



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Clinica
Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e
Specialistica di Eccellenza “G. D’Alessandro” (PROMISE)
MED/04

Ruolo del background genetico nella risposta ai vaccini anti SARS-CoV-2

IL DOTTORE

Dr.ssa Giuseppa Luisa Sanfilippo

IL COORDINATORE

Prof.re Antonino Tuttolomondo

IL TUTOR

Pro.ssa Giuseppina Candore

IL CO TUTOR

Prof.ssa Nadia Caccamo

CICLO XXXVIII ANNO
CONSEGUIMENTO TITOLO 2026

Dedico questo lavoro di tesi:

Ai miei genitori

Sommario

1.	Introduzione	4
1.1.	<i>Origine di SARS-CoV-2</i>	<i>4</i>
1.2.	<i>Tassonomia e genoma di Sars-CoV-2</i>	<i>4</i>
1.3.	<i>Ciclo replicativo di Sars-Cov-2</i>	<i>8</i>
1.4.	<i>Varianti Sars-CoV2</i>	<i>9</i>
1.5.	<i>Fisiopatogenesi e risposta immunitaria al SARS-CoV-2</i>	<i>10</i>
1.6.	<i>Il ruolo degli interferoni in SARS-CoV-2</i>	<i>12</i>
1.7.	<i>Approcci terapeutici in Sars-CoV-2</i>	<i>13</i>
1.8.	<i>Strategia vaccinale in Sars-CoV-2</i>	<i>13</i>
1.8.1	<i>Vaccini a mRNA</i>	<i>13</i>
1.8.2	<i>Vaccini a subunità</i>	<i>14</i>
1.8.3	<i>Vaccini contro i virus inattivati</i>	<i>15</i>
1.8.4	<i>Vaccini vettoriali virali</i>	<i>15</i>
1.8.5	<i>Vaccini vivi attenuati</i>	<i>16</i>
1.8.6	<i>Vaccini a particelle simili a virus</i>	<i>17</i>
1.8.7	<i>Vaccini a DNA</i>	<i>17</i>
1.9.	<i>Immunità adattiva mediata dal vaccino per SARS-CoV-2</i>	<i>18</i>
1.10.	<i>Background genetico e risposta immunitaria</i>	<i>19</i>
1.11.	<i>Vaccinazione anti SARS-CoV-2 in soggetti con patologie autoimmuni</i>	<i>20</i>
2.	Scopo della Ricerca	22
3.	Materiali e Metodi	23
3.1.	<i>Popolazione analizzata</i>	<i>23</i>
3.2.	<i>Estrazione del DNA genomico tramite sistema automatico con biglie magnetiche</i>	<i>25</i>
3.3.	<i>Tipizzazione degli SNP</i>	<i>26</i>
3.4.	<i>Metodo di rilevazione SARS-CoV-2 S1/S2 IgG</i>	<i>29</i>
3.5.	<i>Isolamento PBMCs, coltura e stimolazione antigenica, marcatura intracellulare e analisi citofluorimetrica</i>	<i>31</i>
3.6.	<i>Statistica</i>	<i>33</i>
4.	Risultati	34
4.1.	<i>Associazione dei genotipi degli SNP di IL28B ed IFNλ4 con i livelli dei titoli anticorpali al day 31e 105 dalla seconda dose di vaccino</i>	<i>34</i>
4.2.	<i>Risposta dei linfociti CD4+ CD8+ stimolati con una miscela di peptidi sintetici omologhi alle diverse varianti della glicoproteina "spike"</i>	<i>36</i>
5.	Discussione	39
6.	Conclusioni	42
7.	Bibliografia	43
8.	Pubblicazioni	56
9.	Ringraziamenti	57

1. Introduzione

1.1. Origine di SARS-CoV-2

Alla fine di dicembre 2019, nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei, Cina Centrale, a seguito dell'identificazione di un focolaio di 29 casi di polmoniti acute ad eziologia non nota, è stato descritto un nuovo coronavirus, successivamente rinominato Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), responsabile della malattia definita COVID-19 (1). A seguito dell'indagine epidemiologica iniziata il 31 dicembre 2019 dal dipartimento cinese dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i casi di polmonite severa acuta furono sin da subito associati al mercato di Wuhan (Wuhan's South China Seafood City market) nel quale venivano venduti diversi animali selvatici, tra cui serpenti, uccelli, pipistrelli, conigli, rane e numerosi piccoli mammiferi (1). A differenza, di quanto accaduto per i coronavirus umani SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) e MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), SARS-CoV-2 risultava aver acquisito un'efficiente capacità di trasmissione interumana, che ne permise una rapida diffusione. L'11 marzo 2020 l'Organizzazione mondiale della Sanità dichiarò lo stato di pandemia (2). A distanza di poco più di 3 anni, dopo oltre 6.5 milioni di morti e gravi sconvolgimenti economici e sociali a livello mondiale, il 5 maggio 2023, la stessa organizzazione dichiara ufficialmente terminata l'Emergenza Internazionale di salute pubblica, per il COVID-19 sottolineando allo stesso tempo l'importanza nel continuare a monitorare questo virus che può ancora rappresentare una minaccia in termini di salute globale (2).

1.2. Tassonomia e genoma di Sars-CoV-2

I coronavirus sono virus appartenenti al dominio Riboviria, ordine Nidovirales, famiglia Coronaviridae e sottofamiglia Ortho-coronavirinae. L'ordine dei Nidovirales è rappresentato da virus che possiedono una molecola di RNA lineare a polarità positiva (3). Il prefisso "Nido" indica che il loro RNA si avvolge a formare una struttura simile ad un nido. La sottofamiglia Ortho-coronavirinae è costituita da 4 diversi generi: Alphacoronavirus, Beta-coronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus (3). Mentre, i mammiferi rappresentano l'habitat naturale dei generi Alphacoronavirus e Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus sono stati identificati nelle specie aviarie. A seguito dell'immediato sequenziamento di questo nuovo virus, l'analisi della sequenza genomica ne ha indicato l'appartenenza al genere β -coronavirus, sottogenere Sarbecovirus, indicando un'identità di

sequenza nucleotidica del 79.6% con il genoma di SARS-CoV e per questo rinominato SARS-CoV-2 (Figura 1) (4).

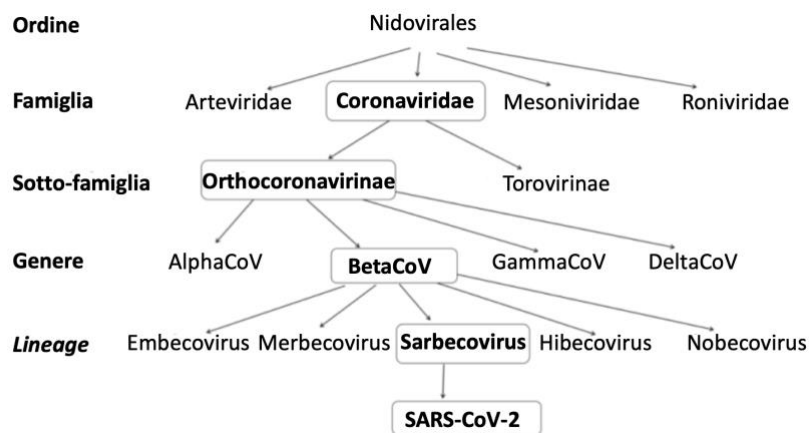


Figura 1. Tassonomia dei Coronavirus (5).

Diversi studi hanno dimostrato, come, SARS-CoV e MERS-CoV che si servono di ospiti intermedi per effettuare il salto di specie all'uomo, anche per SARS-CoV-2 esiste un ospite intermedio nel quale il virus si replica prima del passaggio alla specie umana, probabilmente rappresentato dal pangolino (6). Tuttavia, l'origine diretta dal pangolino è stata messa in discussione dalla scoperta di altri virus simili Sars-CoV-2, trovati in pipistrelli provenienti da diverse località del sud-est asiatico (4). All'interno di questi ospiti intermedi non definiti, il virus, ha acquisito gran parte delle mutazioni necessarie per un'efficiente trasmissione e replicazione nell'uomo (6). Sars-CoV-2 è un virus sferico di circa 60-140 nm rivestito da un envelope dal quale sporgono delle strutture superficiali, che gli conferiscono un aspetto caratteristico, simile ad una corona dovuta alla presenza della glicoproteina spike (S) che forma dei raggi di 9-12 nm di lunghezza sulla superficie virale (5). Il genoma a singolo filamento a RNA a polarità positiva, di circa 30 kb, è costituito da un cap metilato in 5' e una coda di poliA in 3' (regioni non tradotte, UTRs) che contengono strutture secondarie di RNA ad azione cis, essenziali per la sintesi dell'RNA, ed è caratterizzato da 14 open reading frames (ORFs): ORF1a e 1b, che occupano i due terzi dell'intero genoma, ORF2 (spike), ORF3a, ORF3b, ORF4 (envelope), ORF5 (membrane), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9a, ORF9b (nucleocapside) e ORF10 che codificano per proteine accessorie e proteine strutturali (5) (Figura 2).

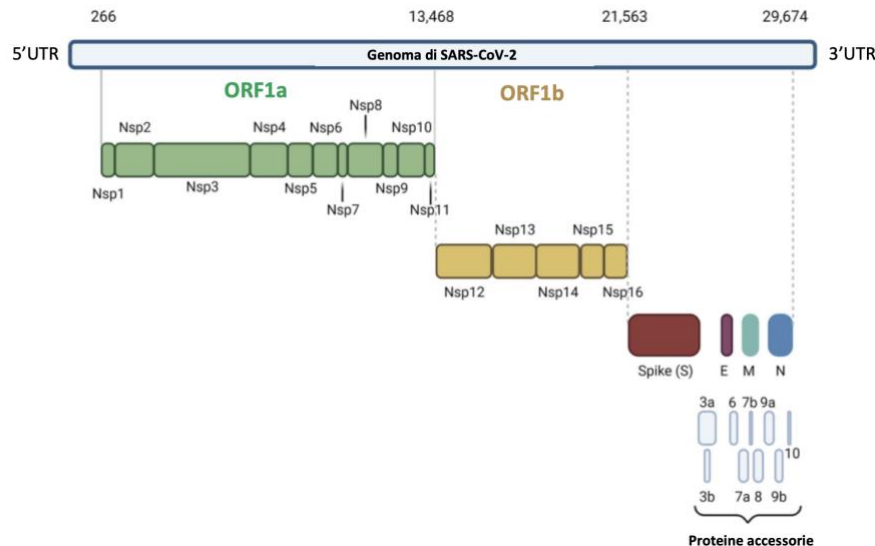


Figura 2. Organizzazione genomica di SARS-CoV-2. (7)

Le regioni ORFs 1a e 1b codificano per due polipeptidi, pp1a e pp1ab, che a seguito di processi post- traduzionali verranno divisi ad opera di proteasi in 16 proteine non strutturali (Nsp) 1-16, che andranno poi a formare il complesso di replicazione-trascrizione (8). Tra queste, la proteina non strutturale Nsp12 è la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e rappresenta la proteina più conservata in tutti i coronavirus. Essa ha un ruolo centrale nel complesso di replicazione e trascrizione del genoma virale e la sua funzione è quella di copiare l'RNA virale (9). La proteina non strutturale Nsp14 svolge un'azione cruciale nella sintesi dell'RNA virale. Attraverso l'attività esoribonucleasica 3'-5' di proofreading è implicata nel sistema di riparo dei mismatch incrementando la fedeltà della sintesi dell'RNA, e mediante l'attività metil-transferasica, necessaria per la formazione del cap del virus, protegge l'RNA dalla degradazione e dall'identificazione da parte del sistema immunitario dell'ospite (9). Nove proteine accessorie, denominate ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b e 10, codificate dalle ORF, sebbene ritenute non essenziali per la replicazione del virus, sulla base di studi in vitro, sembrano esercitare importanti funzioni nella modulazione del metabolismo della cellula ospite e dell'immunità antivirale (9). Tra le più rilevanti proteine strutturali, la proteina S, codificata dalla ORF2, è una glicoproteina trimerica presente sulla superficie del virus e consiste in un ectodominio, una porzione transmembrana e un breve dominio intracellulare (Figura 3) (10). L'ectodominio è formato da due subunità (S1 e S2), dove la S1, contenente il dominio di legame al recettore (Receptor Binding Domain, RBD), è la porzione responsabile sia dell'attacco con il recettore della cellula ospite sia della fusione con la cellula stessa (11). Tra le subunità S1 e S2 è presente un sito di clivaggio della furina (RRAR), che consente un taglio da parte della furina e di altre proteasi, permettendo la fusione del virus con la cellula ospite.

La proteina S (Spike) riconosce e lega la proteina ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) presente sulla superficie della cellula ospite, determinando il tropismo del virus e rappresentando l'antigene principale di SARS-CoV-2 (11).

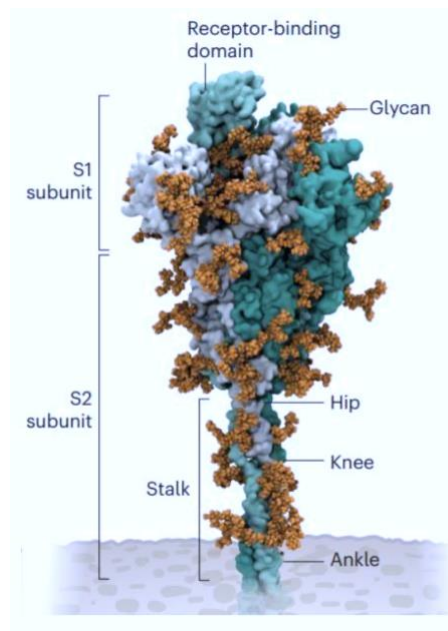


Figura 3. Rappresentazione della proteina spike di SARS-CoV-2 (10).

La proteina strutturale E (envelope) è la più piccola proteina integrale di membrana, codificata dalla ORF4 è costituita da un breve dominio N-terminale, un lungo dominio transmembrana idrofobo ed un lungo dominio C-terminale idrofilo. Svolge un ruolo centrale nella morfogenesi e nell'assemblaggio del virus. (11) Nel dominio C-terminale di questa proteina, sono infatti presenti tre cisteine che subiscono processi di ubiquitinizzazione e palmitoilazione, reazione necessaria per l'assemblaggio del virus; questa proteina è inoltre in grado di oligomerizzare, formando delle viroporine capaci di trasportare selettivamente gli ioni calcio e partecipare all'assemblaggio e al rilascio di particelle virali nella cellula ospite (11). Le viroporine sono anche essenziali per la formazione dell'ERGIC (Endoplasmatic-Reticulum-Golgi intermediate Compartment) all'interno del quale avviene l'assemblaggio dei virioni. La glicoproteina M (Membrana), implicata nella formazione dell'envelope, è codificata dalla ORF5 e rappresenta una delle proteine più abbondanti in SARS-CoV-2. È costituita da tre regioni transmembrana caratterizzate da un breve dominio NH2 terminale che protrude all'esterno del virus e da un lungo dominio citoplasmatico COOH all'interno del virione (12). Questa proteina è presente in due forme, una allungata e l'altra compatta; la proteina spike si inserisce prevalentemente a livello della proteina in forma lunga, facendogli assumere una forma sferica, circondando così la ribonucleoproteica (11). La proteina M, insieme alla glicoproteina strutturale N

(nucleocapside), codificata dalla ORF9, è implicata nell'assemblaggio dei nuovi virioni e nella loro gemmazione. La proteina N può legarsi alla proteina Nsp3 favorendo il legame con il complesso di replicazione-trascrizione RTC (Replication-Transcription Complex) e, legandosi direttamente all'RNA virale, contribuisce alla sua stabilità. La proteina N di SARS-CoV-2 è espressa principalmente durante le prime fasi dell'infezione e rappresenta un marker diagnostico in quanto induce una forte risposta immunitaria (12).

1.3. Ciclo replicativo di Sars-Cov-2

Il ciclo vitale di SARS-CoV-2 inizia quando la glicoproteina strutturale di superficie S, transmembrana, si lega al recettore della cellula ospite, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) (13,15). Il dominio RBD della subunità S1 si lega al dominio peptidico di ACE2; questa interazione induce il priming della subunità S1 a livello della giunzione S1/S2 da parte di proteasi cellulari, come furina o proteasi endosomiali esponendo un sito secondario (S2'), scisso dalla serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2) (15,20). Tale scissione modifica irreversibilmente la conformazione della proteina S, permettendo alla subunità S2 di inserirsi nella membrana dell'ospite e di guidare la fusione tra membrana virale e cellulare (14,16). Oltre ad ACE2, anche CD147 è stato indicato come possibile recettore transmembrana in grado di mediare l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule (17). CD147, noto anche come basigina o induttore della metalloproteinasi della matrice extracellulare, è una glicoproteina transmembrana della superfamiglia delle immunoglobuline, espressa sulla superficie di globuli rossi, linfociti, cellule dendritiche, monociti, macrofagi e in numerosi altri tessuti (17,18). È stato inoltre dimostrato che CD147 facilita l'ingresso cellulare di diversi virus, tra cui HIV-1 e il virus del morbillo (19,20). Analogamente a quanto osservato per SARS-CoV, l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule avviene tramite endocitosi mediata da recettore (21,22). Una volta rilasciato nel citoplasma, l'RNA virale viene decapsidato e iniziano le traduzioni degli ORF1a e ORF1b, che codificano rispettivamente per le poliproteine pp1a (nsp1–11) e pp1ab (nsp1–16) (23,24). L'elaborazione di queste poliproteine è regolata da proteasi virali, come Mpro (nsp5) e PLpro (nsp3), le quali generano le nsps necessarie alla formazione del complesso di replicazione/trascrizione (26,27). Le nsps riorganizzano le membrane derivate dal reticolo endoplasmatico rugoso in vescicole, all'interno delle quali avviene l'assemblaggio virale (28,29). Infine, i virioni neoformati vengono rilasciati dalla cellula ospite attraverso un processo di esocitosi mediato da vescicole secretorie (30).

1.4. Varianti Sars-CoV2

Analogamente agli altri coronavirus, le mutazioni nel codice genetico SARS-CoV-2 si verificano casualmente nella replicazione virale (31; 32; 33; 34; 35). Ad esempio, per quanto riguarda il lineaggio originale di SARS-CoV-2, una delle prime mutazioni registrate è stata la sostituzione degli aminoacidi D614G nella proteina S. Nel marzo 2020, questa mutazione ha permesso al proteina RBD di assumere una conformazione più adatta al legame ACE2 e di diventare rapidamente dominante (36,37,38). In questo scenario, durante la diffusione della pandemia, sono emerse diverse varianti di SARS-CoV-2 che hanno suscitato molta preoccupazione (39). In particolare, la variante alfa (lineaggio B.1.1.7), caratterizzata da una mutazione N501Y nel suo RBD (40), è stata la prima VOC rilevata durante la pandemia, identificata nel novembre 2020 nel Regno Unito (49). Ha iniziato, a diffondersi rapidamente a metà dicembre, rivelandosi il 40%-80% più trasmissibile del tipo (WT) (41,2). Nel dicembre 2020 la variante beta (lineaggio B.1.351) è stata rilevata in Sudafrica (43), anche se l'analisi filogeografica ha dimostrato, che questa variante è emersa molto prima, a luglio o agosto 2020 (44). Al giorno d'oggi, l'OMS ritiene che non sia più in circolazione. È stato osservato che questa variante sia in grado di attaccarsi più facilmente alle cellule umane a causa di tre mutazioni nell'RBD (45): N501Y, K417N, E484K. E484K e N501Y che sono localizzati nel motivo di legame del recettore (RBM) dell'RBD. Alla fine del 2020, altri due COV, entrambi discendenti dal lignaggio B.1.617.2, sono stati rilevati in India: la variante delta, con mutazioni L452R e T478K nel picco RBD (45), e la variante kappa, caratterizzata da mutazioni L452R ed E484K in quel dominio (46). Nel maggio 2021, la delta è stata dichiarata avere una maggiore diffusione, rispetto alle altre varianti (47). Secondo l'OMS, nel giugno 2021 questo ceppo stava diventando quello dominante a livello globale e nel novembre 2021 si era diffuso in oltre 179 paesi. Sempre nel dicembre 2020, si sono osservati, i primi casi della variante eta (lineaggio B.1.525) che presentava nell'RBD la mutazione E484K è stata rilevata nel Regno Unito e in Nigeria (48). Nel gennaio 2021 la variante gamma (discendente dal lignaggio B.1.1.28) è stata identificata in Giappone, in quattro persone in viaggio dal Brasile (49). Questa variante presenta 17 sostituzioni di aminoacidi, dieci delle quali sono nella proteina spike, di cui tre nell'RBD: N501Y, E484K, K417T (49). L'ultima variante è l'omicron (lineaggio B.1.1.529), segnalata per la prima volta in Sudafrica il 24 novembre 2021 (50) e rispetto alle varianti precedenti, l'omicron presenta 30 cambiamenti di aminoacidi, tre piccole delezioni e un piccolo inserimento nella proteina spike rispetto al virus originale, di cui 15 mutazioni si trovano nell'RBD (51). La circolazione prolungata del virus SARS-CoV-2 sta favorendo l'emergere di nuove varianti. Pertanto, protocolli computazionali in grado di operare sulla sequenza

genomica sono ideali per vigilare sull'identificazione di un nuovo ceppo e la valutazione clinica delle sue capacità di diffusione (51). Nella (Tabella.1) sono riportati le principali mutazioni di maggiore preoccupazione e interesse (52).

Variante	Mutazioni nella Proteina S	Mutazioni nei NSPs	Mutazioni in altre proteine
Omicron (BA.1)	A67V, H69-, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	NSP3: K38R, S1265I, A1892T; NSP4: T492I; NSP5: P132H; NSP6: L105-, S106-, G107-; NSP12: P323L; NSP14: I42V	E: T9I; M: D3G, Q19E, A63T; N: P13L, E31-, R32-, S33-, R203K, G204R
Delta (B.1.617.2)	T19R, K77T, EFR156G-, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	NSP2: P129L; NSP3: P822L; NSP4: D217N, F375S; NSP6: H111Q; NSP12: P323L; NSP15: K259R	ORF3a: S26L; M: I82T; ORF7a: V82A, T120I; N: D63G, R203M, D377Y
Alpha (B.1.1.7)	H69-, Y144-, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H	NSP3: T183I, A890D, I1412T; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L	ORF8: Q27*, R52I, Y73C; N: D3L, R203K, G204R, S235F
Beta (B.1.351)	D80A, D215G, L241-, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	NSP2: T85I; NSP3: K837N; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L	ORF3a: Q57H, S171L; E: P71L; N: T205I
Gamma (P.1)	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F	NSP3: S370L, K977Q; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L; NSP13: E341D	ORF3a: S253P; ORF8: E92K; N: P80R, R203K, G204R
Epsilon (B.1.427)	S13I, W152C, L452R, D614G	NSP2: T85I; NSP4: S395T; NSP12: P323L, D260Y	ORF3a: Q57H; N: T205I
Zeta (P.2)	E484K, D614G, V1176F	NSP5: L205V; NSP12: L71F	N: A119S, R203K, M234I
Eta (B.1.525)	Q52R, A67V, H69-, Y144-, E484K, D614G, Q677H, F888L	NSP3: T1189I; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L	E: L21F; M: I82T; ORF6: F2-; N: D2Y, A12G, T205I
Theta (P.3)	LGV141-, Y265C, E484K, N501Y, D614G, P681H, E1092K, H1101Y, V1176F	NSP3: D736G, S1807F; NSP4: D217N; NSP6: Δ112-114; NSP12: L1280F, A368V	ORF8: K20Q; N: R203K, G204R
Iota (B.1.526)	L5F, T95I, D253G, S477N, E484K, D614G, A701V, Q957R	NSP2: T85I; NSP3: L438P; NSP12: P323L; NSP13: Q88H	ORF3a: P42L, Q57H; ORF7a: L149F; N: M234I
Kappa (B.1.617.1)	T95I, G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H	NSP3: V982A; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L	ORF3a: S26L; M: I82T; ORF7a: V82A; N: D63G, R203M, D377Y
Lambda (C.37)	G775V, RSVLTPGD246-, L452Q, F490S, D614G, T859N	NSP4: F75V, F1569V; NSP6: Δ106-108; NSP12: P323L	N: P13L, R203K, G214C, T366I
Mu (B.1.621)	T95I, Y144TSN, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H, D950N	NSP3: T89I; NSP5: P132L; NSP12: P323L	ORF3a: Q57H, V256I; N: T205I

Tabella 1. Principali mutazioni puntuali nelle proteine delle varianti di SARS-CoV-2 di preoccupazione/interesse (52)

1.5. Fisiopatogenesi e risposta immunitaria al SARS-CoV-2

L'ssRNA virale appena rilasciato contiene modelli molecolari associati agli agenti patogeni (PAMP), riconosciuti come entità estranee dai recettori di riconoscimento (PRR) nel citoplasma e lungo la membrana cellulare e le superfici endosomali (53,54). I PRR includono recettori simili al gene I (RLR) inducibili all'acido retinoico citoplasmatico e recettori Toll-like (TLR) legati alla membrana, con sottoclassi che riconoscono svariati acidi nucleici virali (55,56). L'RNA virale di SARS-CoV-2 è riconosciuto dal gene inducibile dall'acido retinoico (RIG-I) degli RLR e dall'MDA5 dal suo terminale di trifosfato di 5' (57). Esso, attiva il complesso RIG-I e MDA5 che si associa alla proteina di segnalazione antivirale mitocondriale (MAVS) e anche TLR7 endosomale, che, in combinazione con il gene della risposta primaria di differenziazione mieloide 88 (MyD88), porta principalmente, alla produzione di interferoni di tipo I e di tipo III (58,59). La via di segnalazione, TLR7/MyD88 media l'immunità nelle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), nelle infezioni virali multiple, ed è probabilmente anche delle cellule epiteliali delle vie aeree infetate dalla virus (60,61). Questa condizione, può innescare l'attivazione dell'inflammasoma, la piroptosi, la necroptosi e l'apoptosi (62,63,64). Il successivo rilascio di (DAMP) e l'attivazione di IL-1 β , possono essere uno dei primi eventi che

portano alla cascata infiammatoria che caratterizza il COVID-19 (65), promuovendo il rilascio di ulteriori citochine infiammatorie come la proteina infiammatoria dei macrofagi 1 α (MIP1 α), MIP1 β , IL-6 e la proteina 10 indotta dall'INF γ (IP-10), dai macrofagi alveolari adiacenti, dalle cellule epiteliali ed endoteliali (66, 67). Le varianti nei geni dei recettori delle citochine possono influenzare l'affinità di legame e le vie di segnalazione a valle. Ad esempio, il recettore dell'IL-6 (IL6R) esiste in forma legata alla membrana e in quella solubile circolante per la trans-segnalazione, dove agisce come agonista di IL6 (68). Dopo il legame con IL6, IL6R forma un complesso con la glicoproteina 130 (gp130), recettore di membrana, avviando vie di segnalazione intracellulari cruciali nelle risposte immuno-infiammatorie (69). Alcuni studi, suggeriscono che il genotipo CC di IL6R (rs2228145) svolga un ruolo significativo nella gravità della COVID-19, supportato da evidenze scientifiche che correlano tali genotipi a maggiori tassi di mortalità, polmonite e livelli elevati di proteine pro-infiammatorie nel plasma, anche se, occorrerebbero, ulteriori approfondimenti in merito (70). È stato osservato, che la proteina nucleocapsidica di SARS-CoV-2, aumenta il legame tra NLRP3 e la proteina ASC (Apoptosis-associated Spike-like protein containing a Caspase recruitment domain), portando a una maggiore segnalazione di IL-1 β e IL-6, un peggioramento del danno polmonare e una maggiore mortalità nei topi colpiti dall'infezione virale (71,72). Studi recenti, hanno mostrato che la variante p.Leu155His di NLRP1 nella regione linker, bersaglio delle proteasi virali, è significativamente correlata alla gravità del COVID-19, contribuendo potenzialmente alla sindrome da rilascio di citochine osservata nei casi gravi (73). Analogamente, l'attivazione dei recettori TLR durante l'infezione da SARS-CoV-2, aumenta il rischio di danni tissutali e la progressione verso forme gravi della malattia. TLR2 e TLR4 sono stati proposti come biomarcatori sierici rilevanti per la prognosi del COVID-19 grave. È stato evidenziato in diversi studi che, l'interazione tra la proteina spike di SARS-CoV-2 e TLR4 è uno dei fattori scatenanti delle cascate di segnalazione infiammatoria dell'ospite (74). Ad esempio, il polimorfismo del gene TLR2, rs3804100-G, è stato associato, significativamente alla suscettibilità alla polmonite da COVID-19 rispetto ai soggetti sani (74) e TLR4 induce l'espressione del recettore ACE2, necessario per l'ingresso del virus. Il ruolo svolto da molte citochine e chemochine nel COVID-19 è riassunta nella Tabella 2. (75)

Citochine/Chemochine	Funzione
IL-1 β	Proinfiammatorio; evidenza di attivazione dell'inflammasoma; può indurre lo spargimento di ACE2
IL-1RA	Prove di attivazione dell'inflammasoma
IL-2	L'upregulation è correlato alla gravità del COVID-19
IL-6	Livelli altamente correlati con l'RNAemia SARS-CoV-2 e la gravità del COVID-19; differenziazione dei monociti ai macrofagi (70); media la differenziazione delle cellule TH17; correla con l'aumento della popolazione di cellule B DN2; l'elevazione persistente (almeno 8 mesi dopo l'infezione) può essere vista nel PASC
IL-7	Elevato nel COVID-19; importante nello sviluppo e nella sopravvivenza delle cellule T
IL-8	Proinfiammatorio attraverso il reclutamento di neutrofili; l'upregulation è correlato alla gravità del COVID-19 in alcuni studi; può essere associato alla durata con la malattia; può essere elevata nel PASC
IL-10	Mediatore antinfiammatorio chiave che può anche attenuare la risposta anti-SARS-CoV-2; associato alla gravità del COVID-19
IL-17	Pro-infiammatorio; associato all'attrazione dei neutrofili; la sovraespressione di IL-17A è correlata alla gravità del COVID-19
IL-18	Prove di attivazione dell'inflammasoma; induce la produzione di IFN- γ ; alti livelli osservati nel MAS, di nota (384)
IL-21	Rilasciato da TH17; può interagire con IFN- γ per facilitare la differenziazione delle cellule B DN2 (181)
IL-22	Rilasciato da cellule TH1, TH17 e NK; proprietà antinfiammatorie, anti-apoptiche e antiossidanti specificamente su cellule epiteliali e fibroblasti
IFN- α (T1 IFN)	Componente critica della risposta antivirale; compromissione significativa (bassi livelli) nel COVID-19 grave e critico; gli autoanticorpi IgG a IFN- α 2 possono essere osservati in pazienti con COVID-19 critico (309) che possono persistere per almeno 2-3 mesi dopo l'infezione
IFN- β (T1 IFN)	Componente critica della risposta antivirale; menomazione significativa [assente, in almeno uno studio nel COVID-19 grave e critico; aumento persistente (almeno 8 mesi dopo l'infezione) può essere visto nel PASC
IFN- γ (T2 IFN)	Può essere un componente chiave della morte delle cellule infiammatorie mediate dalle citochine e dello stato di shock insieme a TNF α ; guida le cellule B extrafolicolari alla produzione di anticorpi antivirali; aumento persistente (almeno 8 mesi dopo l'infezione) può essere visto in PASC
TGF- β	Induce la produzione di anticorpi plasmablastici periferici (vale a dire, IgG1 e IgA1) (396) media la differenziazione delle cellule TH17; può sopprimere inopportuna la funzione delle cellule NK nel COVID-19 grave (397)
TNF α	Proinfiammatorio; può indurre lo spargimento di ACE2; può essere una componente chiave della morte cellulare infiammatoria mediata da citochine e dello stato di shock
CCL2/MCP-1	Elevato nei pazienti COVID-19 rispetto ai controlli sani abbinati; può indicare chemioattrazione monocitaria al polmone colpito
CCL3/MIP1 α	Elevato nei pazienti COVID-19 rispetto ai controlli sani abbinati
CCL4/MIP1 β	Elevato nei pazienti COVID-19 rispetto ai controlli sani abbinati
CXCL9	IFN- γ -indotto; può essere elevato nelle sindromi della tempesta di citochine
CXCL10/IP-10	Correla con la progressione della malattia (82) e un aumento della popolazione di cellule B DN2; può rimanere elevata durante l'infezione virale, che può essere unica per gravi infezioni da coronavirus; associato a un aumento delle cellule B EF

Tabella 2. Ruolo delle citochine e delle chemochine nella patogenesi del COVID-19 (75).

1.6. Il ruolo degli interferoni in SARS-CoV-2

Gli interferoni di tipo III (IFN- λ), tra cui IFN- λ 1 (IL29), IFN- λ 2 (IL28A), IFN- λ 3 (IL28B) e IFN- λ 4, svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità mucosale contro i virus respiratori, incluso SARS-CoV-2. A differenza degli interferoni di tipo I (come IFN- α e IFN- β), gli IFN- λ esercitano un'azione antivirale, localizzata principalmente nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, limitando l'infezione virale e l'infiammazione sistemica (76). Il gene IL-28B, che codifica per IFN- λ 3, è stato ampiamente studiato in passato per la sua associazione alla clearance del virus HCV (epatite C), ma negli ultimi anni ha attirato interesse anche per il suo potenziale ruolo modulatore nel COVID-19 (77). I polimorfismi più studiati includono rs8099917 ed rs12979860, che influenzano rispettivamente i livelli di espressione di IFN- λ 3, IFN- λ 4. Studi recenti hanno suggerito che i portatori dell'allele favorevole C (rs12979860) hanno una risposta antivirale più efficiente, con un minor rischio di COVID-19 in forma grave, probabilmente grazie a una maggiore induzione di geni stimolati da interferone (ISG) nelle vie aeree superiori (78). Al contrario, il genotipo TT è stato associato a un rischio aumentato di forme gravi o letali di COVID-19, a causa di una risposta IFN- λ più blanda e tardiva. L'uso terapeutico degli IFN λ è stato proposto per il trattamento precoce dell'infezione da SARS-CoV-2, al fine di inibire la replicazione virale senza gli effetti collaterali pro-infiammatori associati agli IFN di tipo I. In uno studio clinico randomizzato pubblicato su *The*

Lancet Respiratory Medicine, la somministrazione di pegIFN- λ nei primi giorni di positività ha accelerato significativamente la clearance virale rispetto al placebo, suggerendo un beneficio terapeutico concreto nei pazienti con polimorfismi sfavorevoli di IL28-B (79).

1.7. Approcci terapeutici in Sars-CoV-2

Attualmente, diversi vaccini e farmaci antivirali sono stati approvati per trattare e ridurre la gravità legata alle infezioni da SARS-CoV-2 (80). Recentemente, la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato gli anticorpi monoclonali (mAbs) tixagevimab e cilgavimab per la profilassi pre-esposizione del COVID-19, in individui con gravi allergie ai vaccini SARS-CoV-2. Questi anticorpi monoclonali vengono iniettati per via intramuscolare (IM) o endovenosa (IV). Tixagevimab e cilgavimab, hanno mostrato una potenziale attività contro la variante Delta di SARS-CoV-2 inibendo l'ingresso virale nell'ospite (81). Farmaci anti-IL6, sono stati approvati dalla FDA per i pazienti COVID-19 con infiammazione sistemica o insufficienza respiratoria, poiché queste condizioni potrebbero essere associate a un elevato rilascio di citochine. Ci sono due classi di inibitori IL-6 approvati dalla FDA dopo aver esaminato pazienti con infiammazione sistemica: mAbs anti-IL-6 recettore (ad esempio, tocilizumab, sarilumab) e anti-IL-6 mAbs (cioè, siltuximab) (82). Inoltre, sono disponibili anche farmaci antivirali orali, per trattare il COVID-19, tra cui molnupiravir e la combinazione di nirmatrelvir e ritonavir. Questi antivirali hanno dimostrato, in uno studio retrospettivo, una significativa riduzione dell'ospedalizzazione, della morte e della gravità della malattia, in particolare tra gli individui vaccinati con altre comorbidità (83). L'uso di un membro della famiglia dei corticosteroidi, il desametasone, è stato anche segnalato per ridurre la mortalità nei pazienti COVID-19 con risposta respiratoria intensiva (84). Un inibitore nucleotidico, Remdesivir, approvato dalla FDA, è stato preso in considerazione per l'efficacia nell'ostacolare la gravità dell'infezione da SARS-CoV-2 ed il suo uso è associato ad un rischio più basso di ospedalizzazione o morte (85).

1.8. Strategia vaccinale in Sars-CoV-2

1.8.1 Vaccini a mRNA

I vaccini a mRNA, hanno svolto un ruolo straordinario nella gestione e nel contenimento della pandemia da SARS-CoV-2, contribuendo in modo significativo a ridurre la gravità delle infezioni, in particolare quelle causate dalle varianti Alpha, Beta e Delta (86). Le formulazioni approvate, Comirnaty (Pfizer-BioNTech) e Spikevax (Moderna), utilizzano una sequenza di RNA messaggero modificata che codifica per la proteina Spike del virus (87). Questo mRNA

è racchiuso in nanoparticelle lipidiche, che ne facilitano l'ingresso nelle cellule dove induce una risposta immunitaria sia anticorpale sia cellulare, senza interferire con il DNA dell'ospite (88). Questi vaccini, sono stati somministrati in due dosi, a distanza rispettivamente di 21 giorni per Comirnaty e 28 giorni per Spikevax (89). Gli studi clinici iniziali, hanno evidenziato una robusta attivazione delle risposte (Th1) e (Th2). Le modifiche introdotte sull'mRNA, la stabilizzazione della molecola e le modalità di somministrazione hanno consentito di raggiungere un'efficacia superiore al 90% contro l'infezione da SARS-CoV-2 (90). Con l'emergere di nuove varianti, le aziende produttrici hanno aggiornato la sequenza antigenica: nel 2023–2024 la formulazione è stata adattata alla sottovariante XBB.1.5, mentre per la stagione 2024–2025 è basata sulla variante JN.1, mantenendo un'elevata protezione contro le forme gravi della malattia (91).

1.8.2 Vaccini a subunità

I vaccini a subunità utilizzano come antigeni la proteina Spike (S) o il suo dominio di legame al recettore (RBD, Receptor Binding Domain), responsabile dell'interazione con il recettore ACE2 sulle cellule umane (92). Tra i principali vaccini a subunità basati sul dominio RBD della proteina Spike, troviamo il KBP-COVID-19 di *Kentucky BioProcessing, Inc.* e il vaccino sviluppato da *Anhui Zhifei Longcom Biologic Pharmacy Co., Ltd.* (Anhui, Cina) (93). Un altro importante candidato, è il NVX-CoV2373 di *Novavax*, che utilizza come adiuvante il Matrix-M, una saponina estratta dal *Quillaja saponaria*, capace di potenziare la risposta immunitaria (94). Questo ultimo, è già stato autorizzato dall'OMS, dall'Agenzia Europea per i Farmaci (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense per l'uso durante la pandemia (95). Negli studi clinici di fase III, NVX-CoV2373 ha mostrato un'efficacia media dell'89,5% contro il COVID-19 sintomatico, con ottima tollerabilità e un profilo di sicurezza favorevole. In uno studio clinico, 83 partecipanti hanno ricevuto NVX-CoV2373 con adiuvante Matrix-M e 25 senza adiuvante (96). I risultati hanno evidenziato reazioni avverse locali e sistemiche minime o assenti, con effetti collaterali lievi e transitori (cefalea, malessere, stanchezza). L'aggiunta dell'adiuvante ha determinato una risposta immunitaria di tipo Th1 marcata, indicativa di una protezione più efficace (97). Attualmente (2025), oltre 55 vaccini a subunità proteica si trovano in fase di valutazione preclinica o clinica in diversi Paesi (WHO, 2024) (98). Alcuni, come il SCB-2019 (Clover Biopharmaceuticals) e lo ZF2001 (Anhui Zhifei Longcom), hanno mostrato una buona efficacia contro varianti Omicron e JN.1, soprattutto come booster eterologo dopo vaccini a mRNA o a vettore virale (Xu et al., *Lancet Infect Dis*, 2024; WHO, 2024) (99).

1.8.3 Vaccini contro i virus inattivati

Un altro approccio nella lotta contro SARS-CoV-2, è rappresentato dai vaccini a virus inattivato. In questo caso, le particelle virali vengono coltivate in laboratorio e successivamente inattivate chimicamente, in modo da preservare la struttura conformazionale degli epitopi antigenici più stabili. Questo metodo permette di mantenere intatta la morfologia del virus, stimolando così una risposta immunitaria diretta contro molteplici componenti antigeniche, non soltanto la proteina Spike (100,101). Tra i principali vaccini inattivati in letteratura, sono riportati BBIBP-CorV (Sinopharm) e CoronaVac (Sinovac), entrambi somministrati in due dosi a distanza di poche settimane. Questi vaccini sono stati autorizzati dall'OMS per uso di emergenza e ampiamente distribuiti in Paesi come Cina, Brasile, Cile, Colombia, Perù, Turchia, Emirati Arabi Uniti e Indonesia (102). Gli studi clinici iniziali, hanno mostrato una buona efficacia nel prevenire il COVID-19 sintomatico moderato o grave, con valori compresi tra il 51% e il 79% a seconda della popolazione e del contesto epidemiologico (103,104). Tuttavia, rispetto ai vaccini a mRNA, i vaccini inattivati hanno mostrato una risposta immunitaria meno duratura e una riduzione più rapida dei titoli anticorpali neutralizzanti nel tempo, richiedendo così dosi di richiamo più frequenti. Con l'emergere delle varianti Omicron e JN.1, diversi studi hanno riportato una diminuzione della protezione contro l'infezione, ma una protezione ancora significativa contro le forme più gravi accompagnate dalla necessità di un ricovero ospedaliero, soprattutto nei soggetti che hanno ricevuto un richiamo eterologo con un vaccino a mRNA o a subunità proteica (105,106). Recentemente, la Sinovac ha sviluppato una nuova formulazione aggiornata del CoronaVac specifica per varianti Omicron e JN.1, già in fase 3 di sperimentazione clinica nel 2025. I primi risultati indicano una buona sicurezza e un aumento dei livelli anticorpali neutralizzanti dopo il richiamo, specialmente nei soggetti precedentemente vaccinati o infettati (107).

1.8.4 Vaccini vettoriali virali

Un'altra classe di vaccino sono quelli a vettore virale. Il principio di base di questa tecnologia, si basa, sull'utilizzo della sequenza genetica dell'antigene di interesse: in questo caso la proteina Spike del virus, che viene inserita all'interno di un virus vettore, reso incapace di replicarsi (replication-incompetent) (108). Questo virus, ingegnerizzato in laboratorio, funge da "navetta" che introduce l'informazione genetica nelle cellule dell'ospite, le quali iniziano a produrre l'antigene e a stimolare una risposta immunitaria specifica (109). L'obiettivo è quello di imitare un'infezione naturale, generando una risposta immunitaria più forte e duratura, mediata sia da anticorpi neutralizzanti sia da linfociti T citotossici, che svolgono un ruolo cruciale nella protezione a lungo termine (110). Tra i principali esempi di questa categoria

troviamo: Il vaccino Ad26.COV2.S di *Johnson & Johnson* (New Brunswick, USA), basato su un adenovirus umano di sierotipo 26 e il vaccino ChAdOx1 nCoV-19 (Vaxzevria) di *AstraZeneca* (Cambridge, Regno Unito), che utilizza un adenovirus dello scimpanzé come vettore (111). Tuttavia, l'efficacia di questi vaccini si è dimostrata variabile nel tempo e nei confronti delle nuove varianti di SARS-CoV-2, come Delta e Omicron, a causa delle mutazioni nella proteina Spike che riducono la neutralizzazione anticorpale (112). Per questo motivo, in diversi Paesi si è passati a strategie di vaccinazione eterologa, combinando una prima dose di vaccino virale con un booster a mRNA, al fine di ottenere una risposta immunitaria più ampia e robusta (Munro et al., *Lancet*, 2022; ECDC, 2023) (113). Nel 2024–2025, ulteriori studi hanno confermato che la combinazione di vettore virale più booster mRNA induce una maggiore immunogenicità e una protezione prolungata anche contro le varianti emergenti come JN.1 (114).

1.8.5 Vaccini vivi attenuati

Il loro principio di azione, si basa sull'utilizzo di virus vivi resi non patogeni attraverso passaggi successivi in colture cellulari o modificazioni genetiche controllate. Questi virus attenuati, mantengono tuttavia la capacità di replicarsi in modo limitato nell'organismo, stimolando così una risposta immunitaria completa, sia anticorpale sia cellulare, che mima l'infezione naturale (115). Uno degli aspetti più rilevanti di questa tecnologia è la capacità di attivare i recettori Toll-like (TLR), fondamentali per l'attivazione della risposta immunitaria innata (116). Tra i vantaggi principali di questi vaccini troviamo: sviluppo rapido e potenziale adattabilità a nuove varianti, induzione di una risposta immunitaria ampia e multivalente, capace di riconoscere diversi epitopi virali e somministrazione semplice, spesso per via intranasale o orale, che stimola anche l'immunità mucosale. Tuttavia, esistono importanti criticità e requisiti di sicurezza. Poiché contengono virus vivi, anche se attenuati, essi possono in rari casi propagare infezioni, specialmente nei pazienti immunodepressi o con malattie croniche (118). Attualmente (2025), sono in fase di valutazione preclinica o clinica diversi candidati di questa tipologia, contro SARS-CoV-2, tra cui il vaccino intranasale COVI-VAC (Codagenix/Serum Institute of India), che mira a indurre una forte immunità mucosale, capace di ridurre non solo la malattia, ma anche la trasmissione virale (119).

I primi risultati mostrano un profilo di sicurezza favorevole e una robusta risposta immunitaria locale e sistemica, sebbene l'efficacia reale debba ancora essere confermata in studi su larga scala (120).

1.8.6 Vaccini a particelle simili a virus

Questi vaccini coinvolgono numerose proteine strutturali virali, che aiutano a imitare la conformazione dei virus. Poiché questi, non contengono alcun genoma virale, sono estremamente protetti e completamente non infettivi (121). Un aspetto distintivo, di questa tecnologia, è l'utilizzo di sistemi di espressione eterologhi, come i virus ricombinanti o le cellule vegetali, per produrre le proteine virali. In particolare, l'impiego di *Agrobacterium tumefaciens* (un batterio patogeno delle piante) consente di introdurre i geni delle proteine virali all'interno delle cellule vegetali, che diventano così “fabbriche biologiche” per la produzione su larga scala di particelle simil-virali (122). Per quanto riguarda SARS-CoV-2, ci sono 15 vaccini in studi preclinici. Tra questi, (RBD SARS-CoV-2) HBsAg VLP e VLP derivato dalle piante (*Medicago*) sono stati recentemente arruolati in studi clinici di fase 1 (123). Il vaccino CoVLP/AS03 (*Medicago*–GSK) ha dimostrato un'efficacia del 71% contro l'infezione sintomatica da SARS-CoV-2 e un'elevata tollerabilità negli studi di fase 3 (124). Nel 2024–2025, la ricerca nel campo dei vaccini VLP ha mirato a versioni aggiornate per le varianti Omicron e JN.1, anche in forma booster eterologa intranasale (125).

1.8.7 Vaccini a DNA

Questi vaccini contengono plasmidi di DNA circolare che codificano per uno o più antigeni virali, nel caso di SARS-CoV-2, per la proteina Spike o suoi frammenti. Dopo l'inoculazione, il DNA plasmidico penetra nel nucleo delle cellule ospiti, dove viene trascritto in RNA messaggero(mRNA) e successivamente tradotto nella proteina antigenica (126). Questa proteina viene quindi presentata al sistema immunitario, inducendo una risposta sia anticorpale che cellulare, con un'attivazione significativa dei linfociti T CD4+ e CD8+ (127). Complessivamente, 13 candidati come vaccini a DNA sono in studi preclinici, di cui quattro sono in fase di sviluppo in studi clinici di fase 1/2, che includono INO-4800 (International Vaccine Institute; Inovio Pharmaceuticals), vaccino nCov (Cadila Healthcare Ltd., Ahmedabad, India), AG0301-COVID19 (AnGes, Inc., Osaka, Giappone) e GX-19 (Genexine, Inc., Seongnam-si, Repubblica di Corea) (128). Analogamente, studi preclinici condotti su macachi rhesus hanno dimostrato, che i vaccini a DNA sono in grado di indurre risposte immunitarie umorali e cellulari protettive, con produzione di anticorpi neutralizzanti e memoria immunitaria sostenuta nel tempo (129). Tuttavia, restano necessari ulteriori approfondimenti clinici per confermare la durata della risposta anticorpale e per comprendere meglio il ruolo delle risposte non neutralizzanti nella protezione contro le forme gravi di COVID-19 (130). Nel 2024–2025, nuovi vaccini a DNA, tra cui INO-4802, una versione “pan-coronavirus”, progettata per offrire protezione contro varianti emergenti come JN.1, sono entrati in fase di

sperimentazione clinica avanzata, con risultati preliminari che mostrano ampia cross-reattività immunitaria e un profilo di sicurezza favorevole (131).

1.9. Immunità adattiva mediata dal vaccino per SARS-CoV-2

Gli studi iniziali sui vaccini a mRNA hanno dimostrato un'elevata immunogenicità, correlata alla loro efficacia clinica e alla capacità di indurre una robusta risposta anticorpale di tipo IgG diretta contro il dominio di legame al recettore (RBD) e la subunità S1 della proteina Spike. Già nelle prime fasi di sperimentazione, si è osservato che oltre il 50% dei soggetti vaccinati sviluppava titoli neutralizzanti significativi contro SARS-CoV-2 (132,133). Successivi studi immunologici, hanno evidenziato la persistenza della memoria immunitaria indotta dalla vaccinazione. In particolare, è stato riscontrato un aumento delle cellule B della memoria CD71⁺ (MBC) tra i 3 e i 6 mesi dopo la vaccinazione, nonostante una graduale diminuzione dei livelli sierici di anticorpi anti-S e anti-RBD (134). Queste cellule MBC si è osservata, una reattività crociata nei confronti delle varianti Alpha, Beta e Delta, indicando una protezione robusta contro i diversi lignaggi virali (135). Con l'introduzione dei richiami (booster) sequenziali, la risposta immunitaria è risultata ulteriormente raffinata e potenziata. Recentemente è stato dimostrato che i booster, in particolare quelli aggiornati contro le varianti Omicron e JN.1, favoriscono una selezione di anticorpi di alta affinità, diretti sia verso il sito di legame ACE2 della proteina Spike, sia verso regioni più conservate dell'RBD (anticorpi di tipo 1/4) (136). Questi anticorpi correlano con una maggiore capacità neutralizzante e una migliore copertura contro le varianti emergenti, con una risposta umorale e cellulare robusta (138). Sebbene, le cellule T non possano direttamente neutralizzare il virus o impedirne l'ingresso nelle cellule ospiti, la loro attività contribuisce a limitare la diffusione virale nell'organismo, riducendo così la gravità clinica della malattia e la trasmissibilità del virus (139). Esperimenti condotti su modelli animali (macachi rhesus) hanno mostrato che la variante Omicron riduce parzialmente l'efficacia delle risposte T CD8⁺ specifiche, anche in presenza di livelli moderati di anticorpi neutralizzanti (140). Tuttavia, in letteratura è stato riportato, che la risposta cellulare mediata dalle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ resta in gran parte conservata attraverso le varianti, incluse Omicron e JN.1, conferendo una protezione sostanziale contro le forme gravi della malattia (141). Nel 2025, nuovi studi hanno confermato che l'immunità adattiva indotta dai vaccini a mRNA e proteici rimane duratura e multifattoriale, con memoria immunologica stabile e capacità di risposta rapida in seguito a esposizione o richiamo (142). Tali evidenze sottolineano come la combinazione sinergica di risposte anticorpali e T-cellulari costituisca la base della protezione immunitaria a lungo

termine contro SARS-CoV-2 (143). La risposta immunitaria stimolata, dall'infezione naturale da SARS-CoV-2, anche se simile in molti aspetti a quella vaccinale, è spesso accompagnata da una risposta infiammatoria più intensa e da manifestazioni cliniche che caratterizzano la sindrome COVID-19, a conferma del ruolo cruciale dei vaccini nel prevenire le complicanze immunopatologiche dell'infezione (144).

1.10. Background genetico e risposta immunitaria

Nonostante la vasta ricerca condotta sull'impatto dei polimorfismi genetici sul COVID-19, rimane scarsa la letteratura focalizzata specificamente sui geni infiammatori e sul loro collegamento diretto con la gravità della malattia. Le variazioni genetiche rivestono un ruolo cruciale nella modulazione della risposta infiammatoria, influenzando notevolmente l'andamento della malattia (145). L'immunogenetica, ha come obiettivo, l'analisi della variabilità genetica che regola la risposta immunitaria, influenzando la suscettibilità individuale a malattie infettive e autoimmuni, così come la risposta ai vaccini (146,147). I polimorfismi genetici, variazioni puntiformi della sequenza del DNA presenti nella popolazione con una frequenza superiore all'1%, possono influenzare significativamente la risposta immunitaria sia innata che adattativa (148). Queste varianti genetiche, modulano l'espressione e la funzione di geni cruciali coinvolti nella risposta infiammatoria, nella presentazione dell'antigene e nella produzione di anticorpi neutralizzanti (149). Tra le classi principali di geni coinvolti nella modulazione della risposta immunitaria, vi sono quelli associati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), citochine (IL-6, TNF- α , IL-10), recettori toll-like (TLR), fattori di trascrizione (STAT4, IRF5) e regolatori delle risposte interferon-mediate (150,151). I geni del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), sono tra i principali determinanti genetici della variabilità nella risposta immunitaria ai vaccini anti SARS-CoV-2. Numerosi studi GWAS hanno dimostrato, come varianti specifiche nel locus HLA possano determinare una risposta anticorpale differenziale e influenzare la protezione a lungo termine (152). Inoltre, ricerche recenti hanno identificato alleli, come HLA-DQB1*06:04 associati a risposte anticorpali robuste, mentre altri alleli come HLA-A*03:01 sono stati correlati a risposte anticorpali modulate diversamente, con conseguenze dirette sulla protezione vaccinale e sul rischio di infezioni breakthrough (153,154). La variabilità nella produzione e nell'attività delle citochine, è fortemente influenzata da SNP in geni come IL-6, TNF- α , IL-10 e IFN- γ (150). Tali variazioni possono alterare l'intensità della risposta infiammatoria iniziale, influenzando indirettamente la capacità di generare una risposta vaccinale efficace e duratura. Per esempio, varianti nel gene IL-6 possono modulare il

livello di infiammazione sistemica post-vaccinale, influenzando la risposta anticorpale e la memoria immunologica sviluppata successivamente alla vaccinazione (151).

1.11. Vaccinazione anti SARS-CoV-2 in soggetti con patologie autoimmuni

La vaccinazione anti SARS-CoV-2 nei soggetti affetti da patologie autoimmuni, sia sistemiche (AIS) che organo-specifiche (AIO), rappresenta un'importante sfida clinica, in quanto tali pazienti manifestano frequentemente una risposta immunitaria compromessa o alterata, dovuta alla patologia stessa e alle terapie immunomodulanti impiegate (152). Le patologie autoimmuni sistemiche, come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), l'Artrite Reumatoide (AR) e la Sclerosi Sistemica, e le patologie autoimmuni organo-specifiche, come la tiroidite autoimmune, il diabete mellito di tipo 1 e la sclerosi multipla, sono caratterizzate da alterazioni della risposta immunitaria che portano a infiammazione cronica e produzione anomala di autoanticorpi o cellule autoreattive. È stato osservato, che diversi pazienti possono sviluppare autoanticorpi nell'infezione da COVID-19 del corso della malattia (153). Tra una coorte di pazienti con COVID19 potenzialmente letale, il 10,2% è risultato avere autoanticorpi di tipo IgG agli IFN di tipo I, IFN- α 2 e IFN- ω (154). La presenza di autoanticorpi di tipo III-anti-IFN- λ 3 in pazienti con COVID-19 grave è stata osservata attraverso una tecnica di sequenziamento, chiamata indicizzazione molecolare delle proteine per autoassemblaggio (MIPSA) (155). Un altro studio, ha rivelato che il 25% dei pazienti affetti da COVID-19, aveva anticorpi antinucleari (ANA) a vari titoli (156). Recentemente, è stato riportato in letteratura che, il 44% dei pazienti con sintomi di PASC (Post-Acute Sequela e of SARS-CoV-2 infection) ha manifestato autoanticorpi, inclusi gli ANA Jo-1, Ro/SS-A, La/SS-B, U1-snRNP, P1 e anti-IFN- α 2, circa 2-3 mesi dopo l'insorgenza iniziale dei sintomi (157). Anche se non si può escludere, la possibilità di autoanticorpi preesistenti in alcuni pazienti prima dello sviluppo del COVID-19, uno studio del 2022 sottolinea che pochi dei pazienti nei quali si sono rilevati autoanticorpi all'inizio del corso della malattia, avevano prove cliniche di malattie autoimmuni prima del COVID-19, suggerendo un processo autoimmune subclinico preesistente che verosimilmente viene accentuato dal COVID-19 (158). Nei pazienti con patologie autoimmuni, sia sistemiche che organo-specifiche, è stata riportata una risposta immunitaria ai vaccini anti SARS-CoV-2 ridotta, sia per quanto riguarda la produzione anticorpale, sia per la risposta cellulare T-mediata. Tali condizioni possono compromettere significativamente la risposta ai vaccini e aumentare la vulnerabilità alle infezioni (159,160). Analogamente, è stato osservato che terapie immunosoppressive o immunomodulanti, come metotrexato, rituximab, micofenolato mofetile e farmaci biologici, diminuiscono significativamente la risposta

anticorpale rispetto ai soggetti vaccinati sani (161,162). La variabilità, della risposta immunitaria ai vaccini anti SARS-CoV-2, sia in soggetti sani che in pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche, è strettamente influenzata dal background genetico individuale. Studi genome-wide (GWAS), condotti su ampie coorti di soggetti vaccinati, hanno chiaramente dimostrato che alcune varianti HLA di classe II, sono fortemente associate a risposte immunitarie differenziali (165). Oltre ai geni HLA, anche i polimorfismi in geni associati alle citochine, mostrano una significativa influenza sulla risposta vaccinale (166). Un nostro studio (167), condotto analizzando 16 varianti genetiche di citochine come IL-1R1, IL-6, IL-4 e TNF- α in una coorte di operatori sanitari, ha evidenziato che varianti specifiche, come il genotipo GG del gene IL-6 (rs1800795), erano significativamente associate a livelli più alti e duraturi di anticorpi neutralizzanti post-vaccinazione. Lo stesso studio ha identificato anche un ruolo dell'età, mostrando che soggetti più giovani con queste specifiche varianti genetiche producevano una risposta anticorpale ancora più forte e prolungata rispetto ai soggetti più anziani (167). Dal punto di vista della sicurezza e degli eventi avversi post-vaccinali, il background genetico svolge un ruolo rilevante anche nell'insorgenza di complicanze autoimmuni rare, come trombocitopenia trombotica immuno-mediata (VITT) e miocardite autoimmune post-vaccinale (168). Varianti genetiche, in geni coinvolti nella regolazione della risposta infiammatoria e nella produzione di interferon, potrebbero predisporre alcuni individui ad un maggior rischio di sviluppare tali eventi avversi, sebbene ulteriori studi siano necessari per confermare definitivamente questa associazione genetica (169, 170).

2. Scopo della Ricerca

Lo scopo principale dello studio, è stato, la valutazione dell'eventuale correlazione fra background genetico di citochine coinvolte nell'immunità innata e adattativa e la risposta alla somministrazione del vaccino anti SARS-CoV-2, sia in termini di risposta immune anticorpale che cellulo-mediata. Inoltre, la linea di ricerca è stata ulteriormente sviluppata, sulla stessa popolazione, valutando una eventuale associazione di polimorfismi (SNP) localizzati sul gene IFN- λ 3 ed IFN- λ 4, per cercare di chiarire se esiste una correlazione fra polimorfismi genici che regolano la produzione di IFN-III con la suscettibilità al COVID-19 e con l'efficacia della risposta ai vaccini, sia in termini di titoli anticorpali sia in termini di risposta cellulare in vitro ai peptidi della proteina spike di SARS-CoV-2.

3. Materiali e Metodi

3.1. Popolazione analizzata

I campioni ematici sono stati raccolti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Giovanni Giammanco, presso il Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza “G. D’Alessandro” (PROSAMI) dell’Università di Palermo. I campioni di DNA analizzati in questo studio, sono stati ottenuti da 122 soggetti sani tra il personale sanitario del “Policlinico P. Giaccone di Palermo, vaccinati con vaccini anti- SARS-CoV-2, 56 maschi e 66 femmine di età media compresa fra 26 e 78 anni, tutti negativi al tampone rapido al momento della raccolta dei campioni. Nella (Tabella.3) è descritta la popolazione studiata analizzata per sesso ed età media.

Popolazione analizzata	Sesso	Età media
Soggetti vaccinati anti-Sars-Cov-2	M: 56 F:66	M: 52,2 F: 47,1
	Totale: 122	Totale: 49,5

Tabella 3. Popolazione analizzata nello studio.

Più recentemente, alcuni dei soggetti sani che hanno partecipato allo studio precedente (50 soggetti, 25 maschi e 25 femmine, età media 52 anni), sono stati richiamati per sottoporsi ad un ulteriore prelievo di campioni di sangue da cui sono state ottenute le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) che sono state utilizzate per i test di stimolazione in vitro con peptidi della proteina spike del virus SARS-CoV-2. Inoltre, a questi soggetti è stato sottoposto, un breve questionario. Dalle risposte ottenute dal questionario, abbiamo osservato che, undici soggetti erano fumatori e solo nove facevano consumo di alcool abitualmente. Per quanto riguarda le patologie basali, otto soffrivano di ipertensione arteriosa. Cinque di questi soggetti erano affetti da patologie autoimmuni, (3 tiroidite di Hashimoto, 1 morbo di Graves e 1 morbo di Crohn). Tutti quelli appartenenti a questa categoria attualmente assumono farmaci per la terapia di mantenimento contro queste patologie, che era stata mantenuta anche durante la somministrazione del vaccino anti SARS-CoV-2. Nessuno di loro sembra aver mai riportato patologie renali, metaboliche, respiratorie o allergiche, solo uno di loro, affetto da tiroidite di hashimoto, ha avuto anche una patologia neoplastica in passato. Tutti questi soggetti hanno sviluppato queste patologie prima della somministrazione del vaccino per COVID-19 (Tabella 4).

Numero soggetti	50
Età media	52
Maschi	25
Femmine	25
Fumatori	11
Consumo di alcol	9
Patologie Cardio Vascolari	8
Ipertensione	8
Patologie Metaboliche	0
Patologie Renali	0
Patologie Respiratorie	0
Patologie Neoplastiche	1
Patologie Allergiche	1
Patologie Autoimmuni*	5

Tabella 4. Caratteristiche generali della Coorte Arruolata. 50 soggetti reclutati per gli esperimenti di stimolazione cellulare in vitro. *Tiroidite di Hashimoto:3; Morbo di Graves:1; Morbo di Crohn:1

Per quanto riguarda il tipo di vaccino somministrato, per le prime 2 dosi come precedente osservato, avevano ricevuto tutti il Comirnaty BNT162b2 di Pfizer-BioNTech, solo due di loro non hanno proseguito con il richiamo vaccinale. 41 soggetti hanno fatto la terza dose, di cui 33 a proseguito sempre con Pfizer-BioNTech, 15 con Moderna e 2 con Johnson&Johnson, solo 6 di loro, hanno fatto un ulteriore richiamo di vaccinazione ricevendo Moderna sia alla terza che alla quarta dose. Inoltre, dei 50 soggetti reclutati, 22 hanno avuto il COVID- 19 almeno 3 mesi dopo la vaccinazione con la terza dose, mentre per 19 di essi non è stato possibile stabilire se hanno contratto una eventuale infezione prima o dopo la vaccinazione (Tabella.5).

		N. soggetti
Tipo di vaccino somministrato	Pfizer-BioNTech	33
	Moderna	15
	Johnson-Johnson	2
	AstraZeneca	1
Dosi di Vaccino ricevute	Due	2
	Tre	41
	Quattro	8
Eventuale infezione da SARS-CoV2	Accertata	26
	Non Riconosciuta	19
	No infezione	6
	Ricovero ospedaliero	0
CoViD-19 dopo la vaccinazione	<1 mese	1
	<3 mesi	5
	>3 mesi	22
Effetti indesiderati dopo la vaccinazione	febbre	13
	Febbre e dolori articolari	11
Infezione dopo la vaccinazione	Dopo più di tre mesi	22
	Entro due mesi	1
	Entro tre mesi	3
	Entro un mese	1

Tabella 5. Storia Vaccinale dei 50 soggetti reclutati per i test in vitro

3.2. Estrazione del DNA genomico tramite sistema automatico con biglie magnetiche

I campioni di sangue periferico, resi incoagulabili con EDTA sono stati congelati a -20°C per favorire la lisi dei globuli rossi. Dopo opportuno scongelamento il DNA è stato estratto con un metodo di estrazione automatizzato, utilizzando il sistema “MagNA Pure”24 System (Roche). Questo sistema permette, l’isolamento dell’acido nucleico molto rapidamente, può estrarre un massimo di 24 campioni a seduta in poco più di un’ora. Lo strumento permette di scegliere un programma di estrazione, dove si può impostare il volume iniziale di caricamento del campione e quello finale di eluizione. È stato scelto il protocollo “hgDNA 1000”, che viene utilizzato per estrarre DNA genomico, con un volume di partenza 500 µL dove la concentrazione di cellule è circa 5×10^6 e volume finale di eluizione 100 µL. I campioni sono stati dispensati su dei supporti in plastica detti “purification cartridge” che contengono otto alloggiamenti. La (Figura. 4) illustra la schermata di caricamento dei campioni, dei reagenti e del materiale consumabile per procedere all’estrazione del DNA.

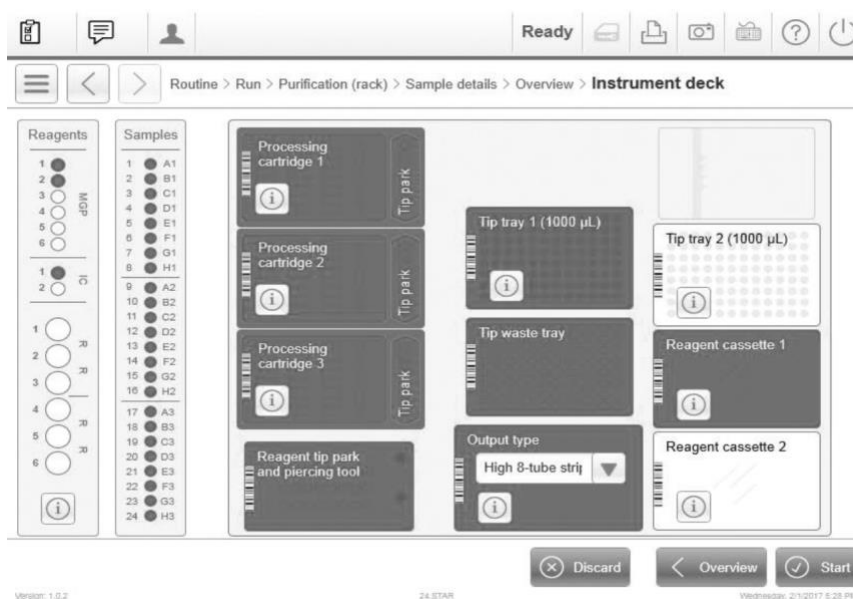


Figura 4. Schermata di caricamento del sistema “MagNA Pure”24 System (Roche).

Principio della metodica:

È un metodo di estrazione in fase solida che utilizza biglie magnetiche. Dopo la fase di lisi e la digestione con proteinasi K, sulla soluzione ottenuta vengono dispensate piccole sfere magnetiche rivestite con resina di silice.

La silice permette il legame dell’acido nucleico alle sfere. In seguito, si attiva una piastra magnetica che attira e trattiene le biglie caricate con il DNA sul fondo della colonna. Questo

passaggio permette, un'agevole aspirazione del surnatante contenente i contaminanti da scartare. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a vari lavaggi rapidi, per eliminare ulteriori contaminanti e sali. Infine, il magnete viene allontanato e l'acido nucleico viene eluito con soluzioni tamponate (tris-EDTA), per essere purificato e separato dalle sfere che restano all'interno della colonnina. L'intero processo di estrazione per ottenere il DNA genomico con questa metodica è illustrato nella (Figura. 5).

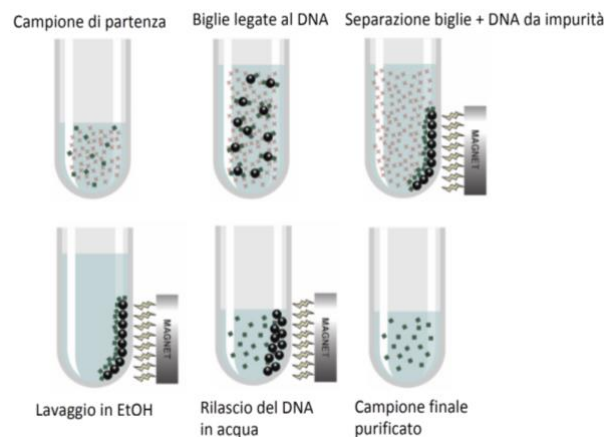


Figura 5. Principio del metodo di estrazione con biglie magnetiche.

3.3. Tipizzazione degli SNP

La tipizzazione dei polimorfismi oggetto del nostro studio è stata effettuata utilizzando la metodica KASPar, sviluppata da K Bioscience. I polimorfismi presi in esame sono descritti schematicamente in (Tabella 6).

GENE	SNP	Localizzazione cromosomica	Allele Maggiore	Allele Minore	Effetto biologico prevalente del polimorfismo
IFNL3 (IL28B)	rs12980275	19q13.2	A	G	L'allele A è correlato ad una maggiore espressione di Interferon λ 3
	rs8099917	19q13	T	G	L'allele T è correlato ad una maggiore espressione di Interferon λ 3
IFNL4	rs11322783	19q13.2-13.13	Δ G	TT	L'allele wild type Δ G consente la sintesi di IFN λ 4 l'allele TT inserisce un frameshift che abolisce la sintesi dell'IFN λ 4
	rs12979860	19q13.2	C	T	La presenza dell'allele C è associata ad una maggiore espressione di IFN λ

Tabella 6. Caratteristiche degli SNP analizzati.

Il saggio consiste in un sistema di genotipizzazione di tipo end-point, per amplificazione allele specifica, con sistema di rilevazione fluorescente. Il meccanismo d'azione del test prevede l'utilizzo di due primers "forward" allele specifici, che presentano nella porzione terminale una sequenza unica non marcata al 5', un primer comune "reverse" non marcato. Due piccoli oligonucleotidi complementari alle regioni 5' dei primer "forward" allele-specifici, marcati con due diversi fluorocromi (FAM e VIC). Due piccoli oligonucleotidi marcati con quenchers alle estremità 3'. In fase iniziale, l'appaiamento di queste sequenze con gli oligonucleotidi marcati

con i fluorocromi FAM e VIC, garantisce che tutto il segnale fluorescente rimanga spento fino a quando necessario come mostrato in (Figura 6).

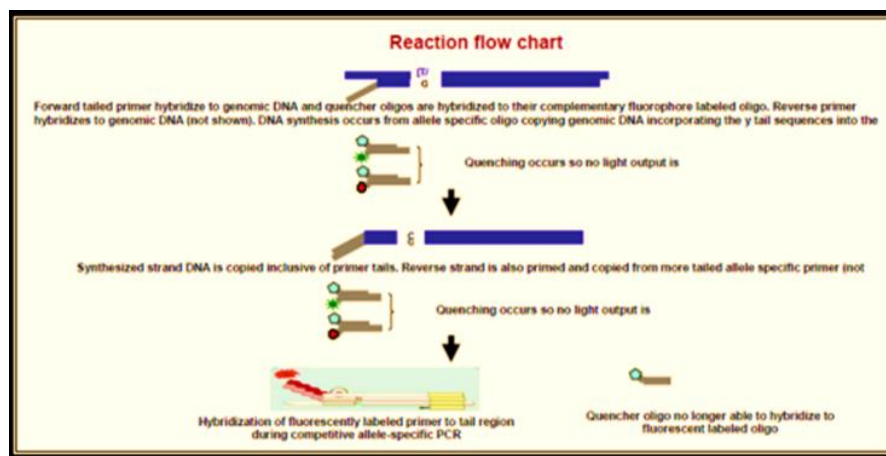


Figura 6. Kaspar flow chart.

Con l'inizio delle fasi di amplificazione, il primer allele-specifico si lega alla sua regione complementare direttamente a monte del polimorfismo, con l'estremità 3' posizionata sul nucleotide dello SNP. Man mano che la reazione procede, i primers allele specifici, marcati con i due differenti fluorocromi rimarranno parte delle nuove molecole prodotte. Con il procedere della PCR, i piccoli oligonucleotidi complementari alle sequenze uniche terminali delle regioni 5' presenti sui primer "forward" allele-specifici, per effetto dell'aumento competitivo dei nuovi ampliconi, si appaieranno preferibilmente a queste ultime piuttosto che agli oligonucleotidi marcati con quencher. Questo meccanismo garantirà l'aumento dell'emissione di fluorescenza in modo proporzionale all'aumento del numero di ampliconi prodotti durante la reazione di amplificazione. Inoltre, la rilevazione della fluorescenza viene registrata sullo strumento real-time PCR Abi Prism 7300; Applied Biosystem, USA, sia prima che dopo la reazione di amplificazione, per garantire la normalizzazione di eventuali segnali di background. Quindi, all'end point l'emissione di fluorescenza dei due fluorocromi (FAM e VIC) viene plottata su due assi e viene determinato il genotipo, campione per campione, sulla base del rilascio della fluorescenza di uno solo dei due fluorocromi (campioni omozigoti) o di entrambi (campioni eterozigoti). L'analisi dell'intensità di ogni fluorescenza (allele-specifica) viene elaborata con software 7300 system SDS, vs 1.3 (Applied Biosystem). Il software realizza anche dei clusters genotipici, raggruppando sul plot i campioni sulla base dei valori di emissione di fluorescenza.

La genotipizzazione, quindi, deve essere effettuata su almeno 24 campioni di DNA al fine di garantire genotipi sufficienti a dimostrare il clustering. È consigliabile, che almeno un

campione di acqua venga inserito in uno dei 96 pozzetti di ogni piastra, come controllo negativo. In particolare, questa tecnica prevede che ogni campione da tipizzare venga amplificato, per ogni SNP, utilizzando 1 µl di DNA template (corrispondente ad una concentrazione compresa tra 50-120 ng/µl) a cui viene aggiunta una miscela di reazione la KASP Reaction Mix 2X contenente (Tabella. 7):

Componenti:	KASP Mix
KASP Reaction Mix 2X	4 µl
Assay Mix	0,11 µl
H2O	2,69 µl
Volume totale	7 µl

Tabella 7. Reagenti che compongono la KASP Mix di genotipizzazione.

Tutti i componenti, opportunamente miscelati, necessari per la reazione di amplificazione: MgCl₂ 1.8mM, dNTP, Taq polimerasi, ROX, oligonucleotidi marcati con fluorocromi descritti, in buffer 2X. Il ROX rappresenta un fluorocromo passivo che normalizza le emissioni di fluorescenza di FAM e VIC per ciascun pozzetto, annullando, in tal modo, la variabile volume del liquido. Per quanto riguarda l'Assay mix, questa è composta dalla miscela dei tre oligonucleotidi (due allele-specifici "forward" e uno comune "reverse") non marcati, combinati in opportune proporzioni. Quindi, successivamente alla lettura della fluorescenza iniziale a 4°C nello strumento real-time ABI Prism 7300 (Applied Biosystem, USA), le reazioni di amplificazione sono state effettuate su termociclatori standard 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) o Master Cycler Gradient (Eppendorf, Germany), utilizzando il seguente programma riportato in (Figura. 7).

Step	Temperatura	Tempo
1	94°C	10 minuti
2	94°C	1 minuto
3	55°C	30 secondi
4	72°C	30 secondi
Ripetere step 2 – 3 – 4 (x 40 cicli)		
5	72°C	7 minuti
6	4°C	∞

Figura 7. Protocollo di amplificazione INFλ3/4.

Infine, la lettura delle fluorescenze finali per ogni pozzetto della piastra è stata effettuata mediante lo strumento real-time ABI Prism 7300 (Applied Biosystem, USA), alla temperatura

di 4°C. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione di questi fluorocromi sono riportati nella (Tabella. 8).

	Eccitazione	Emissione
FAM	485(nm)	520(nm)
VIC	520(nm)	570(nm)
ROX	575(nm)	610(nm)

Tabella 8. Valori di eccitazione e di emissione per il Fluorocromi utilizzati in KASPAR.

Il software SDS vs.1.3 (Applied Biosystem, USA) elabora i dati, riporta l'intensità di fluorescenza dei fluorocromi FAM e VIC sugli assi X e Y, rispettivamente, realizzando clusters di genotipi (Figura .8). Dall'osservazione della figura dimostrativa (Figura. 8) possiamo notare che i campioni di genotipi identificati in rosso, posizionati in basso, sono omozigoti per l'allele VIC (elevata intensità di fluorescenza per VIC e bassa per FAM), quelli contrassegnati in blu sono omozigoti per l'allele FAM (elevata intensità di fluorescenza per FAM e bassa per VIC), mentre quelli contrassegnati in verde sono eterozigoti (fluorescenza intermedia per entrambi i fluorocromi).

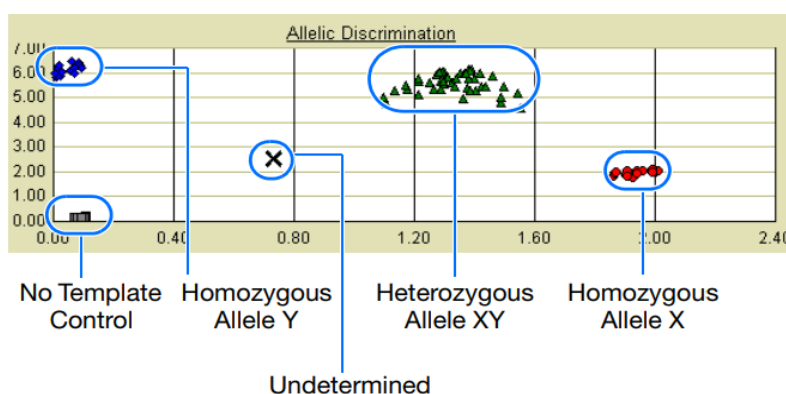


Figura 8. Allelic discrimination plot elaborato da SDS software versione 1.3.

3.4. Metodo di rilevazione SARS-CoV-2 S1/S2 IgG

I sieri dalla popolazione studio sono stati raccolti a 31 e a 105 giorni dopo la seconda dose di vaccinazione con Pfizer. Tutti i campioni sono stati analizzati con l'ausilio del sistema in automazione LIAISON, utilizzando il kit SARS-CoV-2 S1/S2 IgG.

Principio del metodo:

Il test sfrutta la tecnologia della chemiluminescenza (CLA), in un saggio immunologico per la determinazione quantitativa di anticorpi specifici di classe IgG anti-S1 e anti-S2 in campioni di siero o plasma umano. Gli antigeni specifici ricombinati S1 e S2 sono utilizzati per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) e anticorpi monoclonali di topo anti-IgG umane legati a

un derivato dell'isoluminolo (coniugato anticorpo-isoluminolo). Nella (Tabella.9) sono descritti i materiali forniti nel kit per la rilevazione degli anticorpi.

Particelle magnetiche	Sono rivestite con antigeni ricombinanti biotinilati S1 e S2 (ottenuti in cellule di mammifero), BSA (sieroalbumina bovina) biotinilata, streptavidina, BSA, tampone fosfato, <0,1% sodio azide.
Calibratore 1	Può essere siero o plasma umano contenente bassi livelli di IgG anti-SARS-CoV-2, stabilizzati in tampone TRIS, 0,2% ProClin 300, conservanti in un colorante giallo inerte. La sua concentrazione (AU/mL) è tarata contro una preparazione anticorpale realizzata internamente.
Calibratore 2	Può essere siero o plasma umano contenente bassi livelli di IgG anti-SARS-CoV-2, stabilizzati in tampone TRIS, 0,2% ProClin 300, conservanti in un colorante giallo inerte. La sua concentrazione (AU/mL) è tarata contro una preparazione anticorpale realizzata internamente.
Diluente dei campioni	Contiene SA, tampone fosfato, detergente, EDTA, 0,2% ProClin 300, siero ovino, conservanti.
Coniugato	E'costituito da IgG monoclonali di topo anti-IgG umane coniugati con un derivato dell'isoluminolo, BSA, tampone fosfato, 0,2% ProClin 300, conservanti e un colorante blu inerte.
Controllo negativo	Siero umano non reattivo per anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 S1/S2, 0,2% ProClin 300.
Controllo positivo	Siero/plasma umano reattivo per anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 S1/S2, 0,2% ProClin 300.

Tabella 9. Materiali forniti nel kit LIAISON per la rilevazione degli anticorpi SARS-CoV-2 S1/S2 IgG.

Durante la prima incubazione, gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 presenti nei calibratori, nei campioni o nei controlli si legano alla fase solida attraverso gli antigeni ricombinanti S1 e S2. Durante la seconda incubazione, l'anticorpo coniugato reagisce con le IgG anti-SARS-CoV-2 già legate alla fase solida. Dopo ciascuna incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante un ciclo di lavaggio. In seguito, vengono aggiunti i reagenti starter che inducono una reazione di chemiluminescenza con andamento di tipo “flash”. Il segnale luminoso, e quindi la quantità di coniugato anticorpo-isoluminolo, è misurato da un fotomoltiplicatore in unità relative di luce (RLU, relative light unit) ed è indicativo della concentrazione di IgG anti-SARS-CoV-2 presente nei calibratori, nei campioni o nei controlli.

Interpretazione dei risultati:

L'analizzatore del sistema LIAISON, calcola automaticamente le concentrazioni di anticorpi IgG anti SARS-CoV-2 S1/S2 espresse in unità arbitrarie (AU/mL), l'intervallo del dosaggio è fino a 400 AU/mL. I campioni contenenti concentrazioni di anticorpo superiori a quest'intervallo, possono essere pre-diluiti mediante la funzione “dilute” dello strumento e possono essere nuovamente dosati (il fattore di diluizione consigliato è 1:10). I risultati saranno quindi moltiplicati automaticamente per il fattore di diluizione per ottenere i livelli anticorpali dei campioni non diluiti. L'interpretazione del risultato è riassunto nella (Tabella. 10).

AU/mL	Risultati	Regole di ripetizione del test e interpretazione
<12,0	Negativo	Non è necessario ripetere il test. Un risultato negativo può indicare l'assenza o un livello molto basso di anticorpi IgG diretti contro il patogeno. Il test potrebbe fornire un risultato negativo nei pazienti infetti se eseguito durante il periodo di incubazione e negli stadi precoci della malattia.
$12,0 \leq x < 15,0$	Dubbio	E' necessario ripetere il test sullo stesso campione in duplicato. I campioni che ottengono almeno 2 risultati su 3 uguali o superiori a 15,0 AU/mL devono essere classificati positivi. I campioni che ottengono almeno 2 risultati su 3 inferiori a 12,0 AU/mL devono essere classificati negativi. Occorre prelevare e dosare un secondo campione una o due settimane più tardi se il risultato è ripetutamente dubbio.
$\geq 15,0$	Positivo	Ripetizione del test non necessaria. Un risultato positivo indica generalmente l'esposizione del soggetto al patogeno.

Tabella 10. Interpretazione del risultato del test SARS-CoV-2 S1/S2 IgG.

Il test può essere considerato come ausilio nella diagnosi di infezione da COVID-19 e consente di analizzare lo stato immunitario di pazienti infettati e vaccinati, fornendo un'indicazione della presenza di anticorpi IgG neutralizzanti diretti contro il SARS-CoV-2. I risultati di questo test non devono costituire l'unica base per diagnosticare o escludere l'infezione o per avere informazioni sul suo stato.

3.5. Isolamento PBMCs, coltura e stimolazione antigenica, marcatura intracellulare e analisi citofluorimetrica

I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti da soggetti vaccinati per Sars-CoV-2, attraverso venipuntura e raccolti in provette contenenti acido etilen-diamino-tetracetico (EDTA).

Isolamento delle PBMCs:

Il sangue venoso è stato diluito in rapporto 1:2 con PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,4, senza $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) e centrifugato su un gradiente di Ficoll (Lympholyte per separazione cellulare umana, Cederlane, Canada) in una provetta conica di polistirene da 15 mL per 20 minuti a $770 \times g$ a temperatura ambiente (RT). Successivamente, le PBMCs sono state accuratamente aspirate dall'interfaccia plasma-Ficoll e lavate due volte (a $500 \times g$ per 5 minuti) con terreno RPMI 1640 fresco (con un supplemento di 20 mM HEPES, 100 U/mL penicillina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin). Infine, le PBMCs sono state risospese in 1 mL di RPMI completo (contenente 10% di FCS inattivato e 2 mM L-glutamina) in una provetta conica da 15 mL e contate con Trypan Blue per valutare la vitalità (> 95 %).

Coltura e stimolazione antigenica:

Le PBMCs isolate dalla popolazione studiata, sono state coltivate con terreno TexMACS™ o RPMI-1640 + 5 % siero umano +BSA/FBS) in piastre da 24 pozzetti a una densità di ~40.000 cellule. Per ciascun campione sono state allestite le seguenti condizioni sperimentali:

- un controllo negativo contenente cellule non stimulate;
- un controllo positivo con cellule stimulate con **CytoStim™ (Miltenyi Biotec)**, un attivatore policlonale TCR/MHC alla concentrazione 200 µL per ~10⁸ cellule;
- tre controlli, stimolati con peptidi della proteina Spike di SarS-CoV-2 (PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S,S1,S+ (Miltenyi Biotec) alla concentrazione 0,6 nmol ≈ 1 µg/mL), (Miltenyi Biotec), dispensando un singolo peptide per controllo; le caratteristiche per ogni peptide sono illustrate nella (Tabella.11).

Dopo incubazione di 1h a 37C al 5% di CO₂, è stata aggiunta a tutte le condizioni sperimentali Monensina a 10 µg/mL (BioLegend) come bloccante del Golgi e successivamente la piastra è stata incubata per 18/24h a 37C al 5% di CO₂.

Marcatura e preparazione per citofluorimetria:

Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state raccolte e suddivise in tre provette distinte: una destinata al controllo positivo, una al controllo negativo e una contenente le cellule stimulate con i peptidi della proteina Spike. Dopo due lavaggi con PBS e successiva centrifugazione a 1600rpmx5 min, le PBMCs sono state marcate con il kit Zombie NIR Fixable Viability (BioLegend 423106) per la valutazione della vitalità cellulare e incubate con anticorpi monoclonali (mAb) specifici per molecole di superficie CD3, CD4 e CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). Dopo il rilevamento delle molecole di superficie, le cellule sono state fissate e permeabilizzate utilizzando Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec) e successivamente, incubate con (mAb) diretti contro TNF- α , INF γ e IL-2 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). La scelta dei reagenti della stessa azienda è stata fatta per garantire la standardizzazione analitica e facilitare la comparabilità dei risultati. L'acquisizione citofluorimetrica delle PBMCs marcate è stata effettuata utilizzando il citofluorimetro FACS Lyric (BD Biosciences), acquisendo un minimo di 200.000 eventi totali per ciascun campione nel gate linfocitario (basato su FSC/SSC). Infine, l'analisi è stata eseguita con il software FlowJo (Treestar Inc., Ashland, OR). I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule citochina-positive (TNF- α ⁺INF- γ ⁺IL-2⁺) rispetto al totale delle cellule T CD4⁺, CD8⁺.

Prodotto	Regione coperta	Formato e peptidi	Uso principale
Prot_S	Proteina Spike intera (aa 5–1273, ceppo Wuhan)	Pool di peptidi 15-mer con overlap 11 aa	Stimolazione globale CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , risposta T su tutta la Spike
Prot_S1	Solo subunità S1(include il RBD, dominio di legame ad ACE2)	Pool di peptidi 15-mer con overlap 11 aa	Studi focalizzati sulla risposta immunitaria al dominio S1/RBD
Prot_S+	Stessa copertura del Prot_S (Spike intera, ceppo WT)	Pool di peptidi 15-mer/11 aa in formulazione standardizzata per stimolare ~1×10 ⁶ cellule	Esperimenti su larga scala o standardizzati (es. studi clinici, validazioni)

Tabella11. Tabella comparativa PepTivator SARS-CoV-2 Spike

3.6. Statistica

Sono state calcolate la media $\pm$ deviazione standard e la mediana delle variabili continue (titolo anticorpale ed età dei soggetti) e le differenze significative fra i differenti gruppi e sottogruppi sono state analizzate tramite l'analisi della varianza ed il test t di Student. Le frequenze alleliche e genotipiche dei differenti polimorfismi genici sono state valutate in base alla conta dei geni. Preliminarmente, è stata analizzata la concordanza tra le frequenze genotipiche osservate e attese ed il rispetto dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, con il test di Pearson. Le differenze significative nelle distribuzioni genotipiche tra i gruppi sono state calcolate utilizzando il test esatto di Fisher. Sono stati applicati modelli di regressione logistica multipla utilizzando modelli codominanti (eterozigoti contro omozigoti alleli maggiori più omozigoti alleli minori) dominanti (omozigoti alleli maggiori più omozigoti alleli minori rispetto a omozigoti alleli maggiori più omozigoti alleli minori) e recessivi (omozigoti alleli maggiori più eterozigoti contro alleli minori) di ereditarietà ed aggiustando i risultati per età e sesso. Sono stati calcolati i valori di odds ratio (OR) e degli intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) ed un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando la versione 3.06 del software GraphPad InStat (GraphPad, San Diego California USA) e gli strumenti di analisi statistica on-line dedicati alla valutazione dell'associazione degli SNP con le patologie in presenza di altre varianti biologiche, genetiche e cliniche (<https://www.snpstats.net/start.htm>).

4. Risultati

4.1. Associazione dei genotipi degli SNP di IL28B ed IFN λ 4 con i livelli dei titoli anticorpali al day 31 e 105 dalla seconda dose di vaccino

Come già riportato in pubblicazioni precedenti i polimorfismi di alcune citochine influenzano i livelli dei titoli anticorpali indotti dalla vaccinazione anti SARS-CoV-2 (174). Abbiamo quindi valutato se anche i polimorfismi dei geni che codificano per IFN λ 3 e 4 potessero svolgere lo stesso ruolo. Come precedentemente indicato, l'analisi statistica dei titoli anticorpali di 83 soggetti sani trattati con due dosi di vaccino a RNA ricombinante contro il virus SARS-CoV-2, misurati a 31 e 105 giorni dopo la somministrazione della seconda dose ha dimostrato una diminuzione dei titoli fra il giorno 31 ed il giorno 105. La popolazione studiata è stata classificata in due gruppi, a seconda che i loro titoli anticorpali fossero superiori o inferiori alla mediana dei titoli rilevati al giorno 31. 31 giorni dopo la vaccinazione, i dati mostrano una tendenza verso un incremento dei titoli anticorpali maggiore nei portatori del genotipo eterozigote A/G di IL28B rs12980275, con un OR = 5.70 (95% CI: 0.97–33.60; p = 0.083) rispetto agli omozigoti A/A o G/G. Il risultato, anche se non significativo suggerisce un effetto favorevole di questo genotipo sulla risposta iniziale al vaccino. Per quanto riguarda il polimorfismo IFNL4 rs11322783, i soggetti TT/TT mostrano una probabilità significativamente maggiore di avere titoli superiori alla mediana (p = 0.026), mentre gli eterozigoti TT/delG presentano un'associazione inversa (OR = 0.17; p = 0.0085) (Tabella.12).

SNP	Genotipo	<Mediana	≥Mediana	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	6 (66.7%)	10 (33.3%)	4.00 (0.82-19.42)	0.076
	A/G	2 (22.2%)	19 (63.3%)	5.70 (0.97-33.60)	0.083
	G/G	1 (11.1%)	1 (3.3%)	0.28 (0.02-4.92)	0.39
IL28B rs8099917 G/T	T/T	3 (33.3%)	8 (26.7%)	1.38 (0.28-6.84)	0.7
	G/T	5 (55.6%)	20 (66.7%)	1.50 (0.29-7.81)	0.82
	G/G	1 (11.1%)	2 (6.7%)	1.60 (0.35-7.30)	0.55
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	1 (11.1%)	15 (50%)	1.10 (0.01-3.13)	0.026
	TT/delG	6 (66.7%)	15 (50%)	0.17 (0.02-1.56)	0.0085
	delG/delG	2 (22.2%)	0 (0%)	—	—
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	3 (33.3%)	7 (23.3%)	1.64 (0.32-8.33)	0.55
	C/T	4 (44.4%)	19 (63.3%)	2.04 (0.36-11.48)	0.6
	T/T	2 (22.2%)	4 (13.3%)	0.86 (0.10-7.51)	0.53

Tabella 12. Associazione dei genotipi degli SNP di IL28B ed IFN λ 4 con i livelli dei titoli anticorpali (<Mediana o ≥Mediana) al day 31 dalla seconda dose di vaccino

Questo trend è diventato più evidente dopo 105 giorni dalla seconda dose. Il genotipo A/G di IL28B rs12980275 è infatti significativamente associato a titoli anticorpali più alti (OR = 7.04; 95% CI: 1.52–32.64; p = 0.026), mentre gli omozigoti A/A mostrano una probabilità inferiore di mantenere titoli elevati (OR = 0.23; 95% CI: 0.005–0.84; p = 0.0073).

Anche per il polimorfismo IFNL4 rs11322783, i soggetti TT/TT presentano un'associazione significativa con titoli superiori alla mediana (OR = 6.23; 95% CI: 1.52–25.50; p = 0.0112),

mentre gli eterozigoti TT/delG mostrano un effetto opposto (OR = 0.18; 95% CI: 0.04–0.75; p = 0.015) (Tabella.13).

SNP	Genotipo	<Mediana	≥Mediana	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	13 (59.1%)	3 (17.6%)	0.23 (0.005-0.84)	0.0073
	A/G	8 (36.4%)	13 (76.5%)	7.04 (1.52-32.64)	0.026
	G/G	1 (4.5%)	1 (5.9%)	4.33 (0.21-90.85)	0.85
IL28B rs8099917 G/T	T/T	6 (27.3%)	5 (29.4%)	1.01 (0.22-3.66)	0.88
	G/T	14 (63.6%)	11 (64.7%)	0.94 (0.23-3.92)	0.93
	G/G	2 (9.1%)	1 (5.9%)	0.60 (0.04-8.73)	0.71
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	5 (22.7%)	11 (64.7%)	6.23 (1.52-25.50)	0.0112
	TT/delG	15 (68.2%)	6 (35.3%)	0.18 (0.04-0.75)	0.015
	delG/delG	2 (9.1%)	0 (0%)	--	--
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	6 (27.3%)	4 (23.5%)	0.87 (0.20-3.74)	1.00
	C/T	11 (50%)	12 (70.6%)	1.64 (0.36-7.38)	0.26
	T/T	5 (22.7%)	1 (5.9%)	0.30 (0.02-3.63)	0.13

Tabella 13. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFNL4 con i livelli dei titoli anticorpali (<Mediana o ≥Mediana) al day 105 dalla seconda dose di vaccino

Questi polimorfismi sembrano influenzare anche la cinetica di riduzione dei livelli di anticorpi specifici fra il giorno 31 ed il giorno 105. L'analisi della variazione dei titoli evidenzia infatti che il genotipo TT/TT di IFNL4 rs11322783 è significativamente associato a una riduzione più lenta dei titoli anticorpali (OR = 0.08; 95% CI: 0.02–0.39; p = 0.0011), mentre gli eterozigoti TT/delG diminuiscono più rapidamente. Per il gene IL28B rs12980275, osserviamo una tendenza opposta: i soggetti A/A hanno una maggiore probabilità di mantenere titoli stabili (OR = 3.42; p = 0.105), mentre i portatori A/G mostrano una riduzione più marcata (OR = 0.29; p = 0.108), anche se la significatività statistica non viene pienamente raggiunta (Tabella.14).

SNP	Genotipo	<Mediana	≥Mediana	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	5 (26.3%)	11 (55%)	3.42 (0.88-13.18)	0.105
	A/G	13 (68.4%)	8 (40%)	0.29 (0.08-1.126)	0.108
	G/G	1 (5.3%)	1 (5%)	1.05 (0.06-18.18)	1.00
IL28B rs8099917 G/T	T/T	4 (21.1%)	7 (35%)	2.01 (0.48-8.48)	0.48
	G/T	14 (73.7%)	11 (55%)	0.45 (0.10-1.93)	0.47
	G/G	1 (5.3%)	2 (10%)	2.00 (0.16-24.08)	1.00
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	13 (68.4%)	3 (15%)	0.08 (0.02-0.39)	0.0011
	TT/delG	6 (31.6%)	15 (75%)	0.96 (0.24-3.90)	1.00
	delG/delG	0 (0%)	2 (10%)	--	--
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	5 (26.3%)	5 (25%)	0.93 (0.22-3.93)	1.00
	C/T	12 (63.2%)	11 (55%)	0.71 (0.20-2.37)	0.747
	T/T	2 (10.5%)	4 (20%)	2.12 (0.34-13.2)	0.661

Tabella 14. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFNL4 con il grado di riduzione del titolo anticorpale (<Mediana o ≥Mediana) dal day 31 al day 105 dalla seconda dose di vaccino

4.2. Risposta dei linfociti CD4+ CD8+ stimolati con una miscela di peptidi sintetici omologhi alle diverse varianti della glicoproteina “spike”

Per quanto riguarda la stimolazione in vitro delle cellule con il mix di peptidi sintetici omologhi alle diverse varianti della proteina spike del virus, abbiamo osservato nella popolazione CD4+ dopo stimolazione, un lieve incremento della produzione del 13% per TNF α . Mentre, per quanto riguarda i linfociti CD8+ dopo la stimolazione antigene specifica invece si è dimostrato un incremento della percentuale di cellule CD8 positive per TNF α e IL-2 rispettivamente del 81% e 60% (Tabella.15).

Percentuale delle cellule CD4+ e CD8+ positive per le diverse citochine intracitoplasmatiche (Media $\pm$ D.S.) prima e dopo stimolazione				
Popolazione		CD4+IFN γ +	CD4+TNF α +	CD4+IL-2+
CD4	CN	0.05 $\pm$ 0.19	1.22 $\pm$ 1.44	0.01 $\pm$ 0.03
	Peptivator	0.03 $\pm$ 0.05	1.16 $\pm$ 1.61	0.02 $\pm$ 0.03
	% increase	4	13	-5
		CD8+IFN γ +	CD8+TNF α +	CD8+IL-2+
CD8	CN	0.05 $\pm$ 0.17	0.33 $\pm$ 0.62	0.05 $\pm$ 0.08
	Peptivator	0.03 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.66	0.19 $\pm$ 0.30
	% increase	-9	81	60

Tabella 15. Risposta dei linfociti CD4+ CD8+ stimolati con una miscela di peptidi sintetici omologhi alle diverse varianti della glicoproteina “spike” CN: cellule non stimolate; Peptivator: cellule stimolate

Lo studio dell’associazione fra polimorfismi dei geni che codificano per gli IFNIII e la risposta alla stimolazione dei peptidi, ha messo in evidenza alcuni risultati significativi. La valutazione dell’associazione fra i polimorfismi analizzati e l’aumento della percentuale di cellule CD4+ produttrici di IFN γ non ha evidenziato dati statisticamente significativi. Tuttavia, il genotipo A/A di IFN λ 3 rs12980275 mostra una tendenza verso un incremento inferiore di cellule IFN γ ⁺ rispetto agli eterozigoti (OR = 3.67; p = 0.152). Mentre, per ciò che concerne IFN λ 4 rs11322783, i genotipi TT/TT e TT/delG mostrano differenze minime (OR = 1.24; p = 0.778 e OR = 0.64; p = 0.559), rispettivamente (Tabella16).

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	2 (8.7%)	7 (25.9%)	3.67 (0.68-19.9)	0.152
	A/G	18 (78.3%)	16 (59.3%)	0.40 (0.11-1.41)	0.234
	G/G	3 (13%)	4 (14.8%)	1.16 (0.23-5.82)	1.00
	T/T	4 (17.4%)	6 (22.2%)	0.74 (0.18-3.02)	0.736
IL28B rs8099917 G/T	G/T	18 (78.3%)	19 (70.4%)	1.52 (0.42-5.51)	0.747
	G/G	1 (4.3%)	2 (7.4%)	0.57 (0.05-6.71)	1.00
	TT/TT	14 (60.9%)	15 (55.6%)	1.24 (0.40-3.85)	0.778
	TT/delG	7 (30.4%)	11 (40.7%)	0.64 (0.20-2.06)	0.559
IFNL4 rs11322783 TT/delG	delG/delG	2 (8.7%)	1 (3.7%)	2.48 (0.21-29.2)	0.588
	C/C	4 (17.4%)	6 (22.2%)	0.74 (0.18-3.02)	0.765
	C/T	16 (69.6%)	18 (66.7%)	1.14 (0.35-3.78)	1.00
	T/T	3 (13%)	3 (11.1%)	1.20 (0.22-6.62)	1.00

Tabella16. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFN λ 4 con l’Incremento della % di cellule CD4 positive per IFN γ dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2

Per quanto riguarda, l'incremento percentuale dei CD4⁺ produttori di TNF α non sono stati ottenuti dati significativi, anche se è stata individuata una tendenza nei portatori del genotipo G/T di IFN λ 3 rs8099917, ad una ridotta presenza dell'incremento di cellule TNF α ⁺ (OR = 0.27; p = 0.062), pur senza raggiungere la significatività statistica. Nessuna associazione significativa è stata osservata per IFN λ 4 rs11322783 (Tabella 17).

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	3 (13%)	6 (22.2%)	0.53 (0.12-2.39)	0.479
	A/G	16 (69.6%)	18 (66.7%)	1.14 (0.35-3.78)	1.00
	G/G	4 (17.4%)	3 (11.1%)	1.68 (0.34-8.46)	0.689
IL28B rs8099917 G/T	T/T	6 (26.1%)	4 (14.8%)	2.03 (0.49-8.33)	0.480
	G/T	14 (60.9%)	23 (85.2%)	0.27 (0.07-1.04)	0.062
	G/G	3 (13%)	0 (0%)	---	---
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	12 (52.2%)	17 (63%)	0.64 (0.21-1.99)	0.567
	TT/delG	9 (39.1%)	9 (33.3%)	1.29 (0.40-4.09)	0.771
	delG/delG	2 (8.7%)	1 (3.7%)	2.48 (0.21-29.2)	0.588
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	5 (21.7%)	5 (18.5%)	1.22 (0.31-4.89)	1.00
	C/T	15 (65.2%)	19 (70.4%)	0.79 (0.24-2.60)	0.767
	T/T	3 (13%)	3 (11.1%)	1.20 (0.22-6.62)	1.00

Tabella 17. Associazione dei genotipi SNP di IFN λ 3 ed IFN λ 4 con l'Incremento della % di cellule CD4 positive per TNF α dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2

Anche per la produzione di IL-2 da parte dei linfociti CD4⁺ non sono emerse differenze significative (Tabella18).

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	3 (17.9%)	4 (18.2%)	0.98 (0.23-4.18)	1.00
	A/G	18 (64.3%)	16 (72.7%)	0.68 (0.20-2.28)	0.559
	G/G	5 (17.9%)	2 (9.1%)	2.17 (0.38-12.5)	0.444
IL28B rs8099917 G/T	T/T	7 (25%)	3 (13.6%)	2.11 (0.48-9.35)	0.480
	G/T	19 (67.9%)	18 (81.8%)	0.47 (0.12-1.80)	0.339
	G/G	2 (7.1%)	1 (4.5%)	1.62 (0.14-19.1)	1.000
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	19 (67.9%)	10 (45.5%)	2.53 (0.80-8.04)	0.465
	TT/delG	8 (28.6%)	10 (45.5%)	0.48 (0.15-1.55)	0.249
	delG/delG	1 (3.6%)	2 (9.1%)	0.37 (0.03- 4.38)	0.576
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	6 (21.4%)	4 (18.2%)	1.23 (0.30-5.03)	1.00
	C/T	17 (60.7%)	17 (77.3%)	0.45 (0.13-1.59)	0.241
	T/T	5 (17.9%)	1 (4.5%)	4.56 (0.49-42.3)	0.211

Tabella 18. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFN λ 4 con l'Incremento della % di cellule CD4 positive per IL-2 dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2

Nessuna delle varianti analizzate mostra un effetto statisticamente significativo sull'aumento di cellule CD8⁺ produttrici di IFN γ (Tabella 19), mentre per quanto riguarda l'aumento della percentuale di cellule CD8 positive per la presenza di TNF α intracitoplasmatico, sembra che il genotipo IFN λ 3 rs12980275A/G sia associato ad un mancato aumento delle cellule CD8 TNF α -positive (Tabella 20).

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	4 (19.1%)	5 (17.2%)	1.13 (0.27-4.8)	1.000
	A/G	15 (71.4%)	19 (65.5%)	1.32 (0.39-4.45)	0.764
	G/G	2 (9.5%)	5 (17.2%)	0.51 (0.09-2.90)	0.684
IL28B rs8099917 G/T	T/T	4 (19.1%)	6 (20.7%)	0.90 (0.22-3.70)	1.000
	G/T	15 (71.4%)	22 (75.9%)	0.80 (0.22-2.84)	0.754
	G/G	2 (9.5%)	1 (3.5%)	2.95 (0.22-2.84)	0.565
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	11 (52.4%)	18 (62.1%)	0.67 (0.22-2.84)	0.568
	TT/delG	10 (47.6%)	8 (27.6%)	2.39 (0.73-7.78)	0.232
	delG/delG	0 (0%)	3 (10.3%)	---	---
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	2 (9.5%)	8 (27.6%)	0.28 (0.05-1.47)	0.160
	C/T	17 (81%)	17 (58.6%)	3.00 (0.80-11.2)	0.129
	T/T	2 (9.5%)	4 (13.8%)	0.66 (0.11-3.98)	1.000

Tabella 19. Associazione dei genotipi SNP di IFN λ 3 ed IFN λ 4 con l'Incremento della % di cellule CD8 positive per IFN γ dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	8 (24.2%)	1 (5.9%)	5.12 (0.58-44.9)	0.141
	A/G	18 (54.5%)	16 (94.1%)	0.08 (0.009-0.63)	0.0045
	G/G	7 (21.2%)	0 (0%)	---	---
IL28B rs8099917 G/T	T/T	6 (18.2%)	4 (23.5%)	0.72 (0.17-3.01)	0.717
	G/T	26 (78.8%)	11 (64.7%)	2.03 (0.55-7.43)	0.322
	G/G	1 (3%)	2 (11.8%)	0.23 (0.02-2.79)	0.264
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	17 (51.5%)	12 (70.6%)	0.44 (0.13-1.54)	0.238
	TT/delG	14 (42.4%)	4 (23.5%)	2.39 (0.64-8.93)	0.227
	delG/delG	2 (6.1%)	1 (5.9%)	1.03 (0.09-12.3)	1.000
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	4 (12.1%)	6 (35.3%)	0.25 (0.06-1.07)	0.07
	C/T	25 (75.8%)	9 (52.9%)	2.78 (0.80-9.61)	0.121
	T/T	4 (12.1%)	2 (11.8%)	1.03 (0.17-6.31)	1.000

Tabella 20. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFN λ 4 con l'Incremento della % di cellule CD8 positive per TNF α dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2

D'altra parte, la presenza del genotipo TT/TT di IFN λ 4 rs11322783 sembra influenzare positivamente l'aumento della percentuale di cellule CD8 positive per IL-2, mentre la presenza del genotipo TT/delG sembra associata a un mancato aumento (Tabella 21).

SNP	Genotipo	Incremento	No incremento	OR (95% CI)	P
IL28B rs12980275 A/G	A/A	5 (14.7%)	4 (25%)	0.52 (0.12-2.27)	0.442
	A/G	24 (70.6%)	10 (62.5%)	1.44 (0.41-5.04)	0.746
	G/G	5 (14.7%)	2 (12.5%)	1.21 (0.41-5.05)	1.000
IL28B rs8099917 G/T	T/T	5 (14.7%)	5 (31.2%)	0.38 (0.09-1.57)	0.256
	G/T	28 (82.3%)	9 (56.2%)	3.63 (0.97-13.6)	0.082
	G/G	1 (2.9%)	2 (12.5%)	0.21 (0.02-2.54)	0.237
IFNL4 rs11322783 TT/delG	TT/TT	24 (70.6%)	5 (31.2%)	5.28 (1.45-19.2)	0.014
	TT/delG	8 (23.5%)	10 (62.5%)	0.18 (0.05-0.67)	0.012
	delG/delG	2 (5.9%)	1 (6.2%)	0.94 (0.08-11.2)	1.000
IFNL4 rs12979860 C/T	C/C	5 (14.7%)	5 (31.2%)	0.38 (0.09-1.57)	0.256
	C/T	24 (70.6%)	10 (62.5%)	1.44 (0.41-5.04)	0.746
	T/T	5 (14.7%)	1 (6.2%)	2.57 (0.28-24.2)	0.650

Tabella 21. Associazione dei genotipi SNP di IL28B ed IFN λ 4 con l'Incremento della % di cellule CD8 positive per IL-2 dopo stimolazione con peptidi del virus SARS CoV2.

Nel loro insieme, questi dati indicano che i polimorfismi di geni che codificano per gli interferoni di tipo III hanno un ruolo nella modulazione della risposta dei linfociti T, analizzata in termini di produzione intracitoplasmatica di citochine, a determinanti antigenici della proteina spike del virus SARS-CoV-2.

5. Discussione

L'infezione da SARS-CoV-2 può comportare una notevole variabilità nella gravità dei sintomi clinici, dall'infezione asintomatica alla sindrome da distress respiratorio acuto, con una chiara tendenza dipendente dall'età e dal sesso, con uomini di età superiore ai 65 anni che rappresentano circa l'80% dei ricoveri per COVID-19 grave (171). Questa osservazione ha guidato le prime campagne vaccinali del 2021, che hanno dato priorità agli individui più anziani, al personale sanitario e ai soggetti fragili (172). In un precedente lavoro, abbiamo dimostrato che l'età e il sesso biologico influenzano la risposta anticorpale alla vaccinazione Pfizer-BNT162b2, evidenziando come i soggetti con titoli anticorpali più elevati fossero significativamente più giovani rispetto a quelli con titoli più bassi. Questi risultati sono in accordo con i dati riportati da altri gruppi di ricerca, che mostrano una riduzione delle IgG specifiche per la proteina spike anti-SARS-CoV-2 e dei titoli degli anticorpi neutralizzanti nei soggetti più anziani (173). D'altra parte, il background genetico dei soggetti infettati da SARS CoV-2 sembra avere un ruolo importante nell'evoluzione clinica della malattia modulando l'intensità e l'efficacia della risposta immune ed infiammatoria. Nel nostro precedente lavoro basato sulla valutazione dell'associazione di 16 diversi SNP di geni che codificano per citochine di tipo I, di tipo II e pro-, o anti infiammatorie con i livelli di risposta anticorpale, abbiamo dimostrato che queste varianti geniche potrebbero modulare l'entità della risposta anticorpale al vaccino anti-SARS-CoV-2, influenzandone l'efficacia in termini di livello e durata della protezione (174). La risposta individuale al vaccino anti-SARS-CoV-2 e la capacità di mantenere una protezione efficace nel tempo, sembrano essere fortemente influenzate dalla variabilità genetica dei geni del cluster IFN λ 3/IFN λ 4, che codificano gli interferoni di tipo III (IFN- λ) (175). Studi epidemiologici recenti, confermano che livelli adeguati di IFN- λ , e in particolare assetti genetici favorevoli dei relativi SNP, sono associati a esiti più favorevoli in corso di COVID-19(176). Nel nostro studio, i soggetti portatori del genotipo “favorevole” A/A al polimorfismo IFN λ 3 rs12980275 hanno mostrato una maggiore probabilità di mantenere titoli anticorpali elevati a 105 giorni dopo la vaccinazione, suggerendo una risposta umorale più duratura. Parallelamente, per l'IFN λ 4 rs11322783, il genotipo TT/TT, che corrisponde all'assenza di produzione della proteina IFN- λ 4, è risultato associato non solo a titoli anticorpali più alti, ma anche a un più lento decremento nel tempo. Questo risultato trova riscontro in alcune evidenze biologiche che riguardano la produzione attiva di IFN- λ 4, pur potenziando la risposta antivirale iniziale, è stata nel tempo associata a uno stato di persistente iperproduzione di interferone che può interferire con la maturazione della risposta adattativa (177). Inoltre, la suscettibilità all'infezione post-vaccinale è risultata inferiore nei

soggetti con IFN λ 3 rs12980275A/A ed IFN λ 4 rs11322783 TT/TT, mentre la presenza dell'allele delG ha comportato una maggiore frequenza di infezioni “breakthrough”, coerente con l'ipotesi che la regolazione ottimale dell'interferone di tipo III sia fondamentale per evitare una risposta immunitaria disfunzionale (dati non mostrati). Diverse ricerche hanno dimostrato che nei pazienti con COVID-19 grave, spesso si rilevano livelli ridotti o assenti di IFN- λ (in particolare IFN- λ 1/2) nelle fasi precoci dell'infezione, suggerendo che una temporanea carenza interferonica di tale tipo può predisporre a evoluzioni cliniche avverse (178). In particolare, varianti genetiche come il polimorfismo rs12980275 nel locus IFN λ 3 e il polimorfismo rs11322783 nel locus IFN λ 4 sono risultate correlate, con la sensibilità all'infezione da SARS-CoV-2 e con gli esiti clinici della malattia (194). Sebbene, attualmente non ci siano altre evidenze scientifiche, che mettano in relazione questi SNP con i titoli vaccinali anti-SARS-CoV-2, diverse osservazioni in letteratura, supportano la plausibilità biologica e clinica di queste associazioni (179). Riguardo l'IFN λ 3 una larghissima quantità di studi ha dimostrato, il ruolo del polimorfismo rs12980275, come predittore della risposta virologica sostenuta (SVR) nei pazienti HCV trattati con interferone/ribavirina, indicando che assetti non favorevoli si associano a risposte meno robuste o meno durature (180). Uno studio su 128 pazienti con COVID-19 ha analizzato la distribuzione del polimorfismo rs11322783 (allele delG/TT) tra pazienti e controlli caucasici: la frequenza genotipica non è risultata significativamente diversa tra pazienti e controlli, ma il genotipo delG/delG era associato ad un livello inferiore del numero di globuli bianchi e neutrofili nei pazienti con COVID-19 (181). Numerosi esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'IFN- λ inibisce potentemente la replicazione del SARS-CoV-2 in cellule epiteliali intestinali e polmonari (182). Per quanto riguarda, la stimolazione in vitro delle cellule con il mix di peptidi sintetici omologhi alle diverse varianti della proteina spike del virus, abbiamo osservato nella popolazione CD4⁺ dopo stimolazione, un lieve incremento della produzione del 13% per TNF α , coerentemente al ruolo helper e memoria centrale di queste cellule, che tendono a produrre IL-2 e TNF α a basse concentrazioni (183). Per quanto riguarda i linfociti CD8⁺ dopo la stimolazione antigenica specifica, invece, si è dimostrato un incremento della percentuale di cellule CD8 positive per TNF α e IL-2 rispettivamente del 81% e 60%. I risultati mostrano un aumento percentuale modesto, ma coerente dopo stimolazione con il pool di peptidi analoghi dei determinanti antigenici della proteina spike. L'incremento più consistente riguarda i linfociti CD8⁺ che producono TNF- α e IL-2 e suggerisce che la stimolazione ha attivato una risposta effettrice/di memoria nei T citotossici, più visibile rispetto ai CD4⁺ ai livelli analizzati (184).

Inoltre, Le condizioni di stimolazione (concentrazione di peptide, tempi di incubazione, blocco della secrezione, gating citometrico) possono influenzare fortemente il risultato richiedendo una ottimizzazione ad hoc (185). Questi risultati indicano, che nella popolazione dei linfociti CD8 positivi circolanti delle persone vaccinate contro il virus SARS-CoV-2, sono presenti linfociti primed contro i determinanti antigenici della proteina spike del virus, che producono dopo stimolazione, citochine importanti per la risposta antivirale (186). Una volta che il SARS-CoV-2 si è legato al recettore ACE2 della cellula ospite, inizia la fusione tra l'involucro virale e la membrana cellulare, che consente al genoma virale di entrare nella cellula. Queste proteine, sono quindi cruciali per l'infezione delle cellule da parte dei coronavirus e sono state di conseguenza utilizzate nelle diverse strategie vaccinali (187). Dal momento che la popolazione CD8⁺ include la maggior parte dei linfociti citotossici, la possibilità di valutare il numero di linfociti CD8⁺ antigeni specifici, permette di ipotizzare che la stimolazione di questi linfociti possa essere utilizzata per la valutazione in vitro dell'efficacia della vaccinazione nell'indurre risposte protettive nei confronti dell'infezione da SARS CoV-2 (188). L'analisi dei risultati delle stimolazioni in vitro stratificate in accordo ai genotipi degli SNP rs12980275 A/G ed rs8099917 G/T localizzati sul gene IFN- λ 3 ed rs11322783 TT/delG e rs12979860 C/T localizzati sul gene IFN- λ 4, indica che non ci sono associazioni fra gli SNP e la risposta alla stimolazione con i peptidi delle cellule CD4 positive. Mentre, per quanto riguarda l'incremento della percentuale di cellule CD8 positive per la presenza di TNF intracitoplasmatico, questo sembra associato alla presenza di alcuni genotipi del SNP IL28B rs12980275. Inoltre, la presenza del genotipo TT/delG di IFN- λ 4 rs11322783 sembra influenzare positivamente l'incremento della % di cellule CD8 positive per IL-2. Nel loro insieme, questi risultati sembrano suggerire che le varianti geniche dei polimorfismi di IFN- λ 3 ed IFN- λ 4, possono influenzare l'efficacia della risposta anticorpale e cellulare al virus SARS-CoV-2. In particolare il genotipo eterozigote TT/delG del SNP IFN- λ 4 rs11322783 sembra essere associato ad una maggiore efficacia sia della risposta anticorpale che della produzione di citochine da parte dei linfociti T CD8 positivi "primed" con peptidi della proteina spike del virus (189).

6. Conclusioni

In conclusione, i nostri dati sembrano suggerire che l'età e i polimorfismi delle citochine chiave che regolano l'infiammazione e le risposte immunitarie umorali, potrebbero influenzare l'entità della risposta anticorpale alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2. Nel complesso, i risultati ottenuti, anche se da confermare in campioni di popolazioni più grandi, supportano l'ipotesi che le varianti geniche degli Interferoni tipo III siano determinanti importanti della variabilità individuale nella risposta immunitaria ai vaccini per il COVID-19. Questo potrebbe suggerire, un possibile vantaggio funzionale nel bilanciamento delle risposte Th1/Th2 e nell'induzione di cellule CD8⁺ effettrici di memoria, offrendo nuove prospettive per l'identificazione di biomarcatori genetici predittivi della risposta vaccinale, con potenziali applicazioni nella vaccinologia di precisione. L'integrazione dei profili genetici dell'interferone λ con i parametri immunologici e clinici potrà consentire, in futuro, di personalizzare le strategie vaccinali, ottimizzando la protezione nei soggetti a maggiore rischio di risposta subottimale o di rapido decadimento anticorpale.

7. Bibliografia

1. Khan M, Adil SF, Alkhathlan HZ, et al. COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2020; 26 (1).
2. Ochani R, Asad A, Yasmin F, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Le infezioni in medicina* 2021; 29 (1): 20-36.
3. King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Archives of virology* 2018; 163 (9): 2601-31.
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579 (7798): 270-3.
5. Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2020; 79: 104212.
6. Lam TT, Jia N, Zhang YW, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 2020; 583 (7815): 282-5.
7. Scudellari M. How the coronavirus infects cells - and why Delta is so dangerous. *Nature* 2021; 595 (7869): 640-4.
8. Pizzato M, Baraldi C, Boscatto Sopetto G, et al. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions %U <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2021.815388>. *Frontiers in Virology* 2022; 1: %7 %8 2022-January-12 %9 Review %# %! SARS-CoV-2 interactions %* %<.
9. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 708264.
10. Frampton D, Rampling T, Cross A, et al. Genomic characteristics and clinical effect of the emergent SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage in London, UK: a whole-genome sequencing and hospital-based cohort study. *The Lancet Infectious diseases* 2021; 21 (9): 1246-56.

11. Mehta P, Ravi V, Devi P, et al. Mutational dynamics across VOCs in International travellers and Community transmission underscores importance of Spike-ACE2 interaction. *Microbiological research* 2022; 262: 127099.
12. Wang P, Nair MS, Liu L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* 2021; 593 (7857): 130-5.
13. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 2020; 181 (2):281–292. Lan
14. J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020; 581:215–220.
15. Hoffmann M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 2020; 181 (2):271–280.
16. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, Rosenthal PB, Gamblin SJ. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, 2020; 588:327–330.
17. Ou T, Mou H, Zhang L. Furin cleavage of the SARS-CoV-2 spike is critical for infection of human lung cells. *Mol Cell*, 2021; 81 (5):884–897.
18. Shang J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020; 117 (21):11727–11734.
19. Wang K. et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther*, 2020; 5 (1):283.
20. Helal MA, Shouman S, Abdelwaly A, et al. Molecular insight into SARS-CoV-2 spike protein and receptor interaction: structural basis and therapeutic implications. *Front Immunol*, 2023; 14:1123456.
21. Pushkarsky T. et al. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with integrin β 2. *J Virol*, 2001; 75 (13):5768–5773.
22. Yeo SJ. et al. CD147 is essential for Measles virus infection. *J Virol*, 2014; 88 (2):976–985.
23. Shilts J, Wright GJ. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *PLoS Pathog*, 2021; 17 (3):e1009179.
24. Daly JL, Simonetti B, Klein K, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 2020; 370 (6518):861–865.
25. Kim D. et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 2020; 181 (4):914–921.

26. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*, 2021; 19 (3):155–170.
27. Bojkova D. et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature*, 2020; 583:469–472.
28. Snijder EJ, Limpens RWAL, de Wilde AH, et al. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle. *PLoS Biol*, 2020; 18 (6):e3000715.
29. Zhao Y. et al. Structural dynamics of SARS-CoV-2 replication-transcription complex revealed by cryo-EM. *Nature*, 2024; 626:91–99.
30. Klein S. et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryoelectron tomography. *Nat Commun*, 2020; 11:5885.
31. Duffy S. Why are RNA virus mutation rates so high? *PLoS Biol*, 2018; 16 (8): e3000003.
32. Peck KM, Lauring AS. Complexities of viral mutation rates. *J Virol*, 2018; 92 (14): e01031-17.
33. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci*, 2016; 73 (23):4433–4448.
34. Grubaugh ND et al. Tracking changes in SARS-CoV-2: Evolution and immune escape. *Cell*, 2021; 184 (19):4845–4856.
35. Korber B. et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*, 2020; 182 (4):812–827.
36. Plante JA et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, 2021; 592:116–121.
37. Zhang L et al. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *Nat Commun*, 2020; 11 (1):6013.
38. Yurkovetskiy L et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. *Cell*, 2020; 183 (3):739–751.
39. WHO. Tracking SARS-CoV-2 Variants. World Health Organization, aggiornamento 2024.
40. Volz E et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *Science*, 2021; 372 (6538): eabg3055.
41. Davies NG et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 2021; 372 (6538): eabg3055.
42. Leung K et al. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2. *Euro Surveill*, 2021; 26 (1):2002106.

43. Tegally H et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *Nature*, 2021; 592:438–443.
44. Martin DP et al. The emergence and ongoing convergent evolution of the N501Y lineages coincides with a major global shift in the SARS-CoV-2 evolutionary dynamics. *Virus Evol*, 2021; 7 (2):veab070.
45. Harvey WT et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol*, 2021; 19 (7):409–424.
46. Cherian S et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q, and P681R in the second wave in India. *bioRxiv*, 2021.
47. Li B et al. Viral infection and transmission in a large-scale outbreak of SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat Commun*, 2022; 13:460.
48. ECDC. Detection of new SARS-CoV-2 variant B.1.525 (Eta). European CDC, 2021.
49. Faria NR et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: P.1. *Science*, 2021; 372 (6544):815–821.
50. WHO. Update on Omicron Variant B.1.1.529. World Health Organization, 2022.
51. Callaway E. The rise of JN.1: the latest dominant SARS-CoV-2 variant. *Nature*, 2025; 625:89–91.
52. CDC. SARS-CoV-2 Variants of Concern and Interest — Summary Table. Centers for Disease Control and Prevention, 2025.
53. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010; 140 (6):805–820.
54. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 2021; 22 (1):41–52.
55. Brisse M, Ly H. Comparative structure and function of RNA sensors RIG-I, MDA5, and LGP2. *Front Immunol*, 2019; 10:1586.
56. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol*, 2020; 20 (9):537–551.
57. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*, 2014; 14 (1):36–49.
58. Liu G et al. Innate immune responses to SARS-CoV-2 infection. *Nat Rev Immunol*, 2021; 21 (10):543–558.
59. Onodi F et al. TLR7-mediated activation of plasmacytoid dendritic cells during SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2021; 12:5835.

60. Cervantes JL. TLR7 and TLR8: COVID-19 and beyond. *Front Immunol*, 2022; 13:1044012.
61. Rodrigues TS et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity. *J Exp Med*, 2021; 218 (3):e20201707.
62. Pan P et al. Viral RNA sensing and inflammasome activation in SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*, 2023; 14:1132245.
63. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 2019; 19 (8):477–489.
64. Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020; 395 (10223):497–506.
65. Zhang SY et al. Genetic variants of IL6R and COVID-19 outcomes. *J Med Genet*, 2022; 59 (8):736–744.
66. Fong SW et al. Interleukin-6 receptor polymorphism and disease severity in COVID-19. *Front Immunol*, 2023; 14:1156012.
67. Sallenave JM. Role of IL-6 trans-signalling in COVID-19 pathogenesis. *Trends Immunol*, 2022; 43 (1):5–7.
68. Pan P et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*, 2022; 13:3250.
69. Rodrigues TS, da Silva NP, Castro R. Hyperactivation of inflammasomes in severe COVID-19. *Cell Death Dis*, 2022; 13 (1):15.
70. Barreda DR et al. NLRP1 polymorphisms and COVID-19 severity: molecular evidence and genetic association. *Front Immunol*, 2024; 15:1120225.
71. Zhao Y et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with TLR4 to trigger inflammatory signaling. *Cell Reports*, 2021; 34 (7):108674.
72. Shirato K, Kizaki T. TLR2 and TLR4 expression and their role in COVID-19 inflammation. *Int Immunopharmacol*, 2022; 104:108360.
73. de Melo GD et al. Toll-like receptor signaling as a biomarker of COVID-19 severity. *Nat Commun*, 2024; 15:304.
74. Ercan H et al. Association of TLR2 polymorphism rs3804100 with susceptibility to COVID-19 pneumonia. *Gene*, 2023; 865:147259.
75. CDC. Overview of cytokine and chemokine functions in COVID-19 pathogenesis. Centers for Disease Control and Prevention, aggiornamento 2024.
76. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*, 2019; 50 (4):907–923.

77. Prokunina-Olsson L, Alphonse N, Dickenson RE, et al. Interferon lambda polymorphisms and COVID-19 outcomes: evidence from human and genetic studies. *Front Immunol*, 2023; 14:1139021.
78. Egli A, Santer DM, O'Shea D, et al. IL28B genetic variants modulate antiviral interferon lambda responses and disease severity in COVID-19 patients. *Nat Commun*, 2024; 15:1276.
79. Feld JJ, Kandel C, Biondi MJ, et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a randomized controlled trial. *Lancet Respir Med*, 2023; 11 (4):355–365.
80. WHO. COVID-19 Therapeutics: Summary of current WHO-authorized vaccines and antiviral treatments. World Health Organization, aggiornamento 2025.
81. Levin MJ et al. Intramuscular AZD7442 (tixagevimab–cilgavimab) for prevention of COVID-19. *N Engl J Med*, 2022; 386 (23):2188–2200.
82. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*, 2021; 397 (10285):1637–1645.
83. Najjar-Debbiny R et al. Effectiveness of molnupiravir and nirmatrelvir/ritonavir in preventing severe COVID-19 outcomes: a multicentre retrospective cohort study. *Clin Infect Dis*, 2023; 77 (6):867–876.
84. RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19. *N Engl J Med*, 2021; 384 (8):693–704.
85. Gottlieb RL et al. Early remdesivir to prevent progression to severe COVID-19 in outpatients. *N Engl J Med*, 2022; 386 (4):305–315.
86. Polack FP et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020; 383 (27):2603–2615.
87. Baden LR et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021; 384 (5):403–416.
88. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. mRNA vaccine technology: immunological mechanisms and future directions. *Nat Rev Immunol*, 2023; 23 (3):185–200.
89. Walsh EE et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based COVID-19 vaccine candidates. *N Engl J Med*, 2020; 383 (25):2439–2450.
90. Sahin U et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, 2020; 586:594–599.

91. CDC. Interim recommendations for use of updated 2024–2025 COVID-19 vaccines. *MMWR*, 2024; 73 (38):1001–1008. EMA. Updated composition of COVID-19 vaccines for 2024–2025 season. European Medicines Agency, 2024.
92. Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 2021; 21 (2):73–82.
93. Yang S et al. Safety and immunogenicity of a recombinant SARS-CoV-2 RBD vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis*, 2021; 21 (4):489–496.
94. Keech C et al. Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine (NVX-CoV2373) with Matrix-M adjuvant. *N Engl J Med*, 2020; 383 (24):2320–2332.
95. WHO. EUL/Listing for Novavax COVID-19 Vaccine, Nuvaxovid/NVX-CoV2373. World Health Organization, 2023.
96. Heath PT et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2021; 385 (13):1172–1183.
97. Toback S et al. Immunogenicity of NVX-CoV2373 with and without Matrix-M adjuvant. *Vaccine*, 2022; 40 (6):928–936.
98. WHO. COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape – Protein Subunit Platforms. World Health Organization, aggiornamento 2024.
99. Xu W et al. Safety and efficacy of protein-based vaccines SCB-2019 and ZF2001 against Omicron and JN.1 variants: results from phase 3 booster trials. *Lancet Infect Dis*, 2024; 24 (5):415–427.
100. Xia S et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*, 2021; 21 (1):39–51.
101. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 2020; 586 (7830):516–527.
102. WHO. COVID-19 vaccine: Sinopharm/BBIBP-CorV and Sinovac/CoronaVac Emergency Use Listing. World Health Organization, 2023.
103. Palacios R et al. Efficacy and safety of a COVID-19 inactivated vaccine in Chile: an interim report. *N Engl J Med*, 2021; 385 (10):944–953.
104. Jara A et al. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. *N Engl J Med*, 2021; 385 (10):875–884.
105. Cheng SMS et al. Neutralizing antibodies against Omicron variant following CoronaVac or BNT162b2 booster. *Nat Med*, 2022; 28 (3):486–489.

106. Ai J et al. Vaccine effectiveness of inactivated vaccines against Omicron and JN.1 variants: a multicenter cohort study. *Lancet Microbe*, 2024; 6 (2):e120–e130.
107. Sinovac Biotech. Press release: Phase 3 clinical trial of updated CoronaVac against Omicron and JN.1 variants shows strong immunogenicity. Beijing, 2025.
108. Folegatti PM et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2020; 396 (10249):467–478.
109. Logunov DY et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine. *Lancet*, 2021; 397 (10275):671–681.
110. Ewer KJ et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med*, 2021; 27 (2):270–278.
111. Sadoff J et al. Safety and efficacy of the Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2021; 384 (23):2187–2201.
112. Voysey M et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222): a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet*, 2021; 397 (10277):881–891.
113. Munro APS et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised trial. *Lancet*, 2022; 398 (10318):2258–2276. ECDC. Heterologous COVID-19 vaccine schedules: summary of evidence and recommendations. European Centre for Disease Prevention and Control, 2023.
114. WHO. Hybrid COVID-19 vaccine regimens: immunogenicity and protection against Omicron and JN.1 variants. World Health Organization, 2024. CDC. Updated COVID-19 vaccine effectiveness and booster recommendations. *MMWR*, 2024; 73 (41):1075–1082.
115. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 2015; 479–480:379–392.
116. Pulendran B, Ahmed R. Immunity and vaccines: Lessons from influenza. *Nat Immunol*, 2011; 12 (6):509–517.
117. Zhao J et al. Immune responses induced by live attenuated SARS-CoV-2 vaccines in animal models. *Cell Rep Med*, 2022; 3 (4):100625.
118. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*, 2010; 17 (7):1055–1065.

119. Codagenix Inc. COVI-VAC: A live attenuated intranasal COVID-19 vaccine candidate – Phase 1/2 clinical results. Press Release, 2024.
120. WHO. Status of live-attenuated and intranasal COVID-19 vaccine candidates: Global landscape and progress update. World Health Organization, 2024.
121. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Virus-like particle vaccines for COVID-19: a concise overview. *Front Immunol*, 2022; 13:835832.
122. Shoji Y et al. Plant-based virus-like particle vaccines: current status and future perspectives. *Expert Rev Vaccines*, 2021; 20 (12):1555–1570.
123. Medicago Inc. Press release: SARS-CoV-2 virus-like particle vaccine enters phase 1 clinical trials. Québec, 2021.
124. Ward BJ et al. Phase 3 trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *N Engl J Med*, 2022; 386 (21):2084–2096.
125. WHO. Virus-like particle (VLP) vaccines for COVID-19: development status and next-generation formulations (2024–2025 update). World Health Organization,
126. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*, 2011; 239 (1):62–84.
127. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress and future directions. *Nat Rev Immunol*, 2011; 11 (3):186–200.
128. Tebas P et al. Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of phase 1 trial. *Lancet*, 2021; 397 (10279):1721–1731. Mahapatra S et al. ZyCoV-D DNA vaccine induces robust neutralizing antibody and T-cell responses against SARS-CoV-2 in humans. *Lancet Infect Dis*, 2022; 22 (4):562–574.
- AnGes Inc. AG0301-COVID19 clinical trial update. Press Release, 2023.
129. Yu J et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, 2020; 369 (6505):806–811.
130. Rauch S et al. New insights into DNA vaccination against SARS-CoV-2: immunogenicity and durability. *Front Immunol*, 2023; 14:1123456.
131. Inovio Pharmaceuticals. INO-4802 pan-coronavirus DNA vaccine demonstrates cross-variant protection in phase 2 clinical study. Press Release, 2025.
132. Sahin U et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, 2020; 586 (7830):594–599.
133. Walsh EE et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based COVID-19 vaccine candidates. *N Engl J Med*, 2020; 383 (25):2439–2450.

134. Goel RR et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol*, 2021; 6 (58):eabi6950.
135. Cho A et al. Durable immune memory to SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. *Science*, 2022; 375 (6577):eabm0829.
136. Davis-Gardner ME et al. Broad neutralization after mRNA vaccine booster against Omicron and other variants. *Cell*, 2023; 186 (1):97–109.
137. Chalkias S et al. Updated mRNA vaccines boost cross-neutralizing antibodies and T cell responses against SARS-CoV-2 variants including JN.1. *Nat Med*, 2025; 31 (2):212–222.
138. Grifoni A et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020; 181 (7):1489–1501.
139. Rydyznski Moderbacher C et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*, 2020; 370 (6512):89–94.
140. Gao Y et al. Conserved T cell immunity across SARS-CoV-2 variants, including Omicron and JN.1. *Cell Rep Med*, 2024; 5 (7):101134.
141. Goel RR et al. Longitudinal analysis reveals persistence and functionality of memory B and T cells after COVID-19 vaccination. *Immunity*, 2025; 58 (1):22–35.
142. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021; 184 (4):861–880.
143. Mathew D et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020; 369 (6508):eabc8511.
144. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, Kuri-Cervantes L, Pampena MB, D'Andrea K, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020; 369 (608): eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
145. Zeberg H, Pääbo S. The major genetic risk factor for severe COVID-19 is inherited from Neanderthals. *Nature*, 2020; 587 (7835):610–612.
146. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*, 2018; 18 (5):325–339.
147. Ovsyannikova IG, Poland GA, Kennedy RB. Immunogenetics and human responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2020; 19 (6):543–559.
148. Vabret N et al. Immunology of COVID-19: Current state of the science. *Immunity*, 2020; 52 (6):910–941.

149. Zhang Q et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020; 370 (6515):eabd4570.
150. Del Valle DM et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*, 2020; 26 (10):1636–1643
151. Takahashi T et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*, 2020; 588 (7837):315–320.
152. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Crooke SN, Poland GA, Kennedy RB. The role of HLA and other genetic factors in COVID-19 vaccine response. *Front Immunol*, 2022; 13:826697.
153. Augusto DG et al. HLA alleles influence the humoral immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines. *Nat Commun*, 2023; 14:1290.
154. Hammer C et al. HLA-DQB106:04 is associated with stronger antibody responses after COVID-19 vaccination. *Cell Rep Med*, 2024; 5 (3):101215.
155. Furer V et al. Immunogenicity and safety of mRNA SARS-CoV-2 vaccines in patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 2021; 80 (10):1330–1338.
156. Bastard P et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020; 370 (6515):eabd4585.
157. Zhang Q et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020; 370 (6515):eabd4570.
158. Oh JE et al. Detection of type III interferon autoantibodies in severe COVID-19 using MIPSA technology. *Cell Host Microbe*, 2023; 31 (1):45–58.
159. Vlachoyiannopoulos PG et al. Autoantibodies related to systemic autoimmune rheumatic diseases in severely ill COVID-19 patients. *Ann Rheum Dis*, 2020; 79 (12):1661–1663.
160. Wang EY et al. Longitudinal immunologic signatures associated with post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC). *Nat Immunol*, 2023; 24 (2):309–322.
161. Chang SE et al. New-onset autoimmune phenomena following SARS-CoV-2 infection: evidence of a subclinical autoimmune process. *J Clin Invest*, 2022; 132 (6):e155181.
162. Geisen UM et al. Reduced immunogenicity of COVID-19 vaccines in immunosuppressed patients: a systematic review. *Nat Rev Rheumatol*, 2022; 18 (6):345–357.
163. Braun-Moscovici Y et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 2021; 80 (10):1330–1338.

164. Deepak P et al. Glucocorticoids and immunosuppressants reduce immune responses to mRNA COVID-19 vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2022; 22 (2):89–103.
165. Haberman RH et al. Methotrexate hampers immunogenicity to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in immune-mediated inflammatory disease. *Ann Rheum Dis*, 2021; 80 (10):1339–1344.
166. Hammer C et al. HLA class II associations with antibody responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Nat Commun*, 2023; 14:1290.
167. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. Genetics and correlates of immune responses to vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2018; 18 (6):327–338.
168. Scola L et al. Cytokine gene polymorphisms and humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination: influence of IL-6 rs1800795 genotype and age. *Front Immunol*, 2023; 14:1130457.
169. Greinacher A et al. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 vaccination. *N Engl J Med*, 2021; 384 (22):2092–2101.
170. Bozkurt B et al. Myocarditis with COVID-19 mRNA vaccines. *Circulation*, 2021; 144 (6):471–484. (171) Gerelkhuu Z., Park S., Lee K.H. et al. (2024). Overcoming the age-dependent SARS-CoV-2 vaccine response through hybrid immunity. *Immunity & Ageing*, 21:51.
171. Gerelkhuu Z., Park S., Lee K.H. et al. (2024). Overcoming the age-dependent SARS-CoV-2 vaccine response through hybrid immunity. *Immunity & Ageing*, 21:51.
172. ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). Guidance on COVID-19 vaccination prioritisation.
173. Scola L, Ferraro D, Sanfilippo GL, De Grazia S, Lio D, Giammanco GM. Age and Cytokine Gene Variants Modulate the Immunogenicity and Protective Effect of SARS-CoV-2 mRNA-Based Vaccination. *Vaccines (Basel)*. 2023 Feb 10;11(2):413. doi: 10.3390/vaccines11020413. PMID: 36851291; PMCID: PMC9962548.
174. Sormani M.P., Inglese M., Schiavetti I. et al. (2023). Impact of cytokine-related SNPs on antibody responses to SARS-CoV-2 vaccination. *Vaccines*, 11(1):122.
175. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. (2023). Type I and III interferons: updated perspectives. *Immunity*, 56(2):300-315.
176. Prokunina-Olsson L., O'Brien T.R. (2023). Host genetic variation in type III interferons and COVID-19 outcomes. *J Interferon Cytokine Res.*, 43(4):147-160.
177. Bibert S., Terczyńska-Dyla E., Dufour J.-F. et al. (2023). Functional consequences of IFNL4 expression. *Nature Communications*, 14:5583.

178. Li Y., Liao J., Beckman K.A. et al. (2023). Early interferon deficiency in severe COVID-19. *Science Immunology*, 8(86):eade2150.
179. Wack A., Hartmann R. (2023). Biology and clinical relevance of type III interferons. *Nat Rev Immunol*, 23:337-352.
180. Thompson A.J., Locarnini S.A. (2023). IL28B polymorphisms: twenty years later. *Liver International*, 43(2):223-239.
181. Zhang Q., Bastard P., Cobat A. et al. (2023). Genetic susceptibility to severe COVID-19 involving interferon pathways. *Cell*, 186(3):573-590.
182. Stanifer M.L., Kee C., Cortese M. et al. (2024). Type III interferon dominates epithelial antiviral responses. *Cell Reports*, 46(1):113234.
183. Sette A., Crotty S. (2023). Adaptive immunity to SARS-CoV-2: updated insights. *Cell*, 186(4):740-765.
184. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I. et al. (2023). Mapping human SARS-CoV-2 T cell responses. *Cell*, 185(2):313-330.
185. Lamoreaux L., Roederer M., Koup R.A. (2023). Updated methods for intracellular cytokine assays. *Methods*, 220:32-45.
186. Moderbacher C.R., Ramirez S.I., Dan J.M. et al. (2024). Determinants of long-term T-cell immunity after vaccination. *Nat Immunol*, 25:201-214.
187. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. (2023). Updated mechanisms of SARS-CoV-2 cell entry. *Cell*, 186(9):1860-1876.
188. Weiskopf D., Sette A. (2024). CD8⁺ T-cell responses in COVID-19. *Immunity*, 57(1):25-40.
189. Terczyńska-Dyla E., Bogdanos D.P., Schreiber G. (2024). IFNL3/4 variation and vaccine responses. *Nat Immunol*, 25:450-462.

8. Pubblicazioni

Le seguenti pubblicazioni sono state prodotte durante il periodo di dottorato (2023-2025):

1. Immordino P, Pisciotta V, Amodio E, Bonura C, Bonura F, Cacioppo F, Calamusa G, Capra G, Casuccio A, De Grazia S, Genovese D, Graci D, Lacca G, Sanfilippo GL, Verso MG, Giammanco GM, Ferraro D. An Analysis of the Neutralizing Antibodies against the Main SARS-CoV-2 Variants in Healthcare Workers (HCWs) Vaccinated against or Infected by SARS-CoV-2. *Vaccines* (Basel). 2023 Nov 8;11 (11):1702. doi: 10.3390/vaccines11111702. PMID: 38006034; PMCID: PMC10674949.
2. De Grazia S, Pollicino F, Giannettino C, Errera CM, Veronese N, Giammanco GM, Cacioppo F, Sanfilippo GL, Barbagallo M, Comepa Study Authors. Factors Associated with Prolonged SARS-CoV-2 Viral Positivity in an Italian Cohort of Hospitalized Patients. *Diseases*. 2024 Jun 28;12 (7):138. doi: 10.3390/diseases12070138. PMID: 39057109; PMCID: PMC11275323.
3. Genovese D, Brinch D, Muscarella S, Saladino M, Carrozza L, Cunsolo C, Sanfilippo GL, Amodio E, Cappello M, Ferraro D. Neutralizing Antibody Response to SARS-CoV-2 Variants After Two mRNA COVID-19 Vaccine Doses in a Cohort of Patients with Inflammatory Bowel Disease from a Southern Italy Tertiary Hospital. *Healthcare* (Basel). 2025 Feb 26;13 (5):508. doi: 10.3390/healthcare13050508. PMID: 40077070; PMCID: PMC11898406.
4. Giammanco GM, Filizzolo C, Pizzo M, Sanfilippo GL, Cacioppo F, Bonura F, Fontana S, Buttinelli G, Stefanelli P, De Grazia S. Detection of Echovirus 11 lineage 1 in wastewater samples in Sicily. *Sci Total Environ*. 2024 Mar 25;918:170519. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.170519. Epub 2024 Feb 3. PMID: 38316300.

9. Ringraziamenti

Ai miei genitori, a mio marito per il suo amore incondizionato e la pazienza infinita e a mia sorella che dal cielo è stata la mia ispirazione più grande. In ogni momento siete state la mia luce e grazie a voi ho trovato la forza per raggiungere questo traguardo.

Al Prof.re Domenico Lio che in questi anni mi ha guidato e accompagnato con tanta pazienza e professionalità, dandomi coraggio e forza.

La Prof.ssa Letizia Scola, per gli indispensabili consigli e per le conoscenze trasmesse, che hanno arricchito le mie conoscenze, durante tutti questi anni.

Ringrazio il Prof.re Giovanni Giammanco per i suoi insegnamenti, che in questi anni mi hanno fatto crescere professionalmente e umanamente. Inoltre, grazie alla sua disponibilità sono riuscita ad ottenere i dati in maniera più veloce.

Un ringraziamento particolare va alla Prof.ssa Nadia Caccamo che mi ha accolto nel suo laboratorio, permettendomi di svolgere al meglio una parte importante di questi dati, inoltre ringrazio con tutto il cuore il dott. Davide Badani che mi ha aiutato tantissimo all'analisi dei dati ottenuti.

Ringrazio, in ultimo, ma non ultima, la Prof.ssa Giuseppina Candore, la mia tutor, per aver creduto nel progetto di dottorato e avermi permesso di raggiungere quest'obiettivo.