

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini

Parte II: I vaccini oggi in uso per contrastare la pandemia da COVID-19 e il ruolo del laboratorio nella campagna vaccinale

Chiara Puricelli^{1,2}, Benedetta Carnaghi², Umberto Dianzani^{1,2}, Roberta Rolla^{1,2}

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

²Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

ABSTRACT

SARS-CoV-2 and the new era of vaccines – Part II

Currently available vaccines to fight the COVID-19 pandemic and the laboratory role in the vaccination campaign.

The COVID-19 pandemic has prompted an unprecedented race to find the means to contrast the SARS-CoV-2 infection, resulting in a huge common effort to develop an efficacious vaccine as soon as possible and an exceptional acceleration of the review process to ensure its safety and efficacy. Many technological platforms are currently under investigation or have already been approved, including those based on the inactivated virus, mRNA- or DNA-based vaccines expressing viral antigens, recombinant SARS-CoV-2 proteins and vector-based vaccines exploiting chimeric adenoviruses. The emergence of new viral variants has represented an additional challenge and has induced the entire scientific community to potentiate the monitoring process of the ongoing vaccination campaigns. In this scenario, laboratory medicine certainly plays a pivotal role not only in the diagnosis of the infection but also in monitoring the immune response to vaccines and in the detection and prevention of clinically significant adverse events, ultimately contributing to the determination of the biological and clinical efficacy of the available vaccines. This review offers an overview of the most recent and updated data on anti-SARS-CoV-2 vaccines and the technological principles behind them as well as on the resources that laboratory medicine can offer to support the vaccination campaigns. All these aspects represent a rapid step forward in the clinical field which transcends the COVID-19 outbreak and that will certainly pave the way for the future scientific research.

Parole chiave: SARS-CoV-2, vaccini a DNA, vaccini a mRNA

I PROGRESSI E LE INSIDIE NELLA RICERCA DI VACCINI EFFICACI PER SARS-CoV-2

I primi casi di COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), la malattia infettiva causata dal SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), sono stati riscontrati nel novembre del 2019 a Wuhan, in Cina. Il virus si è diffuso rapidamente in tutto il mondo e l'11 marzo 2020 l'OMS ha dichiarato formalmente la pandemia globale. Il 10 gennaio 2020, 54 giorni dopo il primo caso dichiarato, è stata pubblicata l'intera sequenza del genoma del virus SARS-CoV-2 (1). Da quel momento, scienziati e organizzazioni di tutto il mondo hanno collaborato per contrastare la diffusione del contagio e sviluppare il prima possibile dei vaccini

efficaci e sicuri contro il virus. Attualmente, sono più di 200 i vaccini in corso di sviluppo; sono stati preparati seguendo diverse strategie tecnologiche, una diversificazione necessaria di fronte a una nuova malattia come COVID-19, in quanto, sulla base delle conoscenze attuali, è ancora difficile prevedere quale vaccino risulterà il più efficace. Ad oggi (agosto 2021) sono stati autorizzati dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), in Europa, quattro vaccini: due vaccini a mRNA, Pfizer mRNA BNT162b2 (Comirnaty) e COVID-19 Vaccine Moderna mRNA-1273 (Spikevax), e due vaccini che utilizzano adenovirus ricombinanti come vettore di antigeni di SARS-CoV2, Vaxzevria (COVID-19 Vaccine AstraZeneca) e COVID-19 Vaccine Janssen Ad26.COV2-S (2, 3) (Tabella 1).

Corrispondenza a: Chiara Puricelli, Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara; Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara, E-mail chiarap92@alice.it

Ricevuto: 26.07.2021

Revisionato: 10.09.2021

Accettato: 17.09.2021

Pubblicato on-line: 07.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.065

Tabella 1
Caratteristiche dei vaccini anti SARS-CoV-2 approvati in almeno un Paese del mondo (dati aggiornati ad agosto 2021)

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % ^b (95% IC)	Costo
Vaccini a mRNA								
Comirnaty; Pfizer mRNA BNT-162b2; Tozinameran (4,5)	Pfizer; Biontech; Fosun Pharma	Multi-nazionale	Nanoparticella lipidica contenente mRNA modificato a livello dei nucleosidi e codificante la proteina Spike intera con due mutazioni puntiformi che la stabilizzano in conformazione di pre-fusione	Spike	2 dosi IM da 0,3 mL (30 µg) a distanza di 3 settimane	Da -90 °C a -60 °C: 6 mesi Da -25 °C a -15 °C: 2 settimane 2-8 °C: 30 giorni 8-30 °C: 4 ore 2-30 °C dopo diluizione: 6 ore	95,0 (90,0; 97,9) ^d	14,70-19,50 \$
Moderna COVID-19 Vaccine (mRNA-1273); Spikevax; TAK-919 (in Giappone) (4,6)	Moderna e U.S. National Institute of Health/ Takeda	Stati Uniti/ Giappone	Nanoparticella lipidica contenente mRNA codificante la proteina Spike intera modificata tramite 2 sostituzioni proliniche all'interno del dominio di ripetizione a sette peptidi (S-2P) per stabilizzarla in conformazione di pre-fusione	Spike	2 dosi IM da 0,5 mL (100 µg) a distanza di 28 giorni	Da -25 °C a -15 °C: 7 mesi 2-8 °C: 30 giorni 8-25 °C: 24 ore	94,1 (89,3, 96,8) ^e	25-37 \$
Vaccini a DNA								
ZyCoV-D (7-10)	Zydus Cadila Healthcare	India	Vettore plasmidico pVAX1 (da coltura di <i>Escherichia coli</i> DH5-alpha) contenente DNA codificante Spike e un peptide di segnale IgE	Spike	3 dosi intradermiche da 0,2 mL (2 mg) a distanza di 28 giorni con dispositivo needle-free PharmaJet®	2-8 °C ma stabile a temperatura ambiente (25 °C) fino a 3 mesi	66,6 (Dati non sottoposti a peer-review)	Non noto
Vaccini a vettore virale								
Sputnik V; Gam-Covid-Vac (4, 53)	Gamaleya Research Institute; Acellena Contract Drug Research and Development	Russia	Due vettori adenovirali umani ricombinanti (rAd26 per la prima dose e rAd5 per la seconda dose) codificanti Spike	Spike	2 dosi IM (ciascuna contenente 1011 particelle virali) a distanza di 3 settimane ^e	20 °C In corso di sviluppo una formulazione conservabile a 2-8 °C	91,1 (83,8-95,1) ^d	<10 \$
Vaxzevria; COVID-19 Vaccine AstraZeneca; ChAdOx1 n-CoV-19; AZD1222; Covishield (in India) (4, 11)	AstraZeneca/Università di Oxford/ Biomedical Advanced Research and Development Authority (BARDA); Operation Warp Speed (OWS)	Regno Unito	Adenovirus di scimpanzé ChAdOx1-S codificante Spike prodotto in cellule renali embrionali umane geneticamente modificate (HEK) 293 mediante tecnologia del DNA ricombinante	Spike	2 iniezioni IM da 0,5 mL (2,5 x 108 unità infettive) a distanza di 4-12 settimane In fase di studio una formulazione inalabile	2-8 °C: 6 mesi 8-30 °C: 12 ore	59,5 (45,8, 69,7) ^e	2-10 \$

Tabella 1
Continua...

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % ^b (95% IC)	Costo
Convidecia; Ad5-nCoV (4, 12)	CanSino Biologics; Beijing Institute of Biotechnology	Cina	Vettore adenovirale umano tipo 5 Spike (Ad5) codificante la glicoproteina Spike intera	5 Spike	Singola dose IM da 0,5 mL (5X10 ¹⁰ particelle virali)	2-8 °C	65,37 ^b COVID-19 severa: 90,07 ^a	<4 \$
COVID-19 Vaccine Janssen Ad26.COV2.S (4, 13, 55)	Janssen/Johnson & Johnson	Stati Uniti	Adenovirus umano 26 codificante Spike intera e stabilizzata, prodotto nella linea cellulare PER.C6 TetR mediante tecnologia del DNA ricombinante	Spike	Singola dose IM da 0,5 mL (8,92 log ₁₀ unità infettive)	Da -25 °C a -15 °C: 2 anni 2-8 °C: 3 mesi	66,1 (55,01; 74,80) ^b COVID-19 severa: 85,4 (54, 15; 96,90) ^b	2,80-9 \$
Vaccini a subunità proteica								
EpiVacCorona (4, 13, 14)	Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology (BEKTOP, Vector)	Russia	Glicoproteina Spike sintetica, coniugata con proteina carrier e adsorbita su adiuvante (idrossido di alluminio)	Spike	2 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 21 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
ZF2001/RBD Dimer (4, 15)	Anhui Zhifei Longcom/ Accademia delle Scienze Cinese	Cina	Dimero di RBD (Receptor Binding Domain) di Spike prodotto con tecnologia a DNA ricombinante in cellule di ovaio di criceto cinese (Chinese Hamster Ovary cells) abbinato ad adiuvante (idrossido di alluminio)	RBD di Spike	3 dosi IM da 0,5 mL (25µg) a distanza di 30 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
Abdala (CIGB-66) (16)	Center for Genetic Engineering and Biotechnology	Cuba	Subunità proteica (Spike) ricombinante ottenuta da coltura di cellule di lievito con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	RBD di Spike	3 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 14 o 28 giorni	Dati non disponibili	92,28	Non noto
MVC-COV1901 (17)	Medigen Vaccine Biologics Corporation	Taiwan	Proteina Spike intera modificata tramite 2 sostituzioni prolinciche (S-2P) stabilizzata in conformazione pre-fusione con aggiunta di adiuvante (CpG e idrossido di alluminio)	Spike	2 dosi IM (15 µg) a distanza di 28 giorni	2-8 °C	99,8 (99,20; 99,97) ^b	Non noto
Vaccini a virus inattivato								
BBIBP-CorV (4, 18-22)	Beijing Institute of Biological Products; China National Pharmaceutical Group (Sinopharm)	Cina	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO e inattivato con β-propiolattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (4 µg) a distanza di 21-28 giorni	2-8 °C	78,1 (64,9, 86,3)	30-72,50 \$

Tabella 1
Continua...

Nomi (riferimenti bibliografici)	Produttori	Paese di origine	Contenuto	Target	Posologia	Stabilità ^a	Efficacia % (95% IC) ^b	Costo
Vaccini a virus inattivato								
CoronaVac; PicoVacc (4,13,23,24)	SinoVac Research and Development	Cina	SARS-CoV-2 inattivato con adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (3 µg) a distanza di 2-4 settimane	2-8 °C: almeno 6 mesi	50,38-91,25 (dati variabili sulla base di diversi studi epidemiologici)	≈ 30 \$
Inactivated SARS-CoV-2 vaccine (4,25,26)	SinoPharm/Wuhan Institute of Biological Products	Cina	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO inattivato con β-propionlattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (5 µg) a distanza di 21-28 giorni	2-8 °C	72,8 (58,1-82,4)	30-72,50 \$
Covaxin; BBV152 A, B, C (4,13,26,27)	Bharat Biotech/Indian Council of Medical Research/Indian National Institute of Virology	India	SARS-CoV-2 inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM a distanza di 4 settimane	Stabile a temperatura ambiente per una settimana	COVID-19 asintomatica: 63,6 (29,0-82,4) ^c COVID-19 sintomatica: 77,8 (65,2-86,4) ^c	2-3 \$
QazVac (4,28,29)	Kazakhstan Research Institute for Biological Safety Problems	Kazakistan	SARS-CoV-2 inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL a distanza di 21 giorni	2-8 °C	COVID-19 severa: 93,4 (57,1-99,8) ^c	Non noto
SARS-CoV-2 Vaccine; KCONVAC (4,30,31)	Shenzhen Kangtai Biological Products/Beijing Minhai Biotechnology	Cina	Virus inattivato	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (5 µg) a distanza di 28 giorni	Non nota	Dati non ancora disponibili	Non noto
COVID-19 Inactivated Vaccine (4,32)	Shifa Pharmmed	Iran	SARS-CoV-2 inattivato coltivato in cellule VERO	Virione SARS-CoV-2	2 dosi da 5 µg IM a distanza di 28 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto
KoviVac (4,33)	Chumakov Center (Russian Academy of Sciences) (Russia)	Russia	SARS-CoV-2 coltivato in cellule VERO e inattivato con β-propionlattone, con aggiunta di adiuvante (idrossido di alluminio)	Virione SARS-CoV-2	2 dosi IM da 0,5 mL (3 µg) a distanza di 14 giorni	2-8 °C	Dati non ancora disponibili	Non noto

^aLe indicazioni sulla stabilità si riferiscono al prodotto prima dell'apertura
^bL'efficacia si riferisce alla prevenzione dello sviluppo di malattia
^cFormulazione non pronta all'uso iniettabile dopo diluizione in soluzione salina allo 0,9%
^dEfficacia misurata a 7 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione
^eEfficacia misurata a 14 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione
^fE' stata approvata anche una formulazione a singola dose. Sputnik-Light
^gEfficacia misurata a 28 giorni dall'ultima dose in soggetti sieronegativi prima della vaccinazione IM, intramuscolo.

Il piano strategico di vaccinazione in Europa si è concentrato sulla riduzione dei casi gravi e dei decessi e sul mantenimento dei servizi essenziali più critici. I primi ad aver ricevuto il vaccino sono stati, pertanto, il personale sanitario, particolarmente a rischio in quanto maggiormente esposto, le persone anziane e i soggetti più fragili affetti da patologie croniche. Con l'aumentare della disponibilità dei vaccini, le strategie di vaccinazione e i loro obiettivi sono stati adeguati di conseguenza. Inoltre, trattandosi di un'emergenza sanitaria che interessa il mondo intero, la capacità di produzione del vaccino dovrebbe garantire un'equa distribuzione a livello globale. A tal proposito, alcune organizzazioni, come Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI), The Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) hanno istituito il COVID-19 Vaccines Global Access (COVAX), un meccanismo globale di condivisione del rischio per l'approvvigionamento in comune e la distribuzione equa di vaccini contro SARS-CoV-2 (34).

Virologia di SARS-CoV-2

I coronavirus (CoV) sono virus appartenenti alla famiglia dei *Coronaviridae* e possono causare malattie a diverso spettro sintomatico, che vanno dal comune raffreddore a sindromi respiratorie gravi come la Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) e la Middle East Respiratory Syndrome (MERS), registrate per la prima volta rispettivamente nel 2002 e nel 2012. SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2, responsabili rispettivamente di SARS, MERS e COVID-19, appartengono allo stesso genere, i *Betacoronavirus* (35).

COVID-19 è caratterizzata da tre principali stadi: asintomatico, sintomatico non grave e sintomatico con sindrome respiratoria acuta. In circa l'80% dei pazienti, SARS-CoV-2 causa sintomi simil-influenzali quali febbre, affaticamento, dolori muscolari, brividi, perdita di appetito, tosse persistente, anosmia e ageusia. Nei casi più gravi, la malattia è caratterizzata da collasso cardiocircolatorio, sindrome iperinfiammatoria associata ad una eccessiva produzione di citochine infiammatorie, tra cui IL-6, IL-1, IFN- γ e TNF- α , disturbi della coagulazione con microtrombosi polmonare e danno multi organo (36).

Il genoma dei coronavirus è costituito da un singolo filamento di RNA (ssRNA) a polarità positiva e di grande taglia (27-32 kb); non sono noti virus a RNA di taglia maggiore. I coronavirus hanno un diametro di 100-150 nm, sono pleiomorfi e rivestiti da un involucro lipidico, l'envelope. Il genoma di SARS-CoV-2 codifica per 11 ORF (open reading frames), molte delle quali hanno ancora funzioni sconosciute. ORF1a e ORF1b codificano per 16 proteine non strutturali ampiamente conservate nei coronavirus. Altri 4 geni codificano per le principali proteine strutturali: ORF4 codifica per la proteina dell'envelope (E), ORF5 per la proteina di membrana (M), ORF9 per la proteina del nucleocapside (N) e ORF2 per la glicoproteina di superficie Spike (S).

Gli altri geni codificano per proteine accessorie (Figura 1) (1,35).

Gli aggregati trimerici della proteina Spike, che sporgono dalla superficie del virione, hanno il ruolo essenziale di permettere l'aggancio, la fusione e l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule umane. La regione della proteina Spike che interagisce con il recettore sulla cellula ospite è chiamata Receptor Binding Domain (RBD) ed è localizzata a livello del dominio S1b. Nello specifico, il RBD lega l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2), un ectoenzima espresso sulla superficie di cellule dei polmoni, delle arterie, del cuore, dell'intestino, dei reni e del sistema nervoso (37,38). L'ACE2 è uno degli enzimi centrali nel sistema renina-angiotensina (RAS) che regola la pressione arteriosa, l'equilibrio idro-elettrolitico e le resistenze vascolari sistemiche e catalizza la conversione dell'angiotensina II ad angiotensina 1-7. L'infezione da SARS-CoV-2 riduce l'espressione dell'ACE2, con aumento di angiotensina II e ha importanti effetti pro-infiammatori, particolarmente a livello polmonare (Figura 2) (39,40). È stato osservato che SARS-CoV-2 ha un'affinità 10-20 volte maggiore per ACE2 rispetto a SARS-CoV-1 (41). Una volta avvenuto il legame, la proteina Spike viene scissa da proteinasi di superficie, quali la furina o TMPRSS2 (Transmembrane Serine Protease 2), che liberano così gli "artigli di fusione" della proteina, consentendo la fusione con la membrana della cellula ospite (Figura 1). L'RNA viene quindi rilasciato nel citoplasma, replicato per opera di una RNA polimerasi RNA-dipendente e tradotto per la formazione di nuove particelle virali. Per questo motivo la proteina Spike e i suoi frammenti rappresentano il determinante antigenico chiave per lo sviluppo dei vaccini anti-COVID-19 (1).

La risposta immunitaria al SARS-CoV-2

Sia l'immunità innata sia quella adattativa svolgono un ruolo fondamentale durante l'infezione da SARS-CoV-2. Il sistema immunitario innato è in grado di limitare l'aggressività del coronavirus, soprattutto a livello delle vie aeree superiori, dove il contagio avviene prevalentemente tramite inalazione di goccioline di saliva (droplets) emesse da un soggetto infetto. Un potenziale meccanismo con cui agisce la risposta immunitaria innata è rappresentato dalla produzione di interferoni di tipo I (INF-1), citochine che riducono la replicazione virale. A differenza di altri coronavirus, però, il SARS-CoV-2 non stimola il rilascio di grandi quantità di INF-1. Inoltre, le evidenze sul ruolo di queste citochine sono ancora scarse (42). Anche le immunoglobuline naturali, ovvero quelle presenti dalla nascita, potrebbero avere un ruolo protettivo. È interessante notare come le IgM naturali subiscano una drastica riduzione con il progredire dell'età, fenomeno che potrebbe spiegare perché la forma grave della malattia colpisce maggiormente la popolazione anziana.

Per quanto riguarda la risposta immunitaria adattativa, l'infezione con decorso lieve è associata ad

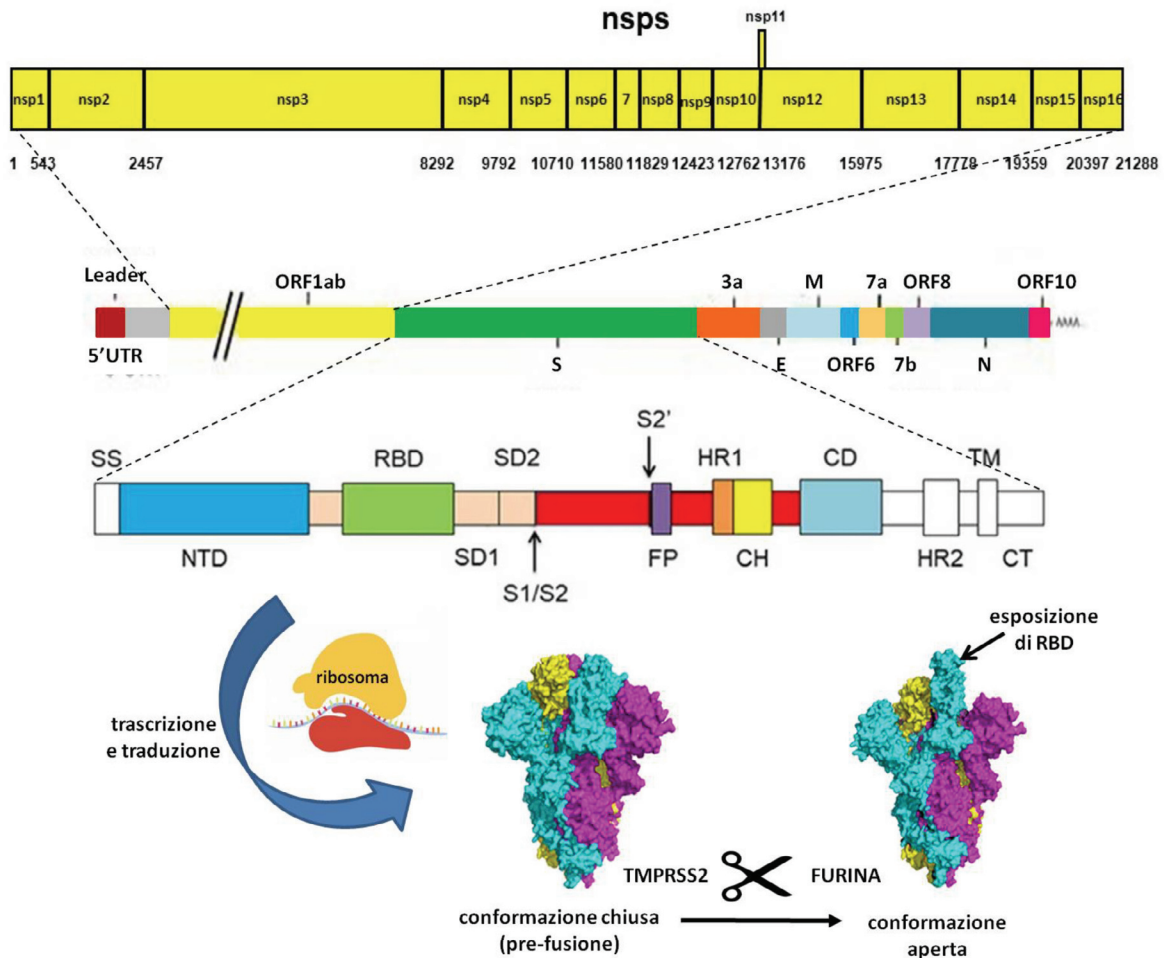


Figura 1

Rappresentazione grafica del genoma di SARS-CoV-2 e della proteina Spike.

Il genoma di SARS-CoV-2, a base di RNA a singolo filamento, è costituito da diversi segmenti, ognuno codificante specifiche proteine strutturali e non strutturali. Il principale ruolo antigenico è rivestito dalla glicoproteina di superficie Spike, il cui gene è rappresentato nella parte inferiore dell'immagine. La sua struttura trimerica può assumere due conformazioni principali, chiusa, o pre-fusione, e, dopo clivaggio per mezzo delle proteasi furina o TMPRSS2, aperta, con esposizione del RBD per l'ancoraggio ad ACE2.

CD, dominio di connessione; FP, peptide di fusione; HR, ripetitività di sette residui; ORF, sequenza di inizio lettura; nsps, proteine non strutturali; NTD, dominio N-terminale; RBD, dominio legante il recettore; S, subunità; SD, sottodominio; TM, regione transmembrana; TMPRSS2, serina proteasi 2 transmembrana; UTR, regione non tradotta.

un aumento di linfociti B, linfociti T helper follicolari e linfociti T CD8+ e CD4+ attivati. La risposta anticorpale primaria è marcata dalla comparsa di anticorpi IgM e si osserva entro la prima settimana dai primi sintomi. Segue la comparsa di anticorpi IgG e IgA. Gli anticorpi riconoscono principalmente epitopi della proteina S, N e M (43). Alcuni anticorpi hanno attività neutralizzante, soprattutto quelli con affinità per Spike (44), e sono in grado di bloccare l'entrata del virus nella cellula, rendendo il soggetto immune all'infezione virale. Idealmente un vaccino per SARS-CoV-2 dovrebbe indurre anticorpi neutralizzanti di lunga durata, ma non è ancora noto per quanto tempo persistano gli anticorpi

specifici in individui colpiti da COVID-19 o per quanto tempo persistono dopo la vaccinazione.

D'altra parte, è stato osservato che i pazienti affetti da una forma grave di COVID-19 presentano linfopenia, che è considerata un biomarcatore di gravità. In particolare, si osserva una riduzione di linfociti T della memoria e linfociti CD8+ citotossici. Inoltre, in questi casi, è stato riscontrato un aumento di linfociti T helper pro-infiammatori che producono IL-17 (detti linfociti Th17), e un aumento dell'attività citotossica dei linfociti T CD8+. Questo potrebbe spiegare il tipico danno anatomico polmonare indotto dalla malattia, la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), in quanto l'IL-17

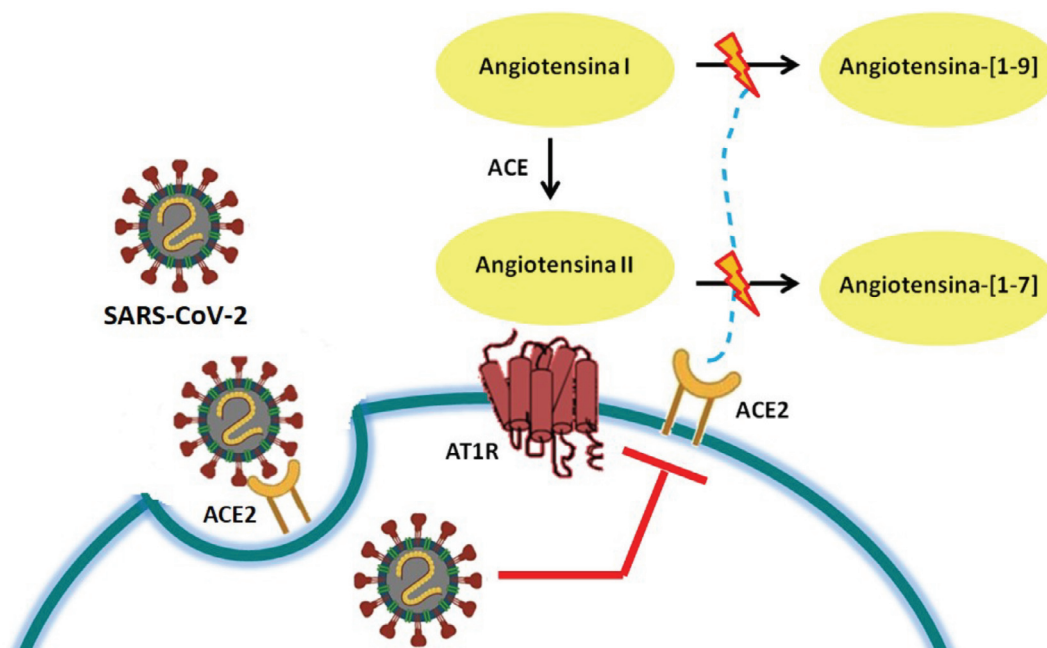


Figura 2

Interazione tra SARS-CoV-2 ed il sistema renina-angiotensina-aldosterone.

SARS-CoV-2 si lega all'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), espresso principalmente a livello polmonare, dai pneumociti di tipo II, ma anche in molti altri organi. Dopo l'endocitosi del complesso virale, l'espressione in membrana di ACE2 è ulteriormente ridotta, determinando un accumulo di angiotensina II. L'attivazione locale del sistema renina-angiotensina-aldosterone può mediare le risposte di danno polmonare agli insulti virali.

ACE, enzima di conversione dell'angiotensina; AT1R, recettore dell'angiotensina tipo II.

contribuisce alla distruzione del parenchima polmonare attraverso il reclutamento dei neutrofili e l'induzione di altri mediatori pro-infiammatori. La linfopenia è spesso accompagnata da una riduzione di eosinofili, basofili e monociti e da un aumento di neutrofili (45).

LE DIVERSE TECNOLOGIE IMPIEGATE NELLO SVILUPPO DI VACCINI PER SARS-CoV-2

La produzione di un vaccino che risulti efficace e sicuro è un processo molto lungo, richiede normalmente dai 10 ai 15 anni (46), consta di diverse fasi e presuppone una buona conoscenza dell'agente eziologico della malattia. Inizialmente si effettuano studi sperimentali *in vitro* in base ai quali è possibile stabilire la composizione quantitativa e qualitativa del vaccino. In seguito, il potenziale vaccino viene sottoposto a sperimentazione pre-clinica, che include studi *in vitro* e su modelli animali, per definire il meccanismo d'azione e valutare il profilo tossicologico. Infine, si susseguono tre fasi cliniche sull'essere umano, in cui viene progressivamente aumentata la popolazione trattata con il vaccino, definita la posologia e caratterizzata l'efficacia e la sicurezza. Il tutto si conclude con l'autorizzazione, l'immissione in commercio e gli studi post-marketing che valutano l'efficacia e la sicurezza del vaccino nelle reali condizioni d'uso. Per far fronte alla pandemia da COVID-

19, tale processo di sviluppo ha subito un'accelerazione senza precedenti a livello globale. La fase pre-clinica e la fase 1 dei test clinici sono state condotte parallelamente per 6-9 mesi e altri 6-9 mesi sono stati impiegati per condurre simultaneamente le fasi 2 e 3 dei test clinici. In ogni caso, tale procedura non ha reso in alcun modo gli studi meno rigorosi. Nessuna tappa, infatti, è venuta meno, e questo è stato possibile grazie a diversi fattori: ricerche già condotte in passato sulla tecnologia a mRNA, studi sui coronavirus correlati al SARS-CoV-2, ingenti risorse umane ed economiche messe a disposizione in tempi stretti, produzione del vaccino parallelamente agli studi e al processo di autorizzazione e valutazione da parte delle agenzie regolatorie dei risultati ottenuti, mentre questi venivano prodotti (*rolling review*) e non, come generalmente si usa fare, solo dopo il completamento di tutti gli studi.

Vaccini proteici

Lo sviluppo di vaccini proteici contro il SARS-CoV-2 è uno degli approcci maggiormente utilizzati. Inizialmente, le proteine si ottenevano tramite la purificazione dai patogeni. Oggi, grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, è possibile ottenere le proteine *in vitro* da vettori di espressione consolidati, efficienti e sicuri. Sono vaccini relativamente semplici da realizzare e abbastanza economici da produrre rispetto ai vaccini

tradizionali. Sebbene i vaccini proteici abbiano un buon profilo di sicurezza, hanno in genere bassi livelli di immunogenicità, per cui richiedono in genere l'uso di adiuvanti per migliorare la loro efficacia. La principale proteina utilizzata per lo sviluppo di questi vaccini è la proteina Spike di SARS-CoV-2, ma in alcuni casi è stata utilizzata la proteina N del nucleocapside. Ad oggi sono quattro i vaccini a subunità proteica approvati (Tabella 1): EpiVacCorona, sviluppato all'interno del State Research of Virology and Biotechnology VECTOR, in Siberia, RBD Dimer (ZF2001) prodotto in collaborazione con l'Accademia delle Scienze Cinese, MVC-COV1901 (Medicgen, Taiwan) e Abdala (CIGB-66), sviluppato dal Center for Genetic Engineering and Biotechnology di Cuba. Per tutti e quattro è prevista la somministrazione intramuscolare (47).

Attesa a breve è invece l'approvazione del vaccino NVX-CoV2373, sviluppato dall'azienda biotecnologica statunitense Novavax, formato da una nanoparticella lipidica su cui sono assemblate fino a 14 unità di proteina Spike in conformazione pre-fusione ottenute mediante la tecnologia del DNA ricombinante. Un altro vaccino proteico sviluppato dall'Università del Queensland (Australia), nonostante i buoni risultati in fase 1, non proseguirà invece verso le fasi successive, dal momento che induce la formazione di anticorpi contro la proteina gp41 di HIV-1, usata per stabilizzare il vaccino, che potrebbero interferire con i test sierologici per la diagnosi dell'infezione da HIV (48).

Appartengono a questa categoria anche i vaccini costituiti da particelle simil-virali (VLP) contro il SARS-CoV-2, in fase di sperimentazione. Di particolare interesse è l'innovativo vaccino nato da una collaborazione tra Medicago (Canada) e l'industria farmaceutica inglese GlaxoSmithKline (GSK), che si basa su VLP Spike prodotte dalle cellule vegetali di *Nicotiana benthamiana*, parente stretta della pianta di tabacco, combinate con un adiuvante. Questa tecnologia, già sperimentata con il vaccino antinfluenzale, potrebbe consentire la produzione massiva di vaccini VLP a prezzi contenuti (1,49).

Infine, due vaccini coniugati in fase di studio rappresentano una variante di quelli proteici tradizionali. Si tratta dei vaccini Soberana 01 (FINLAY-FR-1A) e Soberana 02 (FINLAY-FR-2), sviluppati dall'Istituto Finlay de Vacunas di Cuba. Entrambi contengono le sequenze RBD di Spike coniugate rispettivamente con il polisaccaride capsulare del meningococco B o con il tossoide tetanico (1).

Vaccini inattivati

I vaccini basati su SARS-CoV-2 inattivati, hanno il vantaggio di essere meno costosi e più sicuri rispetto a quelli basati su virus vivi attenuati ed inducono una risposta contro più antigeni rispetto a quelli proteici, ma più debole rispetto a quelli attenuati, necessitando perciò di adiuvanti. L'inattivazione, inoltre, solitamente effettuata chimicamente con β -propiolattone, comporta il rischio di alterazione della struttura terziaria di Spike e

delle sue proprietà antigeniche (50). Otto vaccini contenenti il virus inattivato sono già stati approvati in più di 100 paesi nel mondo (47).

Vaccini vivi attenuati

La tecnologia basata sull'utilizzo di virus SARS-CoV-2 attenuati con metodi classici, permette di produrre vaccini altamente immunogenici già in singola somministrazione, che non richiedono adiuvante e inducono un'immunità di lunga durata. Sviluppare rapidamente un vaccino vivo attenuato contro il SARS-CoV-2 risulta essere però molto complicato: sono infatti necessarie approfondite conoscenze di base del genoma e della biologia del virus per garantire che sia adeguatamente attenuato e che tutti i fattori di virulenza vengano rimossi (34). Inoltre, l'attenuazione di grandi quantità di virus è un'operazione difficoltosa e delicata, che può comportare rischi di biosicurezza. Infine, una volta prodotti, questi vaccini necessitano di rigorose procedure per lo stoccaggio e la manipolazione. Attualmente, solo un vaccino basato su SARS-CoV-2 attenuato, COVI-VAC (Serum Institute of India, in collaborazione con Codagenix, New York), è in corso di studio, per ora limitato alla fase 1 (46).

Vaccini basati su vettori virali

Un metodo moderno per veicolare gli antigeni virali contro cui indurre una risposta immunitaria consiste nella produzione di vettori virali ricombinanti. In questi vaccini il gene codificante la proteina Spike viene inserito all'interno di un vettore virale innocuo, solitamente un adenovirus non replicante, che viene così a esprimere l'antigene di SARS-CoV-2. Poiché il genoma degli adenovirus è formato da DNA, l'RNA codificante Spike viene trasformato in DNA complementare (cDNA) prima di essere inserito nel vettore e viene reso di conseguenza molto più stabile.

Nella maggior parte dei casi, i vettori virali sono resi incapaci di replicarsi e quindi molto più sicuri, attraverso la delezione di regioni genomiche necessarie per la replicazione. In altri casi, invece, il gene di Spike viene inserito all'interno di vettori virali attivi nella replicazione: questi virus hanno la capacità di propagarsi e possono indurre una risposta immunitaria più intensa (Figura 3). D'altro canto, la capacità replicativa li rende potenzialmente più pericolosi non solo dal punto di vista infettivologico, ma anche per il rischio che un'eventuale integrazione del genoma virale in quello delle cellule ospiti possa avviare un processo di tumorigenesi (51). Alcuni esempi sono il vaccino a somministrazione spray nasale basato sul virus respiratorio sinciziale (RSV) esprimente Spike (46), oppure vaccini ricombinanti basati sul virus del morbillo, della stomatite vescicolare e sul virus del vaiolo.

Un potenziale svantaggio nell'uso di vettori virali normalmente in grado di causare infezioni nell'essere umano è la formazione di immunoglobuline neutralizzanti contro il vettore stesso, oltre che contro l'antigene bersaglio, fenomeno che potrebbe

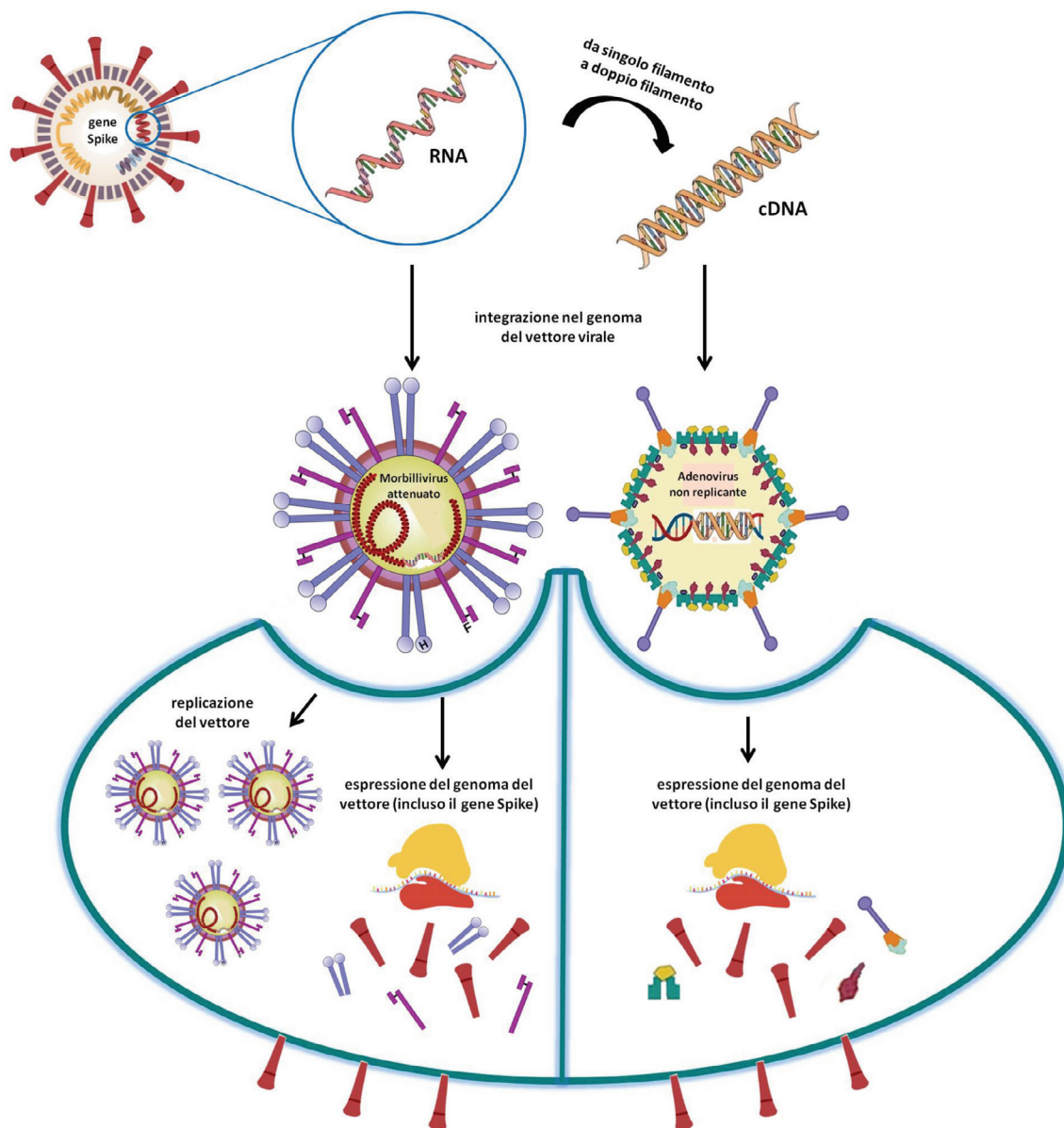


Figura 3

Meccanismo d'azione di due tipologie di vaccini basati su vettori virali contro il SARS-CoV-2: vettori virali replicanti e vettori virali non replicanti.

Il segmento di RNA di SARS-CoV-2 codificante la glicoproteina Spike viene inserito nel genoma di un vettore virale attraverso un processo di ingegnerizzazione genetica. Se il vettore possiede un genoma a base di DNA, è necessario un passaggio intermedio per trasformare l'RNA a singolo filamento in una molecola di DNA complementare (cDNA) a doppio filamento. Nella parte sinistra dell'immagine, il vettore è il virus del morbillo, che mantiene la sua capacità replicativa benché attenuato. Nella parte destra, invece, il vaccino è a base di un adenovirus non replicante, che si limita a veicolare l'antigene di interesse sotto forma di RNA. In entrambi i casi, una volta penetrati nella cellula con cui interagiscono, i vettori virali sfruttano la sua trascrizione per sintetizzare sia le loro proteine, sia Spike codificata dall'RNA inserito nel loro genoma, che verrà in seguito presentata sulla superficie inducendo una risposta immunitaria. cDNA, acido desossiribonucleico complementare; RNA, acido ribonucleico.

compromettere l'efficacia del vaccino. Ecco perché vengono spesso utilizzati come vettori virus non umani, ma di altri primati, quali gli scimpanzé o i gorilla, oppure, in caso di più somministrazioni, vettori diversi tra la prima e la seconda dose. Per esempio, il vaccino sviluppato da

AstraZeneca e dall'Università di Oxford (AZD1222) è composto da un singolo vettore ricombinante di adenovirus di scimpanzé con deficit di replicazione (ChAdOx1), che codifica per la glicoproteina Spike di SARS-CoV-2. È stato approvato il 29 gennaio 2021

dall'EMA per l'utilizzo nei soggetti al di sopra dei 18 anni di età e, sotto il nome di Covishield, è stato distribuito anche in India e in Nepal (52) e ha dimostrato complessivamente un'efficacia del 64,1% nella riduzione delle infezioni sintomatiche da COVID-19 dopo una dose standard e del 70,4% dopo la seconda dose.

Il vaccino russo Sputnik V, sviluppato da Gamaleya, si basa invece sull'utilizzo di due diversi vettori adenovirali umani, entrambi responsabili del raffreddore comune, rAd26 per la prima dose e rAd5 per la seconda dose, a distanza di 21 giorni. Questa tecnica è stata scelta per impedire lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti diretti contro il vettore nella finestra temporale tra le due dosi, che avrebbero potuto rendere meno efficace la seconda (53).

Un altro vaccino approvato che sfrutta un vettore adenovirale ingegnerizzato non replicante è quello sviluppato dalla società farmaceutica statunitense Johnson&Johnson. Anche in questo caso, il vettore, sierotipo 26 (Ad26), esprime la proteina Spike di SARS-CoV-2, che è stata stabilizzata in fase di pre-fusione (54). Si è dimostrato efficace al 66,1% dopo 28 giorni dalla vaccinazione, in tutti gli adulti di età pari o superiore a 18 anni, soprattutto per la prevenzione della malattia grave, dove ha raggiunto un'efficacia dell'85,4% (55).

Vaccini a mRNA

Le tecnologie basate sugli acidi nucleici hanno permesso di ottenere, in tempi molto brevi, una grande quantità di vaccini contro il SARS-CoV-2. Di attuale interesse sono i due promettenti vaccini a mRNA sviluppati da Pfizer/BioNTech e Moderna, il cui uso emergenziale è stato raccomandato dall'EMA, rispettivamente il 21 dicembre 2020 e il 6 gennaio 2021¹.

Il vaccino anti-COVID-19 mRNA BNT162b2 (Comirnaty) di Pfizer/BioNTech è destinato a prevenire la malattia da COVID-19 nei soggetti di età pari o superiore ai 16 anni. Viene somministrato in due iniezioni intramuscolari a distanza di almeno 21 giorni l'una dall'altra e, prima dell'uso, necessita di una diluizione. L'RNA messaggero, modificato a livello dei nucleosidi, è formulato in nanoparticelle lipidiche che ne permettono l'ingresso nelle cellule umane e lo proteggono da una degradazione precoce (50). Gli antigeni sintetizzati stimolano la risposta anticorpale della persona vaccinata con produzione di anticorpi neutralizzanti e inducono inoltre una reazione cellulo-mediata attraverso l'attivazione dei linfociti T (56).

Il vaccino anti-COVID-19 mRNA-1273 di Moderna è indicato a partire dai 18 anni di età, prevede due iniezioni intramuscolari a distanza di 28 giorni e l'immunità si considera pienamente acquisita a partire da due settimane dalla somministrazione della seconda dose. Anche questo vaccino contiene mRNA, inserito in nanoparticelle lipidiche, che codifica per la proteina Spike intera stabilizzata in conformazione di pre-fusione e ha dimostrato un'efficacia del 94,1% (IC 89,3-96,8) (57).

L'EMERGENZA DI NUOVE VARIANTI DI SARS-CoV-2

Una conseguenza naturale della replicazione virale e dell'interazione con le cellule ospiti è l'insorgenza di mutazioni all'interno del genoma del virus. I meccanismi principali alla base di questo fenomeno sono essenzialmente tre: errori di copiatura, soprattutto durante le infezioni prolungate con alto tasso di replicazione, co-infezione di una stessa cellula da parte di due linee virali e ricombinazione tra di esse, induzione di modifiche nel genoma da parte della cellula ospite come parte dell'immunità naturale o della pressione selettiva indotta da farmaci o vaccini. I virus a RNA sono più propensi a generare varianti rispetto a quelli a DNA, a causa di una RNA polimerasi che è spesso priva dell'attività di *proofreading* (58). I coronavirus tendono a generare meno mutazioni rispetto ad altri virus a RNA poiché la loro polimerasi possiede una parziale attività di correzione durante l'appaiamento delle basi. Ciononostante, la selezione naturale può comunque generare delle varianti come vantaggio nella competizione con altri patogeni o come strategia di evasione dal sistema immunitario (59).

Allo stato attuale sono state identificate alcune varianti clinicamente significative, illustrate nella Tabella 2 secondo i tre sistemi di nomenclatura più utilizzati (GISAID, Nextstrain e Pangolin) (60-79). Sono tutte causate da mutazioni puntiformi nel gene codificante la glicoproteina Spike, in particolare nel dominio contenente il RBD, il bersaglio principale degli anticorpi generati contro SARS-CoV-2. Questo può comportare un'alterazione della virulenza, possibile resistenza ai vaccini, oltre a una ridotta affinità degli anticorpi normalmente utilizzati per i test immunologici, con possibili implicazioni anche nella diagnostica di laboratorio.

L'OMS e il SARS-CoV-2 Interagency Group (SIG) hanno classificato le varianti di SARS-CoV-2 come VOI (*variants of interest*), ovvero forme virali con mutazioni che hanno possibili implicazioni fenotipiche e responsabili di focolai in varie aree geografiche, oppure come VOC (*variants of concern*), cioè varianti di interesse caratterizzate però da maggiore trasmissibilità e/o virulenza e/o che determinano una minore efficacia delle strategie diagnostiche, terapeutiche e di prevenzione. Esistono infine varianti con cambiamenti genetici sospetti ma con un impatto fenotipico ancora da chiarire e monitorare, definite come "*alerts for further monitoring*". Secondo i dati più recenti, la variante B.1.1.7 (Alfa) è più trasmissibile e virulenta, ma sembra conservare la suscettibilità ai vaccini del virus originale (73-77). Le varianti B.1.525 (Eta), B.1.351 (Beta), B.1.149 e B.1.427 (Epsilon) presentano una ridotta sensibilità agli anticorpi neutralizzanti (78,79). Le tre varianti indiane B.1.617 V1, V2 e V3 (Delta) e quella con mutazione P.1 (Gamma) risultano più trasmissibili e meno suscettibili alla neutralizzazione anticorpale (80,81).

¹Sebbene inizialmente approvato a titolo emergenziale, attualmente (settembre 2021), il vaccino Pfizer ha ricevuto un'approvazione globale.

Tabella 2
Elenco e caratteristiche delle principali varianti di SARS-CoV-2 finora identificate (dati aggiornati ad agosto 2021)

Variants of concern						
Classificazione OMS	Classificazione PANGO (60)	Classificazione GISAID (61)	Classificazione Nextstrain (62)	Mutazioni in Spike	Luogo e data della prima identificazione	Caratteristiche
Alfa	B.1.1.7	GRY (precedentemente GR/501Y.V1)	20I (V1)	E484K*, S494P*, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, K1191N*, 69del, 70del, 144del	Gran Bretagna settembre 2020	Aumentata trasmissibilità (63) Aumentato rischio di ospedalizzazione (76) e di mortalità (77) Impatto minimo sulla sensibilità agli anticorpi neutralizzanti (64,75,82,83)
Beta	B.1.351 B.1.351.2 B.1.351.3	GH/501Y.V2	20H (V2)	D80A, D215G, 241del, 242del, 243del, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Sudafrica maggio 2020	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (83)
Gamma	P.1 P.1.1 P.1.2	GR/501Y.V3	20J (V3)	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I	Brasile, Giappone novembre 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (65)
Delta	B.1.617.1 AY.1 AY.2	G/478K.V1	21A	T19R, G142D*, I56del, 157del, R158G, E484Q, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	India ottobre 2020	Aumentata trasmissibilità (maggiore rispetto alla variante Alfa) (66,73) Aumentato rischio di ospedalizzazione (73) Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (67)
VARIANTS OF INTEREST						
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	A67V, 69del, 70del, 144del, E484K, D614G, Q677H, F888L	Vari paesi dicembre 2020	Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (68)
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	L5F, D80G*, T95I, Y144*, F157S*, D253G, L452R*, 477N*, E484K, D614G, A701V, T859N*, D950H*, Q957R*	Stati Uniti novembre 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (69)
Kappa	B.1.617.1 B.1.617.3	G/452R.V3	21B	T95I, G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H, T19R, D950N	India ottobre 2020	Possibile resistenza agli anticorpi neutralizzanti (70)
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	del246-252, G75V, T76I, L452Q, F490S, T859N	Perù dicembre 2020	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (71)
ALERTS FOR FURTHER MONITORING						
Epsilon	B.1.427 B.1.429	GH/452R.V1	21C	L452R, D614G, S13I, W152C	California marzo 2020	Trasmissibilità aumentata del 20% (67) Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (79)
Theta	P.3	GR/1092K.V1	21E	E484K, N501Y, D614G, P681H	Filippine gennaio 2021	Aumentata trasmissibilità Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (72)
Zeta	P.2	GR/484K.V2	20B/S.484K	E484K, F565L*, D614G, V1176F	Brasile aprile 2020	Resistenza agli anticorpi neutralizzanti (61)

La preoccupazione riguardante la ridotta efficacia dei vaccini contro le varianti di recente insorgenza, alcune delle quali stanno diventando (o sono già diventate) prevalenti in alcune aree geografiche, ha indotto a potenziare il monitoraggio della risposta della popolazione alle campagne vaccinali e ad intensificare gli sforzi volti a modificare i vaccini nel caso dovessero risultare meno efficaci. Fortunatamente, sembra che i vaccini attualmente approvati funzionino anche contro le forme varianti di SARS-CoV-2, anche se con efficacia ridotta, soprattutto se vengono somministrate tutte le dosi previste dalla scheda vaccinale (82-84). La scelta di utilizzare una forma della proteina Spike stabilizzata in conformazione di pre-fusione in alcuni vaccini (Moderna, Pfizer/Biontech, Johnson&Johnson, Novavax) potrebbe spiegare la maggiore efficacia nei confronti di alcune varianti. A questo proposito un gruppo di ricercatori ha sviluppato una nuova versione di Spike nota come HexaPro contenente sei mutazioni anziché due, che la stabilizzano ulteriormente, aumentandone l'espressione e rendendola anche più resistente a temperature estreme (85). Questa strategia potrebbe rendere i vaccini più efficaci anche contro le varianti del virus e semplificare le difficoltà logistiche nella loro distribuzione.

IL RUOLO DEL LABORATORIO CLINICO NEL MONITORAGGIO DELLA CAMPAGNA VACCINALE

La medicina di laboratorio si è dimostrata fondamentale già a partire dalla prima ondata della pandemia da COVID-19. Da un lato, l'analisi molecolare di tamponi rinofaringei attraverso Real-Time PCR o i test rapidi antigenici e la sierologia hanno permesso la rapida diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2, seppur con i limiti di variabilità pre-analitica e di accuratezza finale, che non è mai del 100% e che varia ampiamente in base al metodo utilizzato (86). Dall'altro, il monitoraggio di diversi parametri ematologici, biochimici e di coagulazione tradizionali ha consentito il monitoraggio del paziente durante il decorso clinico della malattia e ha fatto emergere l'interessante valore prognostico e predittivo di alcuni biomarcatori (45,87-89).

Anche durante la campagna vaccinale il laboratorio ha svolto e svolge un ruolo di primo piano nella valutazione dell'efficacia dei vaccini e della copertura vaccinale della popolazione, oltre che nel monitoraggio di potenziali eventi avversi correlati alla vaccinazione. L'efficacia di un vaccino non si riferisce solamente all'efficacia biologica, rilevabile e quantificabile valutando la risposta immunitaria all'antigene di interesse attraverso test sierologici e di neutralizzazione, ma anche e soprattutto all'efficacia clinica, che permette di vedere i risultati epidemiologici di una campagna vaccinale più nell'immediato. Con efficacia clinica si intende la prevenzione dell'infezione in generale, sintomatica e non, e, in secondo luogo, la prevenzione delle forme clinicamente più gravi, che impattano

maggiormente sulla salute pubblica e sulla mortalità. Comprendere se la strategia vaccinale sta andando nella giusta direzione significa quindi fare un costante bilancio tra gli inevitabili rischi e i benefici e rivalutarlo di volta in volta prendendo decisioni di conseguenza.

I test sierologici nel monitoraggio della risposta anticorpale post-vaccino

Sicuramente il monitoraggio della risposta anticorpale attraverso i test sierologici rappresenta uno dei cardini dell'attività del laboratorio durante la campagna vaccinale. Tuttavia, occorre attenersi il più possibile a linee guida condivise, per permettere un buon livello di armonizzazione e standardizzazione, riproducibilità e quindi affidabilità dei risultati. Le metodiche su cui si basano i vari test disponibili sono molteplici e spesso è stata rilevata una buona correlazione inter-metodo, che però non raggiunge mai il 100%. In questo senso, una volta scelto un metodo, è preferibile seguire lo stesso anche nelle valutazioni successive.

Dato che la proteina Spike rappresenta il principale bersaglio antigenico della risposta immunitaria, i test sierologici dovrebbero misurare le immunoglobuline dirette in modo specifico contro questo antigene attraverso metodiche quantitative e non solo qualitative in grado anche di distinguere i diversi sierotipi anticorpali. La discriminazione tra IgM e IgG risulta utile per la comprensione dell'andamento della risposta immunitaria all'antigene introdotto con il vaccino, della capacità di costituire una memoria immunitaria e soprattutto della sua durata. A questo proposito, non è ancora nota la durata effettiva della protezione immunitaria post-infezione o post-vaccino e allo stato attuale è possibile basarsi esclusivamente sulle informazioni riguardanti altri coronavirus, come SARS-CoV o MERS-CoV, che indicano una durata della risposta anticorpale di circa due anni e di quella cellulo-mediata fino a sei anni (90-92). Tuttavia, per SARS-CoV-2, iniziano a emergere i primi dati sulla sieropositività post-infezione e indicano che le IgG sembrano persistere a 6-8 mesi dopo l'infezione nel 90% dei soggetti (93,94). Un'altra interessante classe di anticorpi meritevoli di attenzione è quella delle IgA, le immunoglobuline mucosali che rappresentano uno dei primi sistemi di difesa contro l'ingresso del virus. È interessante notare come la misura delle IgA abbia rivelato un'emivita addirittura superiore rispetto alle IgG e un aumento più precoce dopo l'infezione (95), oltre che una buona capacità neutralizzante a livello delle mucose (96,97). Gli immunodosaggi preferibilmente quantitativi permettono quindi di definire il livello minimo di protezione garantita dal vaccino e di chiarire se e quando sarà necessario un richiamo.

Inoltre, come esposto poco sopra, i virus a RNA come SARS-CoV-2, a causa della mancanza di meccanismi di riparazione molecolari, sono soggetti a frequenti mutazioni. Per questo motivo, è importante che durante lo sviluppo del vaccino vengano presi in

considerazione anche i ceppi con diverse mutazioni per impedire che questi sfuggano al riconoscimento immunitario. Dall'inizio della pandemia ad oggi, sono state rilevate molte varianti di SARS-CoV-2, la maggioranza delle quali non altera significativamente l'assetto e le componenti del virus. Alcune mutazioni, però, come la L452R, la D614G e la E484Q nel RBD o la P681R nel sito di clivaggio della furina di Spike, riscontrate nella variante Delta, attualmente predominante in molti paesi (98), potrebbero aumentare la trasmissibilità del virus favorendo non solo l'interazione con ACE2 ma anche il taglio enzimatico S1-S2 per un miglior ingresso all'interno della cellula ospite (81). Allo stesso modo, c'è il rischio di una ridotta sensibilità alla neutralizzazione anticorpale, anche se in questo caso i dati in merito sono contrastanti. Uno studio di Weissman et al. su pseudovirus ha infatti dimostrato come la stessa mutazione D614G, se da un lato modifica la conformazione del RBD di Spike favorendo l'ingresso di SARS-CoV-2, dall'altro ne espone maggiormente l'epitopo riconosciuto dagli anticorpi, rendendolo più suscettibile alla neutralizzazione (99).

Molti aspetti relativi all'efficacia dei vaccini sono ancora controversi e necessitano di studi a lungo termine. Tenendo conto della recente comparsa di forme varianti di SARS-CoV-2, che potrebbero complicare i test immunometrici con risultati falsi negativi e diminuire la capacità neutralizzante delle immunoglobuline nonostante la sieropositività (85,100,101), la medicina di laboratorio potrebbe svolgere un ruolo essenziale per un continuo monitoraggio dell'emergenza di nuove varianti tramite sequenziamento e nel costante aggiornamento delle informazioni a supporto della campagna vaccinale. A questo proposito, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha introdotto la piattaforma I-Co-Gen per condividere i dati relativi alla sorveglianza genomica a livello nazionale. L'obiettivo è produrre due rapporti periodici, un'indagine rapida per "fotografare" il sequenziamento di campioni raccolti in un determinato giorno e un bollettino con i dati quotidiani provenienti dalle regioni su campioni casuali e categorie particolari, come le re-infezioni o le infezioni in soggetti già vaccinati (102,103).

I test di laboratorio nella prevenzione e nel monitoraggio degli eventi avversi

La recente rilevazione di alcuni casi di trombosi con trombocitopenia correlate ai vaccini (*vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia*, VITT) di AstraZeneca e Johnson&Johnson ha reso necessaria la rapida diagnosi di questi episodi e l'individuazione di test di laboratorio e biomarcatori utili a predire il loro sviluppo e/o la progressione verso esiti più severi. I primi casi di alterazione della coagulazione e del conteggio e della funzione piastrinica sono stati descritti poco dopo l'inizio della campagna vaccinale su larga scala, in relazione ai vaccini ChAdOx1 nCov-19 di AstraZeneca (104,105), Ad.26. COV2.S di Johnson&Johnson (106,107) ed in misura minore anche ai vaccini ad mRNA (108). La fisiopatologia del fenomeno è apparsa da subito molto

simile alla già nota trombocitopenia indotta da eparina (*heparin-induced thrombocytopenia*, HIT), in particolare a una HIT autoimmune, ovvero una reazione immunomediata che induce la formazione di anticorpi diretti contro i complessi eparina-fattore piastrinico 4 (PF4) e che comporta un'inappropriata attivazione e aggregazione piastrinica. Ne consegue una piastrinopenia da consumo e attivazione della cascata coagulativa con possibili esiti trombotici e, paradossalmente, anche emorragici a causa della bassa conta piastrinica e del consumo di fattori della coagulazione. Nel caso della VITT, i complessi bersaglio degli anticorpi sembrano essere costituiti da PF4 e da un polianione simile alla molecola eparinica, che potrebbe derivare dal DNA del vettore adenovirale, comune ad entrambi i vaccini implicati. Questi immunocomplessi interagirebbero con i recettori FcγRIIIa delle piastrine, attivandole e stimolandone l'aggregazione. L'adenovirus potrebbe anche attivare direttamente le piastrine interagendo con il fattore di von Willebrand o con la P-selettina, oppure può veicolare l'espressione di Spike nei megacariociti, rendendoli potenziali bersagli degli anticorpi anti-Spike (109). Greinacher et al. hanno invece proposto che l'EDTA contenuto nel vaccino potrebbe favorire la permeabilità vascolare e la disseminazione di componenti del vaccino, che interagirebbero con anticorpi naturali innescando un danno da immunocomplessi (110). Da citare infine l'ipotesi di Kowarz et al., secondo cui potrebbe avvenire uno splicing alternativo dell'RNA di Spike, favorito dall'adenovirus stesso, che causerebbe la produzione di una forma più corta della proteina Spike priva del sito di ancoraggio alla membrana e quindi libera di circolare e di legarsi a recettori ACE2 sulle cellule endoteliali, favorendo eventi trombotici (111).

La VITT è una sindrome clinicamente distinta dalle alterazioni dell'emostasi già descritte nel corso dell'infezione grave da SARS-CoV-2 e con alcune peculiarità rispetto alla HIT classica: coinvolge spesso sedi atipiche venose e arteriose (vasi splanchnici, aorta, seni venosi cerebrali), determina una coagulopatia da consumo e una piastrinopenia significativa (descritti casi con meno di 10×10^9 piastrine/L) e si associa a una sieropositività per immunocomplessi anti-PF4 (104,112). È stata descritta soprattutto in donne con meno di 55 anni, con esordio tra i 5 e i 28 giorni dopo la vaccinazione e con manifestazioni cliniche quali cefalea persistente, alterazioni visive, dolore addominale, gonfiore e dolore agli arti inferiori, dispnea, dolore toracico (113,114).

Il laboratorio può contribuire notevolmente al riconoscimento di questi fenomeni già a partire dalle analisi emocromocitometriche per il conteggio piastrinico e dai test di coagulazione standard (PT, aPTT, fibrinogeno, D-dimero). La diagnosi specifica di VITT implica però anche la determinazione degli anticorpi anti-PF4, che presenta un forte valore predittivo negativo, preferibilmente attraverso test ELISA (114), in associazione a test funzionali di aggregazione piastrinica (*heparin-induced platelet aggregation*, HIPA),

utile soprattutto in caso di discrepanza con i test immunologici (115). La presenza di anticorpi anti-PF4, inoltre, non si associa necessariamente a una piastrinopatia. La loro patogenicità deve pertanto essere considerata solo in caso di positività del test HIPA (113). Gli stessi test risultano inoltre fondamentali durante il trattamento del paziente con VITT, indirizzando verso la necessità di anticoagulanti non eparinici, trasfusione di piastrine o plasmaferesi nei casi più gravi (113,114).

CONCLUSIONI

Sin dal suo esordio con il focolaio di Wuhan nel novembre 2019, la pandemia da COVID-19 ha messo l'intera popolazione mondiale di fronte ad una sfida senza precedenti, sovvertendo l'economia, l'istruzione e la gestione pubblica e compromettendo la piena funzionalità dei sistemi sanitari della maggior parte dei Paesi del mondo. Nella comunità scientifica, ha indotto un'affannosa (ma fruttuosa) ricerca di mezzi per contrastare l'infezione da SARS-CoV-2, soprattutto nel campo dei vaccini, che appaiono oggi la modalità di prevenzione primaria più efficace, accompagnata dalle misure igieniche come l'uso della mascherina ed il distanziamento sociale.

In questo scenario, fin da subito è apparso evidente il ruolo chiave della Medicina di Laboratorio, in particolare nell'individuare i parametri di laboratorio utili ai clinici per valutare la prognosi dei pazienti affetti dalle forme gravi di COVID-19 e per poter discriminare i soggetti ad evoluzione più sfavorevole, che richiedevano il ricovero in terapia intensiva ed il supporto respiratorio; nel processo diagnostico dell'infezione attraverso test molecolari, antigenici rapidi o sierologici; infine nella campagna vaccinale, la cui efficacia è stata monitorata sin dal suo esordio analizzando la risposta immunitaria al vaccino, non solo in termini di titolo anticorpale ma anche e soprattutto valutando la capacità neutralizzante degli anticorpi stessi. Il contributo si è quindi esteso anche alla definizione e al monitoraggio degli eventi avversi clinicamente significativi, a partire dalla più volte citata VITT, ribadendo il ruolo di primo piano degli esami di laboratorio nel processo diagnostico e di prevenzione e nella determinazione di potenziali fattori predittivi.

Nonostante le criticità che la pandemia ha comportato, alcuni suoi aspetti potrebbero quindi apparire come un potenziale vantaggio per il futuro. Se da un lato la pandemia ha rappresentato una sfida globale inaspettata, dall'altro ha permesso di sperimentare nuove tecnologie e nuovi approcci nel campo della prevenzione. La rapidità degli studi e l'impegno tecnologico per lo sviluppo di un vaccino sono stati sicuramente fuori dall'ordinario. In pochi mesi sono stati fatti numerosi passi in avanti nel campo della biologia molecolare e delle nanotecnologie, vaccini prima approvati solo in ambito veterinario, come quelli a DNA, sono stati sperimentati anche nell'uomo e altri finora testati solo in campo oncologico, come i vaccini a mRNA, hanno dimostrato di essere efficaci anche per contrastare alcune malattie infettive. Tra le tante

conseguenze della pandemia, è pertanto possibile rilevare anche un potenziale vantaggio per la ricerca che, grazie alle solide basi poste da questa inaspettata spinta a studiare nuovi approcci, sarà sicuramente favorita in futuro in ambiti che si estendono ben oltre COVID-19.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol* 2020;202:162-92.
2. Agenzia Italiana del Farmaco, Vaccini COVID-19, <https://www.aifa.gov.it/vaccini-covid-19> (ultimo accesso: giugno 2021).
3. European Medicines Agency, COVID-19 vaccines: authorised. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorised#authorised-covid-19-vaccines-section> (ultimo accesso: giugno 2021).
4. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. Target product profile analysis of COVID-19 vaccines in phase III clinical trials and beyond: An early 2021 perspective. *Viruses* 2021 doi: 10.3390/v13030418.
5. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Comirnaty, INN-COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside-modified) - SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
6. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Spikevax, INN-COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside modified) - SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
7. Momin T, Kansagra K, Patel H, et al. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine* 2021 doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101020.
8. Precision Vaccinations-ZyCoV-D COVID-19 Vaccine. <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/zycov-d-covid-19-vaccine> (ultimo accesso: agosto 2021).
9. BBC News - Zydus Cadila: India approves world's first DNA Covid vaccine. <https://www.bbc.com/news/world-asia-india-57774294> (ultimo accesso: agosto 2021).
10. Quartz India - What we know about ZyCoV-D, the world's first DNA Covid vaccine. <https://qz.com/india/2050714/what-we-know-about-zycov-d-the-worlds-first-dna-covid-vaccine/> (ultimo accesso: agosto 2021).
11. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Vaxzevria, COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S (recombinant)) - Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
12. CanSinoBIO, <http://www.cansinotech.com/html/179/180/651.html> (ultimo accesso: luglio 2021).

13. McDougall Scientific. 2021 COVID-19 Vaccines - Summary, updates & status. <https://www.mcdougallscientific.com/wp-content/uploads/2021-Covid-19-Vaccine-and-Clinical-Trials-Update.pdf> (ultimo accesso: luglio 2021).
14. U.S. National Library of Medicine. Study of the Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of 'EpiVacCorona' Vaccine for the Prevention of COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04527575> (ultimo accesso: luglio 2021).
15. Clinical Study of Recombinant Novel Coronavirus Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085> (ultimo accesso: luglio 2021).
16. MesVaccins.net - ABDALA - CIGB-66 COVID-19 Vaccine, https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/718-abdala-cigb-66-covid-19-vaccine#vaccin_posologie (ultimo accesso: luglio 2021).
17. Szu-Min H, Liu M-C, Chen Y-H, et al. Safety and Immunogenicity of CpG 1018 and Aluminium Hydroxide-Adjuvanted SARS-CoV-2 S-2P Protein Vaccine MVC-COV1901: A Large-Scale Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. medRxiv 2021doi: 10.1101/2021.08.05.21261532.
18. Xia S, Zhang Y, Wang Y, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21:39–51.
19. Chinese Clinical Trial Register (ChiCTR) - The world health organization international clinical trials registered organization registered platform. <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=53003> (ultimo accesso: luglio 2021).
20. World Health Organization Strategic Advisory Group of Experts (SAGE). Evidence Assessment: Sinopharm/BBIBP COVID-19 vaccine. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/sage/2021/april/2_sage29apr2021_critical-evidence_sinopharm.pdf. (ultimo accesso: Agosto 2021).
21. ClinicalTrials.gov - Efficacy, Safety and Immunogenicity of Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines (Vero Cell) to Prevent COVID-19 in Healthy Adult Population In Peru Healthy Adult Population In Peru. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04612972> (ultimo accesso: luglio 2021).
22. Precision Vaccinations - Sinopharm COVID-19 Vaccine (BBIBP-CorV). <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sinopharm-covid-19-vaccine-bbibp-corv> (ultimo accesso: luglio 2021).
23. World Health Organization. Background document on the inactivated vaccine Sinovac-CoronaVac against COVID-19. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-> (ultimo accesso: maggio 2021).
24. World Health Organization. Interim recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine, CoronaVac, developed by Sinovac Interim guidance. <https://www.who.int/groups/strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization/covid-19-materials> (ultimo accesso: maggio 2021).
25. Reuters - Sinopharm's Wuhan unit reports 72.5% efficacy for COVID shot, seeks approval in China. <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-vaccine-sinopharm-idUSKBN2A00WW> (ultimo accesso: luglio 2021).
26. Covid-19 Vaccine Tracker: Latest Updates - The New York Times. <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html> (ultimo accesso: agosto 2021).
27. Ella R, Reddy S, Blackwelder W, et al. Efficacy, safety, and lot to lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine 1 (BBV152): a, double-blind, randomised, controlled phase 3 trial 2. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.06.30.21259439.
28. ClinicalTrials.gov - Immunogenicity, Efficacy and Safety of QazCovid-in® COVID-19 Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04691908> (ultimo accesso: luglio 2021).
29. ClinicalTrials.gov-Reactogenicity, Safety and Immunogenicity of QazCoVac-P COVID-19 Vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04930003?term=vaccine&recrs=adf&cond=COVID19&phase=0123&sort=nwst&draw=2> (ultimo accesso: luglio 2021).
30. Liu J, Huang B, Li G, et al. Immunogenicity and Safety of a SARS-CoV-2 Inactivated Vaccine (KCONVAC) in 1 Healthy Adults: Two Randomized, Double-blind, and Placebo-controlled Phase 1/2 2 Clinical Trials 3 4 Hongxing Pan Background The significant morbidity and mortality resulted from the infection of a severe acute. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.04.07.21253850.
31. EurekAlert Science News - A new hope: A novel vaccine against COVID-19 is safe and induces antibody production. https://www.eurekalert.org/pub_releases/2021-06/cc-anh060721.php (ultimo accesso: luglio 2021).
32. Iranian Registry of Clinical Trials. A double-blind, randomized, placebo-controlled Phase II/III Clinical trial to evaluate the safety and efficacy of COVID-19 inactivated vaccine (Shifa-Pharmed) in a population aged 18 to 75 years. <https://en.irct.ir/trial/54881> (ultimo accesso: luglio 2021).
33. Russia's CoviVac (КовиВак) more than 80% effective against COVID-19. <https://www.seminaronly.com/news/russias-covivac-ковивак-more-than-80-effective-against-covid-19/> (ultimo accesso: luglio 2021).
34. Flanagan KL, Best E, Crawford NW, et al. Progress and pitfalls in the quest for effective SARS-CoV-2 (COVID-19) vaccines. *Front Immunol* 2020;11:579250.
35. Jin Y, Yang H, Ji W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* 2020;12:372.
36. Iba T, Levy JH, Connors JM, et al. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit Care* 2020;24:1-8.
37. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, et al. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 2020;11:995–8.
38. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631-7.
39. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone system inhibitors in patients with COVID-19. *N Engl J Med* 2020;382:1653-9.
40. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. *Biochim Clin Suppl* 3 2020;44:S28-S38.
41. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; 367(6483):1260-3.
42. Maggi E, Canonica GW, Moretta L. COVID-19: Unanswered questions on immune response and pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2020;146:18-22.
43. MK B, TP L, CB W, et al. IFCC Interim Guidelines on Serological Testing of Antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2001-8.
44. Salvatori G, Luberto L, Maffei M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein: an optimal immunological target for vaccines. *J*

- Transl Med 2020;18:222.
45. Henry BM, De Oliveira MHS, Benoit S, et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58:1021-8.
 46. Abdulla ZA, Al-Bashir SM, Al-Salih NS, et al. A Summary of the SARS-CoV-2 Vaccines and Technologies Available or under Development. *Pathogens* 2021;10:788.
 47. COVID19 Vaccine Tracker, <https://covid19.trackvaccines.org/> (ultimo accesso: agosto 2021).
 48. The University of Queensland, Australia - Update on UQ COVID-19 vaccine - UQ News, <https://www.uq.edu.au/news/article/2020/12/update-uq-covid-19-vaccine> (ultimo accesso: giugno 2021).
 49. Medicago begins Phase I clinical trials for its COVID-19 vaccine candidate, <https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-begins-phase-i-clinical-trials-for-its-covid-19-vaccine-candidate/> (ultimo accesso: giugno 2021).
 50. ClinicalTrials.gov - BCG Vaccination to Protect Healthcare Workers Against COVID-19, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04327206> (ultimo accesso: luglio 2021).
 51. Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2014;2:624-41.
 52. Sah R, Shrestha S, Mehta R, et al. AZD1222 (Covishield) vaccination for COVID-19: Experiences, challenges, and solutions in Nepal. *Travel Med Infect Dis* 2021;40:101989.
 53. Logunov DY, Dolzhikova I V., Zubkova O V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020;396:887-97.
 54. Bos R, Rutten L, van der Lubbe JEM, et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines* 2020;5:91.
 55. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). COVID-19 Vaccine Janssen, INN-COVID-19 vaccine (Ad26.COV2-S (recombinant)) - Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information_en.pdf (ultimo accesso: luglio 2021).
 56. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-Based COVID-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* 2020;383:2439-50.
 57. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021;384:403-16.
 58. Barr JN, Fearn R. Chapter 2: Genetic Instability of RNA Viruses. In: Kovalchuk I, Kovalchuk O, ed. *Genome Stability: From Virus to Human Application*. Amsterdam: Elsevier Inc. 2016:21-35.
 59. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2 - what do they mean? 2021;325:529-31.
 60. PANGO lineages, <https://cov-lineages.org/> (ultimo accesso: luglio 2021).
 61. GISAID - hCov19 Variants, <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/> (ultimo accesso: luglio 2021).
 62. Nextstrain, <https://nextstrain.org/sars-cov-2> (ultimo accesso: luglio 2021).
 63. Buchan SA, Tibebe S, Daneman N, et al. Increased household secondary attack rates with Variant of Concern SARS-CoV-2 index cases. *Clin Infect Dis* 2021 doi: 10.1093/CID/CIAB496.
 64. Emary KRW, Golubchik T, Aley PK, et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2021;397:1351-62.
 65. Wang P, Casner RG, Nair MS, et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *bioRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.03.01.433466.
 66. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *bioRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.04.22.440932.
 67. Deng X, Garcia-Knight MA, Khalid MM, et al. Transmission, infectivity, and antibody neutralization of an emerging SARS-CoV-2 variant in California carrying a L452R spike protein mutation. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.03.07.21252647.
 68. Fact sheet for health care providers emergency use authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab authorized use. https://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm (ultimo accesso: luglio 2021).
 69. Annavajhala MK, Mohri H, Zucker JE, et al. A Novel SARS-CoV-2 Variant of Concern, B.1.526, Identified in New York. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.02.23.21252259.
 70. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* 2021;29:463-76.e6.
 71. Acevedo ML, Alonso-Palomares L, Bustamante A, et al. Infectivity and immune escape of the new SARS-CoV-2 variant of interest Lambda. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.06.28.21259673.
 72. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, et al. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *The Lancet Microbe* 2021;2:e283-e284.
 73. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 49thed. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-july-2021> (ultimo accesso: luglio 2021).
 74. Volz E, Mishra S, Chand M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *medRxiv* 2021 doi: 10.1101/2020.12.30.20249034.
 75. Muik A, Wallisch AK, Sanger B, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science* 2021;371:1152-3.
 76. Bager P, Wohlfahrt J, Fonager J, et al. Risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in Denmark: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021 doi: 10.1016/S1473-3099(21)00290-5.
 77. Horby AP, Huntley C, Davies N, et al. NERVTAG paper on COVID-19 variant of concern B.1.1.7. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/961037/NERVTA_G_note_on_B.1.1.7_severity_for_SAGE_77__1_.pdf (ultimo accesso: agosto 2021).
 78. Li Q, Nie J, Wu J, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell* 2021;184:2362-71.e9.
 79. McCallum M, Bassi J, de Marco A, et al. SARS-CoV-2 immune evasion by the B.1.427/B.1.429 variant of concern. *Science* 2021;373:648-54.
 80. Oliveira MHS de, Lippi G, Henry BM. Sudden rise in COVID-19 case fatality among young and middle-aged adults in the south of Brazil after identification of the novel

- B.1.1.28.1 (P.1) SARS-CoV-2 strain: analysis of data from the state of Parana. medRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.03.24.21254046.
81. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. bioRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.04.22.440932.
 82. Collier DA, De Marco A, Ferreira IATM, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited antibodies. *Nature* 2021;593:136-41.
 83. Wu K, Werner AP, Moliva JI, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. bioRxiv 2021 doi: 10.1101/2021.01.25.427948.
 84. Bernal JL, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 variant. *N Engl J Med* 2021;385:585-94.
 85. Curiale S. Coronavirus: quello che c'è da sapere. https://www.inmi.it/wp-content/uploads/2021/05/coronavirus_comunicato_30_04_21_compressed.pdf (ultimo accesso: giugno 2021).
 86. Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin Suppl* 3 2020;44:S8-S12.
 87. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;505:190-1.
 88. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1131-4.
 89. Rolla R, Vidali M, Puricelli C, et al. Reduced activity of B lymphocytes, recognised by Sysmex XN-2000TM haematology analyser, predicts mortality in patients with coronavirus disease 2019. *Int J Lab Hematol* 2020;43:e5-e8.
 90. Tang F, Quan Y, Xin Z-T, et al. Lack of peripheral memory B Cell responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A six-year follow-up study. *J Immunol* 2011;186:7264-8.
 91. Wu LP, Wang NC, Chang YH, et al. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1562-4.
 92. Alshukairi AN, Zhao J, Al-Mozaini MA, et al. Longevity of middle east respiratory syndrome coronavirus antibody responses in humans, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2021;27:1472-6.
 93. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021 doi: 10.1126/science.abc4063.
 94. Lippi G, Sciacovelli L, Trenti T, et al. Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali. *Biochim Clin.* 2021;45:87-90.
 95. Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value of anti-SARS-COV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. *J Med Virol* 2021;93:1210-1.
 96. Varnaité R, García M, Glans H, et al. Expansion of SARS-CoV-2-Specific Antibody-Secreting Cells and Generation of Neutralizing Antibodies in Hospitalized COVID-19 Patients. *J Immunol* 2020;205:2437-46.
 97. Ejemel M, Li Q, Hou S, et al. A cross-reactive human IgA monoclonal antibody blocks SARS-CoV-2 spike-ACE2 interaction. *Nat Commun* 2020;11:4198.
 98. Nextstrain Team. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with global subsampling, <https://nextstrain.org/ncov/open/global> (ultimo accesso: agosto 2021).
 99. Weissman D, Alameh M-G, Silva T de, et al. D614G Spike mutation increases SARS CoV-2 susceptibility to neutralization. *Cell Host Microbe* 2021;29:23-31.
 100. World Health Organization. Genomic sequencing of SARS-CoV-2 - A guide to implementation for maximum impact on public health. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440> (ultimo accesso: giugno 2021).
 101. Becker M, Dulovic A, Junker D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals. *Nat Commun* 2021;12:1-8.
 102. Istituto Superiore di Sanità. Come funziona il monitoraggio delle varianti in Italia?, https://www.iss.it/cov19-cosa-fa-iss-varianti/-/asset_publisher/yJS4xO2faUqM/content/come-funziona-il-monitoraggio-delle-varianti-in-italia- (ultimo accesso: agosto 2021).
 103. Istituto Superiore di Sanità. Prevalenza e distribuzione delle varianti del virus SARS-CoV-2 di interesse per la sanità pubblica in Italia. Rapporto n. 5 del 23 luglio 2021. <https://www.iss.it/documents/20126/0/ versione+h++17+B OLLETTINO+VARIANTI+n.5+23+luglio.pdf/e3a41bf9-0913-a01b-6b5d-5b55c249e0d7?e=1627050956399> (ultimo accesso: agosto 2021).
 104. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, et al. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021;384:2092-101.
 105. Schultz NH, Sørvoll IH, Michelsen AE, et al. Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021;384:2124-30.
 106. Sadoff J, Davis K, Douoguih M. Thrombotic thrombocytopenia after Ad26.COV2.S Vaccination — Response from the Manufacturer. *N Engl J Med* 2021;384:1965-6.
 107. European Medicines Agency. EudraVigilance: electronic reporting. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/pharmacovigilance/eudravigilance/eudravigilance-electronic-reporting> (ultimo accesso: giugno 2021).
 108. Lee EJ, Cines DB, Gernsheimer T, et al. Thrombocytopenia following Pfizer and Moderna SARS-CoV-2 vaccination. *Am J Hematol* 2021;96:534-7.
 109. Tsilingiris D, Vallianou NG, Karamela I, et al. Vaccine induced thrombotic thrombocytopenia: The shady chapter of a success story. *Metab Open* 2021 doi: 10.1016/j.metop.2021.100101.
 110. Greinacher A, Handtke S, Lalk M, et al. Towards understanding ChAdOx1 nCov-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT). *Research Square* 2021 doi: 10.21203/rs.3.rs-440461/v1.
 111. Kowarz E, Krutzke L, Reis J, et al. 'Vaccine-Induced Covid-19 Mimicry' Syndrome: Splice reactions within the SARS-CoV-2 Spike open reading frame result in Spike protein variants that may cause thromboembolic events in patients immunized with vector-based vaccines. *Research Square* 2021 doi: 10.21203/rs.3.rs-558954/v1.
 112. Arepally GM, Ortel TL. Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT): What we know and don't know. *Blood* 2021;138:293-8.
 113. Gresele P, Marietta M, Ageno W, et al. Management of cerebral and splanchnic vein thrombosis associated with thrombocytopenia in subjects previously vaccinated with Vaxzevria (AstraZeneca): a position statement from the Italian Society for the Study of Haemostasis and Thrombosis (SISST). *Blood Transfus* 2021;19:281-3.
 114. International Society on Thrombosis and Haemostasis. ISTH Interim guidance for the diagnosis and treatment on vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. <https://www.isth.org/news/561406/The-ISTH-Releases-Interim-Guidance-on-Vaccine-Induced-Immune-Thrombotic-Thrombocytopenia-VITT-.htm> (ultimo accesso: luglio 2021).

115. Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi. Diagnosi e terapia della trombocitopenia eparina indotta. Perugia: Siset, 2010. <http://www.siset.org/linee-guida/linee-guida-siset> (ultimo accesso: giugno 2021).