellulare come già dimostrato per la vaccinazione antinfluenzale (C. K. Kang *et al.*, 2020).

In generale, i vaccini anti- SARS-CoV-2 sono in grado di indurre risposte cellulari e umorali specifiche generando una memoria immunitaria prevenendo quindi sia l’infezione che la sua forma grave.

Globalmente, tutte le popolazioni incluse nel nostro studio sono riuscite a sviluppare una risposta immunitaria dopo aver ricevuto il vaccino, sebbene questa fosse più debole nei diversi gruppi di pazienti sia dopo la seconda che la terza dose di vaccino.

Da lavori sui pazienti immunocompromessi, sia per immunodeficienze primarie che secondarie (infezione da HIV, trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche/terapia con cellule CAR-T, trapianto di organo solido, leucemia linfocitica cronica) emerge che in queste categorie il tasso di sierconversione, i titoli anticorpali e la risposta cellulo-mediata siano più bassi nei pazienti rispetto ai controlli sani (Bergman *et al.*, 2021; Havlin *et al.*, 2021; Schramm *et al.*, 2021). Quindi nei soggetti con fragilità lo sviluppo dell’immunità protettiva può essere talvolta assente o in alcuni casi ritardato (Heeger, Larsen and Segev, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Il decadimento dei livelli anticorpali è ormai ampiamente riportato in letteratura (Anand *et al.*, 2020; Brisotto *et al.*, 2021; Israel *et al.*, 2021; Brumme *et al.*, 2022), così come sono state osservate variazioni significative della risposta cellulo-mediata sia in pazienti con deficit del sistema immunitario come anche in individui senza condizioni mediche (Bergman *et al.*, 2021; Heeger, Larsen and Segev, 2021).

Rispetto all'immunità umorale, l'entità dell'immunità cellulo-mediata è più complessa da quantificare, quindi allo scopo di monitorare l'andamento della risposta immunitaria dopo la vaccinazione, il dosaggio degli anticorpi rappresenta un approccio più pratico, sebbene ad oggi non sia stato ancora determinato un cut-off associato alla protezione contro l'infezione da SARS-CoV-2.

Il decadimento dei livelli anticorpali e la debole risposta dei linfociti T che abbiamo osservato supportano la necessità di dosi di richiamo sia per i pazienti che per i donatori sani. L'effetto benefico di dosi aggiuntive di vaccino è stato dimostrato da lavori che hanno esaminato la risposta immunitaria dopo la vaccinazione contro diversi agenti patogeni (Parrino *et al.*, 2017; Mullane *et al.*, 2019; Shroff *et al.*, 2021). Le evidenze esistenti indicano una maggiore risposta umorale e cellulare dopo la seconda dose (Bordry *et al.*, 2022) e una maggiore risposta umorale dopo un'ulteriore dose di richiamo (Zeng *et al.*, 2022), anche se quest'ultima sembra di intensità inferiore rispetto a quella osservata in soggetti sani (Luxenburger and Thimme, 2021).

Infine, la risposta cellulare più forte osservata nei pazienti oncologici sottoposti a immunoterapia evidenzia l'importanza di continuare a studiare il possibile effetto delle terapie sull'immunogenicità dei vaccini. Ad esempio, il trattamento che prevede il blocco di PD-1/PD-L1, che inverte l'*exhaustion* dei linfociti T, potrebbe anche migliorare la risposta immunitaria dopo la vaccinazione contro le malattie infettive.

Le principali limitazioni di questo studio risiedono prima di tutto nella eterogeneità degli individui inclusi, sia per la diversità delle patologie che delle terapie. Inoltre, non è stato possibile studiare tutte le popolazioni agli stessi *time point*. Infine, per la maggior parte dei soggetti arruolati è stato possibile valutare soltanto la risposta umorale, che fornisce

un'informazione non completa sullo stato immunologico di questi pazienti dopo la vaccinazione.

La maggioranza dei risultati è tuttavia in accordo con quanto riportato in letteratura e supporta l'importanza della vaccinazione contro l'infezione da SARS-CoV-2 per le popolazioni fragili. I nostri risultati inoltre confermano la necessità di adeguare la strategia vaccinale, sia per quanto riguarda il numero di dosi che il *timing* della vaccinazione e di modulare il piano vaccinale tenendo conto anche dello stato immunitario e della terapia che questi pazienti ricevono.

Articoli scientifici pubblicati nel corso del progetto di tesi:

- Palaia I, Caruso G, Di Donato V, Vestri A, Napoli A, Perniola G, Casinelli M, Alunni Fegatelli D, **Campagna R**, Tomao F, D'Aniello D, Antonelli G, Muzii L. Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine in Gynecologic Oncology Patients: A Prospective Cohort Study. *Vaccines (Basel)*. 2021 Dec 23;10(1):12. doi: 10.3390/vaccines10010012. PMID: 35062673; PMCID: PMC8780883.
- Pellicano C, **Campagna R**, Oliva A, Leodori G, Miglionico M, Colalillo A, Mezzaroma I, Mastroianni CM, Turriziani O, Rosato E. Antibody response to BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA vaccine in adult patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2022 Sep;41(9):2755-2763. doi: 10.1007/s10067-022-06219-7. Epub 2022 May 26. PMID: 35614287; PMCID: PMC9132599.
- **Campagna R**, Mazzuti L, Guerrizio G, Nonne C, Migliara G, De Vito C, Mezzaroma I, Chiaretti S, Fimiani C, Pistolesi V, Morabito S, Turriziani O. Humoral and T-cell mediated response after administration of mRNA vaccine BNT162b2 in frail populations. *Vaccine X*. 2022 Dec;12:100246. doi: 10.1016/j.jvacx.2022.100246. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36506461; PMCID: PMC9721197.

BIBLIOGRAFIA

Abu-Rustum, N.R. *et al.* (2011) 'The Revised 2009 FIGO Staging System for Endometrial Cancer: Should the 1988 FIGO Stage IA and IB be Altered?', *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 21(3), p. 10.1097/IGC.0b013e31820cc305. Available at: <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31820cc305>.

Agarwal, A. *et al.* (2020) 'A living WHO guideline on drugs for covid-19', *BMJ (Clinical research ed.)*, 370, p. m3379. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.m3379>.

Agha, M.E. *et al.* (2021) 'Suboptimal Response to Coronavirus Disease 2019 Messenger RNA Vaccines in Patients With Hematologic Malignancies: A Need for Vigilance in the Postmasking Era', *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), p. ofab353. Available at: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab353>.

Alene, M. *et al.* (2021) 'Magnitude of asymptomatic COVID-19 cases throughout the course of infection: A systematic review and meta-analysis', *PloS One*, 16(3), p. e0249090. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249090>.

Alsaadi, E.A.J., Neuman, B.W. and Jones, I.M. (2020) 'Identification of a Membrane Binding Peptide in the Envelope Protein of MHV Coronavirus', *Viruses*, 12(9), p. 1054. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12091054>.

Althobaity, Y., Wu, J. and Tildesley, M.J. (2022) 'A comparative analysis of epidemiological characteristics of MERS-CoV and SARS-CoV-2 in Saudi Arabia', *Infectious Disease Modelling*, 7(3), pp. 473–485. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idm.2022.07.002>.

Amicone, M. *et al.* (2022) 'Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution', *Evolution, Medicine, and Public Health*, 10(1), pp. 142–155. Available at: <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>.

Anand, S. *et al.* (2020) 'Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in a large nationwide sample of patients on dialysis in the USA: a cross-sectional study', *Lancet (London, England)*, 396(10259), pp. 1335–1344. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32009-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32009-2).

Andersen, K.G. *et al.* (2020) 'The proximal origin of SARS-CoV-2', *Nature Medicine*, 26(4), pp. 450–452. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.

André, S. *et al.* (2022) 'T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease', *Cell Death and Differentiation*, 29(8), pp. 1486–1499. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00936-x>.

Antinori, A. *et al.* (2022) 'Humoral and cellular immune response elicited by mRNA vaccination against SARS-CoV-2 in people living with HIV (PLWH) receiving antiretroviral therapy (ART) according with current CD4 T-lymphocyte count', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, p. ciac238. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciac238>.

Azhar, E.I. *et al.* (2014) 'Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus', *The New England Journal of Medicine*, 370(26), pp. 2499–2505. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401505>.

Baden, L.R. *et al.* (2021) 'Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine', *The New England Journal of Medicine*, 384(5), pp. 403–416. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>.

Barnes, E. *et al.* (2023) 'SARS-CoV-2-specific immune responses and clinical outcomes after COVID-19 vaccination in patients with immune-suppressive disease', *Nature Medicine*, 29(7), pp. 1760–1774. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02414-4>.

Barton, M.I. *et al.* (2021) 'Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics', *eLife*, 10, p. e70658. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.70658>.

van Beek, A.A. *et al.* (2019) 'Metabolic Alterations in Aging Macrophages: Ingredients for Inflammaging?', *Trends in Immunology*, 40(2), pp. 113–127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.12.007>.

Bellesi, S. *et al.* (2020) 'Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients', *British Journal of Haematology*, 191(2), pp. 207–211. Available at: <https://doi.org/10.1111/bjh.17034>.

Bergman, P. *et al.* (2021) 'Safety and efficacy of the mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 in five groups of immunocompromised patients and healthy controls in a prospective open-label clinical trial', *EBioMedicine*, 74, p. 103705. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103705>.

Bessen, C. *et al.* (2022) 'Impact of SARS-CoV-2 vaccination on systemic immune responses in people living with HIV', *Frontiers in Immunology*, 13, p. 1049070. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1049070>.

Bittner, Z.A. *et al.* (2022) 'Pyroptosis and Its Role in SARS-CoV-2 Infection', *Cells*, 11(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11101717>.

Bloom, K., van den Berg, F. and Arbutnot, P. (2021) 'Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases', *Gene Therapy*, 28(3–4), pp. 117–129. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y>.

Bobrovitz, N. *et al.* (2023) 'Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression', *The Lancet. Infectious Diseases*, 23(5), pp. 556–567. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00801-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00801-5).

Boechat, J.L. *et al.* (2021) 'The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives', *Pulmonology*, 27(5), pp. 423–437. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008>.

Borcuk, A.C. and Yantiss, R.K. (2022) 'The pathogenesis of coronavirus-19 disease', *Journal of Biomedical Science*, 29(1), p. 87. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00872-5>.

Bordry, N. *et al.* (2022) 'Humoral and cellular immunogenicity two months after SARS-CoV-2 messenger RNA vaccines in patients with cancer', *iScience*, 25(1), p. 103699. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103699>.

Boson, B. *et al.* (2020) 'The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles', *The Journal of Biological Chemistry*, 296, p. 100111. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>.

Boyarsky, B.J. *et al.* (2021) 'Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients', *JAMA*, 325(21), pp. 2204–2206. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.7489>.

Brant, A.C. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication', *Cell & Bioscience*, 11(1), p. 136. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>.

Braun-Moscovici, Y. *et al.* (2021) 'Disease activity and humoral response in patients with inflammatory rheumatic diseases after two doses of the Pfizer mRNA vaccine against SARS-CoV-2', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 80(10), pp. 1317–1321. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-220503>.

Brisotto, G. *et al.* (2021) 'IgG antibodies against SARS-CoV-2 decay but persist 4 months after vaccination in a cohort of healthcare workers', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 523, pp. 476–482. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.10.035>.

Brumme, Z.L. *et al.* (2022) 'Humoral immune responses to COVID-19 vaccination in people living with HIV receiving suppressive antiretroviral therapy', *NPJ vaccines*, 7(1), p. 28. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00452-6>.

Bush, R.M. (2001) 'Predicting adaptive evolution', *Nature Reviews. Genetics*, 2(5), pp. 387–392. Available at: <https://doi.org/10.1038/35072023>.

Callaway, E. and Mallapaty, S. (2021) 'Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants', *Nature*, 590(7844), pp. 17–17. Available at: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00268-9>.

Cao, W. *et al.* (2021) 'Biomechanical characterization of SARS-CoV-2 spike RBD and human ACE2 protein-protein interaction', *Biophysical Journal*, 120(6), pp. 1011–1019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.007>.

Cao, Y. *et al.* (2021) 'Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors', *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 30(6), pp. 1114–1130. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.4075>.

Carosi, G. *et al.* (2021) 'La pandemia di COVID-19 in Italia'.

Cascella, M. *et al.* (2023) 'Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> (Accessed: 14 September 2023).

CDC (2020) *COVID-19 and Your Health*, Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> (Accessed: 16

September 2023).

Cele, S. *et al.* (2021) 'Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma', *Nature*, 593(7857), pp. 142–146. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03471-w>.

Chaguza, C. *et al.* (2023) 'Accelerated SARS-CoV-2 intrahost evolution leading to distinct genotypes during chronic infection', *Cell Reports Medicine*, 4(2), p. 100943. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100943>.

Chai, J. *et al.* (2021) 'Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1', *Nature Communications*, 12(1), p. 3433. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23533-x>.

Chan, J.F.-W. *et al.* (2020) 'A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. 514–523. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).

Chen, D. *et al.* (2021) 'ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress', *Developmental Cell*, 56(23), pp. 3250–3263.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.006>.

Chen, J. *et al.* (2020) 'COVID-19 infection: the China and Italy perspectives', *Cell Death & Disease*, 11(6), p. 438. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2603-0>.

Chen, K. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production', *Viruses*, 13(1), p. 47. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13010047>.

Chen, N. *et al.* (2020) 'Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. 507–513. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).

Chen, Y., Liu, Q. and Guo, D. (2020) 'Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis', *Journal of Medical Virology*, 92(4), pp. 418–423. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>.

Cheng, Y. *et al.* (2020) 'Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19', *Kidney International*, 97(5), pp. 829–838. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.03.005>.

Clinical evaluation of new vaccines - Scientific guideline | European Medicines Agency (no date). Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/clinical-evaluation-new-vaccines-scientific-guideline> (Accessed: 12 December 2023).

Cohen, J.R., Lin, L.D. and Machamer, C.E. (2011) 'Identification of a Golgi Complex-Targeting Signal in the Cytoplasmic Tail of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein ν ', *Journal of Virology*, 85(12), pp. 5794–5803. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00060-11>.

Coronavirus disease (COVID-19): Variants of SARS-CoV-2 (no date). Available at: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-variants-of-sars-cov-2](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-variants-of-sars-cov-2) (Accessed: 18 November 2023).

Couderc, A.-L. *et al.* (2022) 'Acceptance, efficacy, and safety of COVID-19 vaccination in older patients with cancer', *Journal of Geriatric Oncology*, 13(6), pp. 850–855. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2022.05.002>.

Creech, C.B., Walker, S.C. and Samuels, R.J. (2021) 'SARS-CoV-2 Vaccines', *JAMA*, 325(13), pp. 1318–1320. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3199>.

Cubuk, J. *et al.* (2021) 'The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA', *Nature Communications*, 12(1), p. 1936. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21953-3>.

Cui, J., Li, F. and Shi, Z.-L. (2019) 'Origin and evolution of pathogenic coronaviruses', *Nature Reviews. Microbiology*, 17(3), pp. 181–192. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

Curtis, J.R. *et al.* (2021) 'American College of Rheumatology Guidance for COVID-19 Vaccination in Patients With Rheumatic and Musculoskeletal Diseases: Version 1', *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.j.)*, 73(7), pp. 1093–1107. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.41734>.

Dai, L. and Gao, G.F. (2021) 'Viral targets for vaccines against COVID-19', *Nature Reviews. Immunology*, 21(2), pp. 73–82. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>.

De Placido, P. *et al.* (2022) 'Safety and immunogenicity of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with breast and gynecological cancer on active anticancer therapy: Results of a prospective observational study', *Frontiers in Oncology*, 12, p. 951026. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.951026>.

De Santis, R. *et al.* (2023) 'Durability of neutralizing antibodies against yellow fever virus after vaccination in healthy adults', *Vaccine*, 41(17), pp. 2761–2763. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.03.022>.

Deng, X. *et al.* (2021) 'Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant', *Cell*, 184(13), pp. 3426–3437.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.025>.

Denning, D.W., Kilcoyne, A. and Ucer, C. (2020) 'Non-infectious status indicated by detectable IgG antibody to SARS-CoV-2', *British Dental Journal*, 229(8), p. 521. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41415-020-2228-9>.

Dubey, A. *et al.* (2021) 'Emerging SARS-CoV-2 Variants: Genetic Variability and Clinical Implications', *Current Microbiology*, 79(1), p. 20. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02724-1>.

El Omari, K. *et al.* (2019) 'The structure of a prokaryotic viral envelope protein expands the landscape of membrane fusion proteins', *Nature Communications*, 10, p. 846. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08728-7>.

Fang, S. *et al.* (2020) 'GESS: a database of global evaluation of SARS-CoV-2/hCoV-19 sequences',

Nucleic Acids Research, 49(D1), pp. D706–D714. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa808>.

Faria, N.R. *et al.* (2021) 'Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil', *Science (New York, N.Y.)*, 372(6544), pp. 815–821. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>.

Farsalinos, K. *et al.* (2021) 'Improved strategies to counter the COVID-19 pandemic: Lockdowns vs. primary and community healthcare', *Toxicology Reports*, 8, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.12.001>.

Fehr, A.R. and Perlman, S. (2015) 'Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis', *Coronaviruses*, 1282, pp. 1–23. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

Fendler, A. *et al.* (2021) 'Adaptive immunity and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern following vaccination in patients with cancer: the CAPTURE study', *Nature Cancer*, 2(12), pp. 1305–1320. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00274-w>.

Fenioux, C. *et al.* (2022) 'SARS-CoV-2 Antibody Response to 2 or 3 Doses of the BNT162b2 Vaccine in Patients Treated With Anticancer Agents', *JAMA oncology*, 8(4), pp. 612–617. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.7777>.

Filho, F.F.D. *et al.* (2022) 'Clinical characteristics and outcomes of healthcare workers with COVID-19 pre- and postvaccination', *Journal of Medical Virology*, 94(11), pp. 5279–5283. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.27997>.

Finkel, Y. *et al.* (2021) 'The coding capacity of SARS-CoV-2', *Nature*, 589(7840), pp. 125–130. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2739-1>.

Flaherty, G.T. *et al.* (2020) 'COVID-19 in adult patients with pre-existing chronic cardiac, respiratory and metabolic disease: a critical literature review with clinical recommendations', *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 6, p. 16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40794-020-00118-y>.

Forster, M. *et al.* (2021) 'COVID-19 vaccination in patients with breast cancer and gynecological malignancies: A German perspective', *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 60, pp. 214–222. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.10.012>.

Fu, Y.-Z. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response', *Cellular and Molecular Immunology*, 18(3), pp. 613–620. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00571-x>.

Gallaher, W.R. (2020) 'A palindromic RNA sequence as a common breakpoint contributor to copy-choice recombination in SARS-COV-2', *Archives of Virology*, 165(10), pp. 2341–2348. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04750-z>.

Galloway, S.E. *et al.* (2021) 'Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021', *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(3), pp. 95–99. Available at: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2>.

- Galmiche, S. *et al.* (2023) 'SARS-CoV-2 incubation period across variants of concern, individual factors, and circumstances of infection in France: a case series analysis from the ComCor study', *The Lancet. Microbe*, 4(6), pp. e409–e417. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00005-8).
- Gao, Y. *et al.* (2020) 'Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus', *Science (New York, N.Y.)*, 368(6492), pp. 779–782. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>.
- Gao, Y. -M. *et al.* (2020) 'Cytokine storm syndrome in coronavirus disease 2019: A narrative review', *Journal of Internal Medicine*, p. 10.1111/joim.13144. Available at: <https://doi.org/10.1111/joim.13144>.
- Garassino, M.C., Whisenant, Jennifer G, *et al.* (2020) 'COVID-19 in patients with thoracic malignancies (TERAVOLT): first results of an international, registry-based, cohort study', *The Lancet. Oncology*, 21(7), pp. 914–922. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30314-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30314-4).
- Garassino, M.C., Whisenant, Jennifer G., *et al.* (2020) 'COVID-19 in patients with thoracic malignancies (TERAVOLT): first results of an international, registry-based, cohort study', *The Lancet. Oncology*, 21(7), pp. 914–922. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30314-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30314-4).
- Gordon, D.E. *et al.* (2020) 'A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing', *Nature*, 583(7816), pp. 459–468. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.
- Goshen-Lago, T. *et al.* (2021) 'Serologic Status and Toxic Effects of the SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Treatment for Cancer', *JAMA oncology*, 7(10), pp. 1507–1513. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.2675>.
- Grant, R.A. *et al.* (2021) 'Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia', *Nature*, 590(7847), pp. 635–641. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03148-w>.
- Grasselli, G. *et al.* (2020) 'Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy', *JAMA*, 323(16), pp. 1574–1581. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.5394>.
- Greaney, A.J. *et al.* (2021) 'Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies', *Cell Host & Microbe*, 29(3), pp. 463-476.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.003>.
- Grupper, A. *et al.* (2021) 'Humoral Response to the Pfizer BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis', *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 16(7), pp. 1037–1042. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.03500321>.
- Guan, H. *et al.* (2020) 'Cryo-electron Microscopy Structure of the Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein Provides Insights into Evolution of Unique Coronavirus Spike Proteins', *Journal of Virology*, 94(22), pp. e01301-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01301-20>.

- Guardiani, M. *et al.* (2022) 'Evaluation of Immunogenicity to Three Doses of the SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA Vaccine in Lung Transplant Patients', *Vaccines*, 10(10), p. 1642. Available at: <https://doi.org/10.3390/vaccines10101642>.
- Guruprasad, L. (2021) 'Human coronavirus spike protein-host receptor recognition', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 161, pp. 39–53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.006>.
- Gusev, E. *et al.* (2022) 'SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), p. 1716. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>.
- de Haan, C.A. *et al.* (1998) 'Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein', *Journal of Virology*, 72(8), pp. 6838–6850. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6838-6850.1998>.
- de Haan, C.A.M. and Rottier, P.J.M. (2005) 'Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses', *Advances in Virus Research*, 64, pp. 165–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64006-7).
- Haberman, R.H. *et al.* (2021) 'Methotrexate hampers immunogenicity to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in immune-mediated inflammatory disease', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 80(10), pp. 1339–1344. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-220597>.
- Hamilton, S.E. *et al.* (2006) 'The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells', *Nature Immunology*, 7(5), pp. 475–481. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1326>.
- Harrison, A.G., Lin, T. and Wang, P. (2020) 'Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis', *Trends in Immunology*, 41(12), pp. 1100–1115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- Havlin, J. *et al.* (2021) 'Immunogenicity of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and SARS-CoV-2 infection in lung transplant recipients', *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 40(8), pp. 754–758. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.05.004>.
- He, X. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention', *MedComm*, 2(4), pp. 838–845. Available at: <https://doi.org/10.1002/mco2.110>.
- Heeger, P.S., Larsen, C.P. and Segev, D.L. (2021) 'Implications of defective immune responses in SARS-CoV-2 vaccinated organ transplant recipients', *Science Immunology*, 6(61), p. eabj6513. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj6513>.
- Hillen, H.S. *et al.* (2020) 'Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase', *Nature*, 584(7819), pp. 154–156. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>.
- Hoehl, S. *et al.* (2020) 'Evidence of SARS-CoV-2 Infection in Returning Travelers from Wuhan, China', *The New England Journal of Medicine*, 382(13), pp. 1278–1280. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001899>.

Hoffmann, C. *et al.* (2021) 'Immune deficiency is a risk factor for severe COVID-19 in people living with HIV', *HIV medicine*, 22(5), pp. 372–378. Available at: <https://doi.org/10.1111/hiv.13037>.

Hoffmann, M. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor', *Cell*, 181(2), pp. 271-280.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

Hoffmann, M. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies', *Cell*, 184(9), pp. 2384-2393.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.036>.

van den Hoogen, F. *et al.* (2013) '2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(11), pp. 1747–1755. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204424>.

Hu, B. *et al.* (2021a) 'Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19', *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), pp. 141–154. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

Hu, B. *et al.* (2021b) 'Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19', *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), pp. 141–154. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

Hu, B., Huang, S. and Yin, L. (2021) 'The cytokine storm and COVID-19', *Journal of Medical Virology*, 93(1), pp. 250–256. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>.

Huang, C. *et al.* (2020) 'Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. 497–506. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).

Huang, Y. *et al.* (2020) 'Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19', *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), pp. 1141–1149. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.

Hussain, S. *et al.* (2005) 'Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus', *Journal of Virology*, 79(9), pp. 5288–5295. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5288-5295.2005>.

Israel, A. *et al.* (2021) 'Large-Scale Study of Antibody Titer Decay following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection', *Vaccines*, 10(1), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.3390/vaccines10010064>.

Jackson, C.B. *et al.* (2022) 'Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23(1), pp. 3–20. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.

Jager, K.J. *et al.* (2020) 'Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe', *Kidney International*, 98(6), pp. 1540–1548. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.006>.

Jamison, D.A. *et al.* (2022) 'A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection', *European Journal of Human Genetics*, 30(8), pp. 889–898. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>.

- Janssen, C. *et al.* (2022) 'Coadministration of seasonal influenza and COVID-19 vaccines: A systematic review of clinical studies', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(6), p. 2131166. Available at: <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2131166>.
- Jeyanathan, M. *et al.* (2020) 'Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies', *Nature Reviews Immunology*, 20(10), pp. 615–632. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00434-6>.
- Ji, W. *et al.* (2020) 'Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV', *Journal of Medical Virology*, 92(4), pp. 433–440. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>.
- Justo Arevalo, S. *et al.* (2023) 'What do we know about the function of SARS-CoV-2 proteins?', *Frontiers in Immunology*, 14, p. 1249607. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1249607>.
- Kadam, S.B. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights', *Journal of Basic Microbiology*, 61(3), pp. 180–202. Available at: <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>.
- Kalra, R.S. and Kandimalla, R. (2021) 'Engaging the spikes: heparan sulfate facilitates SARS-CoV-2 spike protein binding to ACE2 and potentiates viral infection', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, p. 39. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00470-1>.
- Kan, B. *et al.* (2005) 'Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms', *Journal of Virology*, 79(18), pp. 11892–11900. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005>.
- Kang, C.K. *et al.* (2020) 'Cell-Mediated Immunogenicity of Influenza Vaccination in Patients With Cancer Receiving Immune Checkpoint Inhibitors', *The Journal of Infectious Diseases*, 222(11), pp. 1902–1909. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa291>.
- Kang, S. *et al.* (2020) 'Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites', *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(7), pp. 1228–1238. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.009>.
- Keam, B. *et al.* (2020) 'Immunogenicity of Influenza Vaccination in Patients with Cancer Receiving Immune Checkpoint Inhibitors', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(2), pp. 422–425. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1092>.
- Kemp, S.A. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection', *Nature*, 592(7853), pp. 277–282. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03291-y>.
- Kesheh, M.M. *et al.* (2022) 'An overview on the seven pathogenic human coronaviruses', *Reviews in Medical Virology*, 32(2), p. e2282. Available at: <https://doi.org/10.1002/rmv.2282>.
- Kim, D. *et al.* (2020) 'The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome', *Cell*, 181(4), pp. 914–921.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.
- King, A.M.Q. *et al.* (eds) (2012) 'Order - Nidovirales', in *Virus Taxonomy*. San Diego: Elsevier, pp.

784–794. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00066-5>.

Klein, S. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography', *Nature Communications*, 11(1), p. 5885. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19619-7>.

Knoops, K. *et al.* (2008) 'SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum', *PLoS biology*, 6(9), p. e226. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>.

Knopf, J. *et al.* (2019) 'Aggregated NETs Sequester and Detoxify Extracellular Histones', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 2176. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02176>.

Korber, B. *et al.* (2020) 'Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus', *Cell*, 182(4), pp. 812-827.e19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>.

Krämer, B. *et al.* (2021) 'Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19', *Immunity*, 54(11), pp. 2650-2669.e14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.002>.

Kudlay, D. and Svistunov, A. (2022) 'COVID-19 Vaccines: An Overview of Different Platforms', *Bioengineering*, 9(2), p. 72. Available at: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020072>.

Kutti-Sridharan, G. *et al.* (2020) 'SARS-CoV2 in Different Body Fluids, Risks of Transmission, and Preventing COVID-19: A Comprehensive Evidence-Based Review', *International Journal of Preventive Medicine*, 11, p. 97. Available at: https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_255_20.

Lamb, Y.N. (2021) 'BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval', *Drugs*, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01480-7>.

Lamers, M.M. and Haagmans, B.L. (2022) 'SARS-CoV-2 pathogenesis', *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), pp. 270–284. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.

Lee, A.R.Y.B. *et al.* (2022) 'Efficacy of covid-19 vaccines in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis', *BMJ (Clinical research ed.)*, 376, p. e068632. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068632>.

Lee, L.Y.Y., Izzard, L. and Hurt, A.C. (2018) 'A Review of DNA Vaccines Against Influenza', *Frontiers in Immunology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01568> (Accessed: 13 December 2023).

Lei, X. *et al.* (2020) 'Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2', *Nature Communications*, 11(1), p. 3810. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>.

Lesny, P. *et al.* (2021) 'Immunogenicity of a first dose of mRNA- or vector-based SARS-CoV-2 vaccination in dialysis patients: a multicenter prospective observational pilot study', *Journal of Nephrology*, 34(4), pp. 975–983. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40620-021-01076-0>.

Leung, K. *et al.* (2021) 'Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-

CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020', *Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 26(1), p. 2002106. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106>.

Levy, I. *et al.* (2021) 'Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in people living with HIV-1', *Clinical Microbiology and Infection*, 27(12), pp. 1851–1855. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.031>.

Li, J.-Y. *et al.* (2020) 'The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway', *Virus Research*, 286, p. 198074. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>.

Li, W. *et al.* (2005) 'Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses', *Science (New York, N.Y.)*, 310(5748), pp. 676–679. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1118391>.

Liatsou, E. *et al.* (2023) 'Adult Patients with Cancer Have Impaired Humoral Responses to Complete and Booster COVID-19 Vaccination, Especially Those with Hematologic Cancer on Active Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Cancers*, 15(8), p. 2266. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15082266>.

Ligumsky, H. *et al.* (2022) 'Immunogenicity and Safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine Among Actively Treated Cancer Patients', *Journal of the National Cancer Institute*, 114(2), pp. 203–209. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djab174>.

Lin, T.-Y. and Hung, S.-C. (2023) 'Frailty and Humoral Immune Responses Following COVID-19 Vaccination among Patients Undergoing Hemodialysis', *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 27(11), pp. 980–986. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12603-023-1994-x>.

Lippi, G. *et al.* (2020) 'Clinical and demographic characteristics of patients dying from COVID-19 in Italy vs China', *Journal of Medical Virology*, 92(10), pp. 1759–1760. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.25860>.

Liu, P., Chen, W. and Chen, J.-P. (2019) 'Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*)', *Viruses*, 11(11), p. 979. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11110979>.

Loewe, L. and Hill, W.G. (2010) 'The population genetics of mutations: good, bad and indifferent', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1544), pp. 1153–1167. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0317>.

Long, B. *et al.* (2022) 'Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation', *The American Journal of Emergency Medicine*, 54, pp. 46–57. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2022.01.028>.

Long, Q.-X. *et al.* (2020) 'Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19', *Nature Medicine*, 26(6), pp. 845–848. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>.

Lu, R. *et al.* (2020) 'Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding', *Lancet (London, England)*, 395(10224), pp. 565–574. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).

- Lu, X. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Infection in Children', *The New England Journal of Medicine*, p. NEJMc2005073. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2005073>.
- Luna-Muschi, A. *et al.* (2022) 'Clinical features of COVID-19 by SARS-CoV-2 Gamma variant: A prospective cohort study of vaccinated and unvaccinated healthcare workers', *The Journal of Infection*, 84(2), pp. 248–288. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.09.005>.
- Lundstrom, K. (2020) 'The Current Status of COVID-19 Vaccines', *Frontiers in Genome Editing*, 2, p. 579297. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.579297>.
- Luxenburger, H. and Thimme, R. (2021) 'Capturing adaptive immunity against SARS-CoV-2 in patients with cancer', *Nature Cancer*, 2(12), pp. 1298–1300. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00298-2>.
- Mahdy, M.A.A., Younis, W. and Ewaida, Z. (2020) 'An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection', *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 596391. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.596391>.
- Maison, D.P., Deng, Y. and Gerschenson, M. (2023) 'SARS-CoV-2 and the host-immune response', *Frontiers in Immunology*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1195871> (Accessed: 13 December 2023).
- Malonis, R.J., Lai, J.R. and Vergnolle, O. (2020) 'Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges', *Chemical Reviews*, 120(6), pp. 3210–3229. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472>.
- Mandala, V.S. *et al.* (2020) 'Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers', *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), pp. 1202–1208. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8>.
- Martin, S. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 integral membrane proteins shape the serological responses of patients with COVID-19', *iScience*, 24(10), p. 103185. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103185>.
- Martora, F. *et al.* (2023) 'COVID-19 and cutaneous manifestations: A review of the published literature', *Journal of Cosmetic Dermatology*, 22(1), pp. 4–10. Available at: <https://doi.org/10.1111/jocd.15477>.
- Massarweh, A. *et al.* (2021) 'Evaluation of Seropositivity Following BNT162b2 Messenger RNA Vaccination for SARS-CoV-2 in Patients Undergoing Treatment for Cancer', *JAMA oncology*, 7(8), pp. 1133–1140. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.2155>.
- Matucci-Cerinic, M. *et al.* (2020) 'Systemic sclerosis and the COVID-19 pandemic: World Scleroderma Foundation preliminary advice for patient management', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(6), pp. 724–726. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217407>.
- Mazzitelli, M. *et al.* (2022) 'Factors Associated with Severe COVID-19 and Post-Acute COVID-19 Syndrome in a Cohort of People Living with HIV on Antiretroviral Treatment and with Undetectable HIV RNA', *Viruses*, 14(3), p. 493. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14030493>.

- McCallum, M. *et al.* (2021) 'N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2', *Cell*, 184(9), pp. 2332-2347.e16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.028>.
- Miao, Z. *et al.* (2021) 'Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR', *RNA biology*, 18(4), pp. 447-456. Available at: <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1814556>.
- Miorin, L. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(45), pp. 28344-28354. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2016650117>.
- Montejano-Hervás, P. *et al.* (2022) 'Safety, Effectiveness, and Immunogenicity 6 Months After BNT162B2 mRNA Vaccine in Frail Nursing Home Residents', *Drugs & Aging*, 39(7), pp. 587-595. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40266-022-00959-6>.
- Moreno, N.F. *et al.* (2022) 'COVID-19 Vaccine Efficacy and Immunogenicity in End-Stage Renal Disease Patients and Kidney Transplant Recipients', *Current Transplantation Reports*, pp. 1-11. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40472-022-00366-1>.
- Muecksch, F. *et al.* (2021) 'Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations', *Immunity*, 54(8), pp. 1853-1868.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.008>.
- Mullane, K.M. *et al.* (2019) 'Safety and efficacy of inactivated varicella zoster virus vaccine in immunocompromised patients with malignancies: a two-arm, randomised, double-blind, phase 3 trial', *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(9), pp. 1001-1012. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30310-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30310-X).
- Muus, C. *et al.* (2021) 'Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics', *Nature Medicine*, 27(3), pp. 546-559. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01227-z>.
- Nakano, Y. *et al.* (2021) 'Time course of the sensitivity and specificity of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies for symptomatic COVID-19 in Japan', *Scientific Reports*, 11(1), p. 2776. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82428-5>.
- Narayanan, S.A. *et al.* (2023) 'A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 2: host extracellular to systemic effects of SARS-CoV-2 infection', *European Journal of Human Genetics*, pp. 1-11. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01462-1>.
- Nextstrain* (no date). Available at: <https://nextstrain.org/> (Accessed: 12 December 2023).
- Ng, J.H. *et al.* (2020) 'Outcomes of patients with end-stage kidney disease hospitalized with COVID-19', *Kidney International*, 98(6), pp. 1530-1539. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.07.030>.
- Niu, X. *et al.* (2022) 'Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in the tumor microenvironment: Perspectives for immunotherapy of SCLC', *Seminars in Cancer Biology*, 86(Pt 3), pp. 273-285. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.009>.

- Oyaert, M. *et al.* (2022) 'Evaluation of Humoral and Cellular Responses in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Immunocompromised Patients', *Frontiers in Immunology*, 13, p. 858399. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858399>.
- Palich, R. *et al.* (2021) 'Weak immunogenicity after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine in treated cancer patients', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(8), pp. 1051–1053. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.04.020>.
- Pandey, K.R. *et al.* (2021) 'COVID-19 control strategies and intervention effects in resource limited settings: A modeling study', *PLoS ONE*, 16(6), p. e0252570. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252570>.
- Parasher, A. (2021) 'COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment', *Postgraduate Medical Journal*, 97(1147), pp. 312–320. Available at: <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>.
- Parohan, M. *et al.* (2020) 'Risk factors for mortality in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies', *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, 23(5), pp. 1416–1424. Available at: <https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1774748>.
- Parrino, J. *et al.* (2017) 'Safety and immunogenicity of inactivated varicella-zoster virus vaccine in adults with hematologic malignancies receiving treatment with anti-CD20 monoclonal antibodies', *Vaccine*, 35(14), pp. 1764–1769. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.055>.
- Peck, K.M. *et al.* (2015) 'Coronavirus Host Range Expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence: Biochemical Mechanisms and Evolutionary Perspectives', *Annual Review of Virology*, 2(1), pp. 95–117. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055029>.
- Peiris, J. *et al.* (2003) 'Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome', *Lancet (London, England)*, 361(9366), pp. 1319–1325. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13077-2).
- Peng, Q. *et al.* (2020) 'Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2', *Cell Reports*, 31(11), p. 107774. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107774>.
- Petersen, E. *et al.* (2020) 'Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics', *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(9), pp. e238–e244. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9).
- Pizzato, M. *et al.* (2022) 'SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions', *Frontiers in Virology*, 1. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2021.815388> (Accessed: 13 December 2023).
- Planas, D. *et al.* (2021) 'Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization', *Nature*, 596(7871), pp. 276–280. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>.

- Polack, F.P. *et al.* (2020) 'Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine', *The New England Journal of Medicine*, 383(27), pp. 2603–2615. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
- Raj, V.S. *et al.* (2014) 'MERS: emergence of a novel human coronavirus', *Current Opinion in Virology*, 5, pp. 58–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.010>.
- Rauch, S. *et al.* (2018) 'New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1963. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01963>.
- Retnakumar, S.V., Chauvin, C. and Bayry, J. (2023) 'The implication of anti-PD-1 therapy in cancer patients for the vaccination against viral and other infectious diseases', *Pharmacology & Therapeutics*, 245, p. 108399. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108399>.
- Reusken, C.B.E.M. *et al.* (2013) 'Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study', *The Lancet. Infectious Diseases*, 13(10), pp. 859–866. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70164-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70164-6).
- Saberian, M. *et al.* (2022) 'SARS-CoV-2: phenotype, genotype, and characterization of different variants', *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27, p. 50. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00352-6>.
- Sabetta, E. *et al.* (2023) 'A longitudinal analysis of humoral, T cellular response and influencing factors in a cohort of healthcare workers: Implications for personalized SARS-CoV-2 vaccination strategies', *Frontiers in Immunology*, 14, p. 1130802. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1130802>.
- Safiabadi Tali, S.H. *et al.* (2021) 'Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection', *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), pp. e00228-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>.
- Saito, A. *et al.* (2022) 'Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation', *Nature*, 602(7896), pp. 300–306. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>.
- Salute, M. della (no date) *Campagna di vaccinazione anti Covid-19 2023/2024*. Available at: <https://www.salute.gov.it/portale/nuovocoronavirus/dettaglioContenutiNuovoCoronavirus.jsp?lingua=italiano&id=61110&area=nuovoCoronavirus&menu=vuoto> (Accessed: 12 December 2023).
- Salvi, V. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2-associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8', *JCI insight*, 6(18), p. e150542. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150542>.
- Sampaio-Barros, P.D. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 vaccine in patients with systemic sclerosis: impact of disease subtype and therapy', *Rheumatology (Oxford, England)*, p. keab886. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab886>.
- Sanjuán, R. *et al.* (2010) 'Viral mutation rates', *Journal of Virology*, 84(19), pp. 9733–9748. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>.

- Sanjuán, R. and Domingo-Calap, P. (2016) 'Mechanisms of viral mutation', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(23), pp. 4433–4448. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L. and Siddell, S.G. (2007) 'A contemporary view of coronavirus transcription', *Journal of Virology*, 81(1), pp. 20–29. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01358-06>.
- Schauer, C. *et al.* (2014) 'Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines', *Nature Medicine*, 20(5), pp. 511–517. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3547>.
- Schramm, R. *et al.* (2021) 'Poor humoral and T-cell response to two-dose SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine BNT162b2 in cardiothoracic transplant recipients', *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society*, 110(8), pp. 1142–1149. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00392-021-01880-5>.
- Schubert, K. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(10), pp. 959–966. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>.
- Schulte-Schrepping, J. *et al.* (2020) 'Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment', *Cell*, 182(6), pp. 1419–1440.e23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.001>.
- Schultze, J.L. and Aschenbrenner, A.C. (2021) 'COVID-19 and the human innate immune system', *Cell*, 184(7), pp. 1671–1692. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>.
- Schwartz, L.H. *et al.* (2016) 'RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 62, pp. 132–137. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.081>.
- Seder, R.A., Darrah, P.A. and Roederer, M. (2008) 'T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design', *Nature Reviews. Immunology*, 8(4), pp. 247–258. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2274>.
- Shang, W. *et al.* (2020) 'The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines', *npj Vaccines*, 5(1), pp. 1–3. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0170-0>.
- Sherif, Z.A. *et al.* (2023) 'Pathogenic mechanisms of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC)', *eLife*. Edited by C.J. Rosen and M. Zaidi, 12, p. e86002. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.86002>.
- Shi, Y. *et al.* (2020) 'COVID-19 infection: the perspectives on immune responses', *Cell Death and Differentiation*, 27(5), pp. 1451–1454. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>.
- Shimizu, T., Nakamura, H. and Kawakami, A. (2021) 'Role of the Innate Immunity Signaling Pathway in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 3090. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22063090>.

- Shroff, R.T. *et al.* (2021) 'Immune responses to two and three doses of the BNT162b2 mRNA vaccine in adults with solid tumors', *Nature Medicine*, 27(11), pp. 2002–2011. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01542-z>.
- Silveira, M.M., Moreira, G.M.S.G. and Mendonça, M. (2021) 'DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges', *Life Sciences*, 267, p. 118919. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118919>.
- Simmonds, P. (2020) 'Pervasive RNA Secondary Structure in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses', *mBio*, 11(6), pp. e01661-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01661-20>.
- Sindhuja, T., Kumari, R. and Kumar, A. (2022) 'Epidemiology, transmission and pathogenesis of SARS-CoV-2', *Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection*, pp. 23–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91172-6.00015-7>.
- Singh, J. *et al.* (2021) 'Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants', *Virology Journal*, 18(1), p. 166. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01633-w>.
- Smits, V.A.J. *et al.* (2021) 'The Nucleocapsid protein triggers the main humoral immune response in COVID-19 patients', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 543, pp. 45–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.073>.
- Soiza, R.L., Scicluna, C. and Thomson, E.C. (2021) 'Efficacy and safety of COVID-19 vaccines in older people', *Age and Ageing*, 50(2), pp. 279–283. Available at: <https://doi.org/10.1093/ageing/afaa274>.
- Stertz, S. *et al.* (2007) 'The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus', *Virology*, 361(2), pp. 304–315. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.027>.
- Su, S. *et al.* (2016) 'Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses', *Trends in Microbiology*, 24(6), pp. 490–502. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>.
- Sungnak, W. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes', *Nature Medicine*, 26(5), pp. 681–687. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>.
- Tahaghoghi-Hajghorbani, S. *et al.* (2020) 'The role of dysregulated immune responses in COVID-19 pathogenesis', *Virus Research*, 290, p. 198197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198197>.
- Tang, D., Comish, P. and Kang, R. (2020) 'The hallmarks of COVID-19 disease', *PLoS Pathogens*, 16(5), p. e1008536. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008536>.
- Tehrani, S. *et al.* (2021) 'Risk factors for death in adult COVID-19 patients: Frailty predicts fatal outcome in older patients', *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 102, pp. 415–421. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.071>.

- Tian, M. *et al.* (2021) 'HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), p. 308. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00726-w>.
- Tortorici, M.A. and Veesele, D. (2019) 'Structural insights into coronavirus entry', *Advances in Virus Research*, 105, pp. 93–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>.
- Tzou, P.L. *et al.* (2022) 'Coronavirus Resistance Database (CoV-RDB): SARS-CoV-2 susceptibility to monoclonal antibodies, convalescent plasma, and plasma from vaccinated persons', *PLOS ONE*, 17(3), p. e0261045. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261045>.
- Udomkarnjananun, S. *et al.* (2023) 'Cellular immune response of SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis', *Frontiers in Immunology*, 14, p. 1220148. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1220148>.
- Uwamino, Y. *et al.* (2022) 'Dynamics of antibody titers and cellular immunity among Japanese healthcare workers during the 6 months after receiving two doses of BNT162b2 mRNA vaccine', *Vaccine*, 40(32), pp. 4538–4543. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.016>.
- Venkatesulu, B.P. *et al.* (2021) 'A Systematic Review and Meta-Analysis of Cancer Patients Affected by a Novel Coronavirus', *JNCI Cancer Spectrum*, 5(2), p. pkaa102. Available at: <https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa102>.
- V'kovski, P. *et al.* (2021) 'Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2', *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), pp. 155–170. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- Walls, A.C. *et al.* (2020) 'Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein', *Cell*, 181(2), pp. 281-292.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Wang, D. *et al.* (2021) 'The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features', *Molecular Cell*, 81(10), pp. 2135-2147.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.036>.
- Wang, M. *et al.* (2022) 'Pyroptotic cell death in SARS-CoV-2 infection: revealing its roles during the immunopathogenesis of COVID-19', *International Journal of Biological Sciences*, 18(15), p. 5827. Available at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.77561>.
- Wang, N. *et al.* (2020) 'Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 298. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00298>.
- Wang, P. *et al.* (2021) 'Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7', *Nature*, 593(7857), pp. 130–135. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>.
- Wendisch, D. *et al.* (2021) 'SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis', *Cell*, 184(26), pp. 6243-6261.e27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.033>.
- Wevers, B.A. and van der Hoek, L. (2009) 'Recently discovered human coronaviruses', *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), pp. 715–724. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.07.007>.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (no date). Available at: <https://covid19.who.int> (Accessed: 9 December 2023).

Wiersinga, W.J. *et al.* (2020) 'Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review', *JAMA*, 324(8), pp. 782–793. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.

Williamson, E.J. *et al.* (2020) 'Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY', *Nature*, 584(7821), pp. 430–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2521-4>.

de Wit, E. *et al.* (2016) 'SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses', *Nature Reviews. Microbiology*, 14(8), pp. 523–534. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

Wolff, D. *et al.* (2021) 'Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review', *Infection*, 49(1), pp. 15–28. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01509-1>.

Woo, P.C.Y. *et al.* (2023) 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023', *The Journal of General Virology*, 104(4). Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001843>.

World Health Organization (2021) *Clinical features and prognostic factors of COVID-19 in people living with HIV hospitalized with suspected or confirmed SARS-CoV-2 infection, 15 July 2021*. WHO/2019-nCoV/Clinical/HIV/2021.1. World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342697> (Accessed: 21 April 2022).

Wu, H.-Y. and Brian, D.A. (2010) 'Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), pp. 12257–12262. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000378107>.

Wu, Y. *et al.* (2022) 'Cell pyroptosis in health and inflammatory diseases', *Cell Death Discovery*, 8, p. 191. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00998-3>.

Xia, H. *et al.* (2020) 'Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2', *Cell Reports*, 33(1), p. 108234. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>.

Xiao, K. *et al.* (2020) 'Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins', *Nature*, 583(7815), pp. 286–289. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>.

Xiao, X. *et al.* (2021) 'Animal sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic', *Scientific Reports*, 11(1), p. 11898. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91470-2>.

Yang, Y. *et al.* (2021) 'Characterizing Transcriptional Regulatory Sequences in Coronaviruses and Their Role in Recombination', *Molecular Biology and Evolution*, 38(4), pp. 1241–1248. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa281>.

Yaykasli, K.O. *et al.* (2021) 'Neutrophil Extracellular Trap-Driven Occlusive Diseases', *Cells*, 10(9), p. 2208. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10092208>.

Zaki, A.M. *et al.* (2012) 'Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi

Arabia', *The New England Journal of Medicine*, 367(19), pp. 1814–1820. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>.

Zanza, C. *et al.* (2022) 'Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy', *Medicina*, 58(2), p. 144. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina58020144>.

Zasada, A.A. *et al.* (2023) 'COVID-19 Vaccines over Three Years after the Outbreak of the COVID-19 Epidemic', *Viruses*, 15(9), p. 1786. Available at: <https://doi.org/10.3390/v15091786>.

Zeng, C. *et al.* (2022) 'COVID-19 mRNA booster vaccines elicit strong protection against SARS-CoV-2 Omicron variant in patients with cancer', *Cancer Cell*, 40(2), pp. 117–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.014>.

Zeng, W. *et al.* (2020) 'Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(3), pp. 618–623. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.136>.

Zhang, C. *et al.* (2020) 'Protein structure and sequence re-analysis of 2019-nCoV genome refutes snakes as its intermediate host or the unique similarity between its spike protein insertions and HIV-1', *Journal of proteome research*, 19(4), pp. 1351–1360. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00129>.

Zhang, L. *et al.* (2020) 'Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China', *Annals of Oncology*, 31(7), pp. 894–901. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.296>.

Zhang, N. *et al.* (2015) 'Receptor-binding domain-based subunit vaccines against MERS-CoV', *Virus Research*, 202, pp. 151–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.013>.

Zhang, R. *et al.* (2022) 'Assessment of humoral and cellular immune responses to SARS CoV-2 vaccination (BNT162b2) in immunocompromised renal allograft recipients', *Transplant Infectious Disease*, 24(2), p. e13813. Available at: <https://doi.org/10.1111/tid.13813>.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(23), p. e2024202118. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2024202118>.

Zhao, X. *et al.* (2020) '2020 update on human coronaviruses: One health, one world', *Medicine in Novel Technology and Devices*, 8, p. 100043. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2020.100043>.

Zheng, M. *et al.* (2021) 'TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines', *Nature immunology*, 22(7), pp. 829–838. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>.

Zheng, Y. *et al.* (2020) 'Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, p. 299. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00438-7>.

Zhong, N. *et al.* (2003) 'Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003', *Lancet (London, England)*, 362(9393), pp. 1353–1358. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14630-2).

Zhou, F. *et al.* (2020) 'Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study', *Lancet (London, England)*, 395(10229), pp. 1054–1062. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).

Zhou, P. *et al.* (2020) 'A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin', *Nature*, 579(7798), pp. 270–273. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

Zhou, Ziliang *et al.* (2021) 'Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14+ monocytes', *iScience*, 24(3), p. 102187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102187>.

Zhu, N. *et al.* (2020) 'A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019', *The New England Journal of Medicine*, 382(8), pp. 727–733. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

Ziebuhr, J. (2004) 'Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus', *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), pp. 412–419. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.007>.

Ziv, O. *et al.* (2020) 'The Short- and Long-Range RNA-RNA Interactome of SARS-CoV-2', *Molecular Cell*, 80(6), pp. 1067-1077.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.004>.