



UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA VITA
XXXIII CICLO

VIRUS PANDEMICI EMERGENTI: VALUTAZIONE
IMMUNOLOGICA DEL VIRUS INFLUENZALE
A/VIETNAM/1194/2004 (H5N1) E DEL NUOVO SARS-COV-2

Settore Scientifico Disciplinare: MED/42

Tutor: Prof. *Emanuele Montomoli*
(Dip.to Medicina molecolare e dello sviluppo)

Tutor aziendale: Dott.ssa. *Silvia Grappi*
(Vismederi Srl)

Coordinatore: Prof. Massimo Valoti

Tesi di: *Livia Mazzini*

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

ABSTRACT	3
RIASSUNTO	5
Le pandemie	7
STUDIO 1	8
INTRODUZIONE	8
L'influenza	8
Il Virus dell'influenza	10
Ciclo replicativo del virus influenzale	12
"Antigenic Drift" e "Antigenic Shift"	14
Epidemie e Pandemie	15
Fasi della Pandemia	20
Virus dell'influenza aviaria A/H5N1	22
Vaccini influenzali	25
Criteri EMA per l'approvazione di un vaccino	29
SCOPO DELLO STUDIO 1	31
Disegno dello studio	31
MATERIALI E METODI	33
Haemagglutination Inhibition (HAI):	33
Single Radial Haemolysis (SRH):	37
MicroNeutralization (MN):	42
Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA):	48
RISULTATI	52
Risultati HAI	52
Risultati SRH	53
Risultati MN	54
Risultati ELLA	56
Correlazione HAI-SRH-MN	59
DISCUSSIONE	61
CONCLUSIONI	63
STUDIO 2	64
INTRODUZIONE	64
Struttura e ciclo replicativo del SARS-CoV-2	67
Epidemiologia e Patogenesi	70
Sintomi	71
Diagnosi	72
Trattamento e prevenzione	73
SCOPO DELLO STUDIO 2	75
MATERIALI E METODI	76
Campioni di siero	76
Antigeni purificati del SARS-CoV-2 e virus vivo	76
"In-house" S1 e RBD Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	77
Kit ELISA commerciale	82
"In-House" RBD Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4	82
Generazione di siero depleto di IgA	82
MicroNeutralization (MN) in adesione	82
RISULTATI	86

Set-up e standardizzazione del test ELISA "in-house" _____	86
Validazione del test ELISA _____	88
SPECIFICITA' _____	90
PRECISIONE _____	92
PRECISIONE-RIPETIBILITA' _____	95
PRECISIONE-LINEARITA' _____	97
PRECISIONE-PRECISIONE INTERMEDIA _____	98
ACCURATEZZA _____	99
ROBUSTEZZA _____	100
Correlazione tra ELISA commerciale, ELISA <i>in house</i> e Microneutralizzazione _____	102
Sottotipizzazione delle IgG nei campioni di siero _____	104
Contributo delle IgA sulla potenza neutralizzante dei campioni di siero analizzati _____	105
DISCUSSIONE _____	106
CONCLUSIONI _____	108
BIBLIOGRAFIA _____	109

ABSTRACT

The historical moment we are experiencing has raised global awareness about the importance of identifying the main characteristics of emerging pandemic viruses in order to limit the damage caused by infection-associated diseases and safeguard global health. This work included two main studies focused on pandemic A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) and the novel SARS-CoV-2, respectively.

H5N1 is a type of influenza virus that causes a highly infectious, severe respiratory disease in birds called avian influenza (or "bird flu"). Influenza A viruses circulating among poultry have the potential to recombine with human influenza A viruses and become transmissible among humans. The aim of the first study was to determine the efficacy of pandemic influenza vaccine against influenza strain A/Vietnam/1194/2004 (H5N1).

Immunogenicity for the homologous strain A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) was investigated using Haemagglutination Inhibition assay (HAI), Micro-Neutralization (MN) and Single Radial Hemolysis (SRH). In order to evaluate cross-protective immunity, serum samples have been assessed to determine the antibody response versus heterologous flu strains (A/Turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) and A/Anhui/1/2005 (H5N1)), applying the same tests (HAI, MN, SRH) plus Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA) for the antibody response against the Neuraminidase (NA) protein. A first analysis has been carried out considering the seroconversions for two distinguished cohorts: vaccine dose 15 μ g and 30 μ g, and age dependent groups 18-40 and 41-60 years old. In the second analysis, all the study methods previously shown were assessed, by evaluating the seroprotection. The results obtained showed the dominance of homologous response anti-A/Vietnam/1194/2004 compared to the heterologous A/H5 strains. In the dose-related evaluation, the same MN seroconversion rate is provided for A/Vietnam/1194/2004, but the 30 μ g dosage seemed to provide advantage for heterologous strain. ELLA assay revealed that, the administration of A/H5N1/Vietnam vaccine evoke a high response also for the N1 A/California. Regarding the age-effect, the group of younger people achieved a greater effect from each of the two doses received, compared to the group of older subjects.

The newly identified coronavirus, named Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in Wuhan, Hubei province, China, in December 2019 and quickly spread throughout the world and was declared a pandemic on March 11th 2020. The diagnosis of Coronavirus associated disease (COVID-19) is currently based on the detection of viral RNA in nasopharyngeal swabs by means of molecular-based assays, such as real-time RT-PCR.

Serological assays aimed at detecting different classes of antibodies could be the best surveillance strategy and can be useful in evaluating of immunogenicity of novel future vaccines for the prevention of COVID-19 disease.

The aim of this second study was to determine SARS-CoV-2-specific antibodies in human serum samples by means of different commercial and *in-house* ELISA kits, in order to evaluate and compare their results first with one another and then with those yielded by functional assays using wild-type virus. Before starting, a set-up and validation of *in-house* ELISA was developed; several purified recombinant S-proteins (S1 and RBD domain) were tested for their ability to detect specific human antibodies and ELISA test was standardized to be as sensitive and specific as possible.

For this second study 181 human serum samples were tested by means of *in-house* ELISA S1 and RBD-specific IgG, IgM and IgA and by means of the Euroimmun S1 Commercial ELISA kit, along with the functional MN assay. Our results showed, the highest agreement between the *in-house* ELISA IgG and IgA RBD and MN and confirm that the antibodies targeting the RBD domain have the highest probability of being neutralizing. We also noticed that the IgA response was closely linked with a positive MN response and in those subjects in whom we registered a high neutralization titer, we always observed a positive IgA signal. We also evaluated the ELISA IgG subtyping response and our results, showed a strong reactivity for IgG1 and IgG3 against RBD in almost all samples. This second study had two major goals: to standardize ELISAs able to detect different classes of immunoglobulins, and to broaden the data-set of information on comparisons between the results of different serological tests, which could be precious for future evaluations of serological diagnoses and vaccine assessments. The present study constitutes preliminary research into the development of an ELISA that can semi-quantify anti-SARS-CoV-2 human antibodies in a specific and repeatable way.

RIASSUNTO

Il momento storico che stiamo vivendo, ha aumentato la consapevolezza globale sull'importanza di identificare le principali caratteristiche dei virus pandemici emergenti, per limitare i danni causati dalle malattie associate all'infezione e salvaguardare la salute globale. Questo lavoro comprende due studi principali incentrati sui virus pandemici A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) e il recente SARS-CoV-2.

L'H5N1 è un tipo di virus influenzale che causa una malattia respiratoria grave e altamente infettiva negli uccelli chiamata influenza aviaria. I virus dell'influenza A, che circolano tra i volatili, hanno il potenziale di ricombinarsi con i virus A dell'influenza umana e di diventare trasmissibili tra gli esseri umani. Lo scopo del primo studio è quello di determinare l'efficacia del vaccino pandemico contro il ceppo influenzale A/Vietnam/1194/2004 (H5N1).

L'immunogenicità per il ceppo omologo A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), è stata studiata utilizzando i metodi *Haemagglutination Inhibition assay* (HAI), *Micro-Neutralization* (MN) e *Single Radial Hemolysis* (SRH). Al fine di valutare l'immunità cross-protettiva, i campioni di siero sono stati valutati per determinare la risposta anticorpale contro i ceppi eterologhi A/Turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) e A/Anhui/1/2005 (H5N1), applicando gli stessi test (HAI, MN, SRH) oltre al test *Enzyme Linked Lectin Assay* (ELLA) per la risposta anticorpale contro la proteina Neuraminidasi (NA). Una prima analisi è stata effettuata considerando il tasso di sieroconversione per due coorti distinte: dose di vaccino 15µg e 30µg, e gruppi di età 18-40 e 41-60 anni. Nella seconda analisi è stato valutato il tasso di sieroprotezione. I risultati ottenuti hanno mostrato la dominanza della risposta omologa anti-A/Vietnam/1194/2004 rispetto ai ceppi eterologhi A/H5. Nella valutazione dose-correlata, non ci sono grandi differenze tra le due dosi di vaccino in MN per A/Vietnam/1194/2004, ma il dosaggio di 30µg sembra fornire un vantaggio per entrambi i ceppi eterologhi. Il saggio ELLA ha rivelato che la somministrazione del vaccino A/H5N1/Vietnam evoca una risposta elevata anche per il ceppo N1 A/California. Per quanto riguarda la valutazione età-correlata, il gruppo dei più giovani ha ottenuto un effetto maggiore da ciascuna delle due dosi ricevute, rispetto al gruppo dei soggetti più anziani.

Il coronavirus recentemente identificato, denominato *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), è emerso a Wuhan, provincia di Hubei, Cina, nel dicembre 2019, si è rapidamente diffuso in tutto il mondo ed è stato dichiarato pandemia l'11 marzo 2020. La diagnosi della malattia associata al Coronavirus (COVID-19) si basa attualmente sul rilevamento dell'RNA virale in tamponi nasofaringei mediante saggi a base molecolare, come

la RT-PCR in tempo reale. I saggi sierologici, volti a rilevare diverse classi di anticorpi, potrebbero essere la migliore strategia di sorveglianza e possono essere utili nella valutazione dell'immunogenicità di nuovi vaccini futuri per la prevenzione della malattia COVID-19.

Lo scopo di questo secondo studio è stato quello di determinare gli anticorpi specifici per il SARS-CoV-2 in campioni di siero umano attraverso un kit ELISA commerciale e un test ELISA *in house*, al fine di valutare e confrontare i loro risultati prima tra loro e poi con quelli ottenuti da saggi funzionali che utilizzano il virus *wild-type*. Prima di iniziare, è stato effettuato un set-up e la validazione dell'ELISA interno; diverse proteine S ricombinanti purificate (S1 e RBD) sono state testate per la loro capacità di rilevare specifici anticorpi umani e il test ELISA è stato standardizzato per essere il più sensibile e specifico possibile.

Per questo secondo studio sono stati testati 181 campioni di siero umano mediante ELISA *in house* S1 e RBD specifico per IgG, IgM e IgA e mediante il kit ELISA commerciale Euroimmun S1, insieme al test funzionale MN. I nostri risultati hanno mostrato, la più alta correlazione tra l'ELISA RBD IgG e IgA interno e il test MN e confermano che gli anticorpi diretti contro il dominio RBD hanno la più alta probabilità di essere neutralizzati. Abbiamo inoltre notato che la risposta IgA è strettamente legata a una risposta MN positiva e nei soggetti in cui abbiamo registrato un elevato titolo di neutralizzazione, abbiamo sempre osservato un segnale IgA positivo. Abbiamo anche valutato la risposta ELISA delle sottoclassi IgG e i nostri risultati hanno mostrato una forte reattività per IgG1 e IgG3 contro RBD in quasi tutti i campioni. Questo secondo studio ha due obiettivi principali: standardizzare gli ELISA in grado di rilevare diverse classi di immunoglobuline e ampliare il data-set di informazioni sui confronti tra i risultati dei diversi test sierologici, che potrebbero essere preziose per le future valutazioni di diagnosi sierologiche e di futuri vaccini. Questo secondo studio costituisce una ricerca preliminare per lo sviluppo di un ELISA in grado di semi quantificare gli anticorpi umani anti-SARS-CoV-2 in modo specifico e ripetibile.

Le pandemie

Una pandemia è definita come "un'epidemia che si verifica in tutto il mondo, o su un'area molto ampia, attraversando i confini internazionali e di solito colpendo un gran numero di persone" (Last J., 2001). Le pandemie sono sempre eventi globali di notevole entità. Sono causate da un virus altamente contagioso verso cui le popolazioni hanno scarsa o nulla immunità. Coincidono infatti, con la comparsa di un nuovo tipo di virus verso il quale l'immunità acquisita in precedenza non è più in grado di fornire protezione, determinando lo stato di popolazione naïve e permettendo così al virus di diffondere in maniera incontrollata (Potter C.W., 2001). Ciò conferisce loro caratteristiche precise: si diffondono in ogni parte del mondo molto rapidamente, di solito in meno di un anno e causano la malattia in più di un quarto della popolazione totale. È proprio questo improvviso aumento dei casi di malattia ed il conseguente superamento delle capacità di reazione, a rendere le pandemie così distruttive, in aggiunta alla mortalità più elevata che inevitabilmente comportano.

Prima dell'attuale Covid-19, almeno altre 13 pandemie hanno infierito negli ultimi 3000 anni (Fig.1), tutte o quasi generate da zoonosi, il salto di specie fra gli animali, selvatici o da allevamento, e l'uomo attraverso successive mutazioni genetiche dei virus. Polli, anatre, suini, topi, pulci, bovini, dromedari, zibetti e pipistrelli hanno fatto da conduttori, soprattutto in Asia, e in modo particolare in Cina dove hanno sempre vissuto a stretto contatto con l'uomo. Dall'epoca dell'urbanizzazione di massa e della globalizzazione, con gli allevamenti intensivi alle porte delle metropoli e i sempre più vasti mercati di animali vivi dentro le megalopoli cinesi, hanno fatto stragi mondiali, si parla di cifre che vanno da 500 milioni ad 1 miliardo di vittime in totale nel corso dei secoli.

In questo lavoro, che si divide in due principali studi, ci soffermeremo su due virus pandemici l'A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) ed il recente SARS-CoV-2.

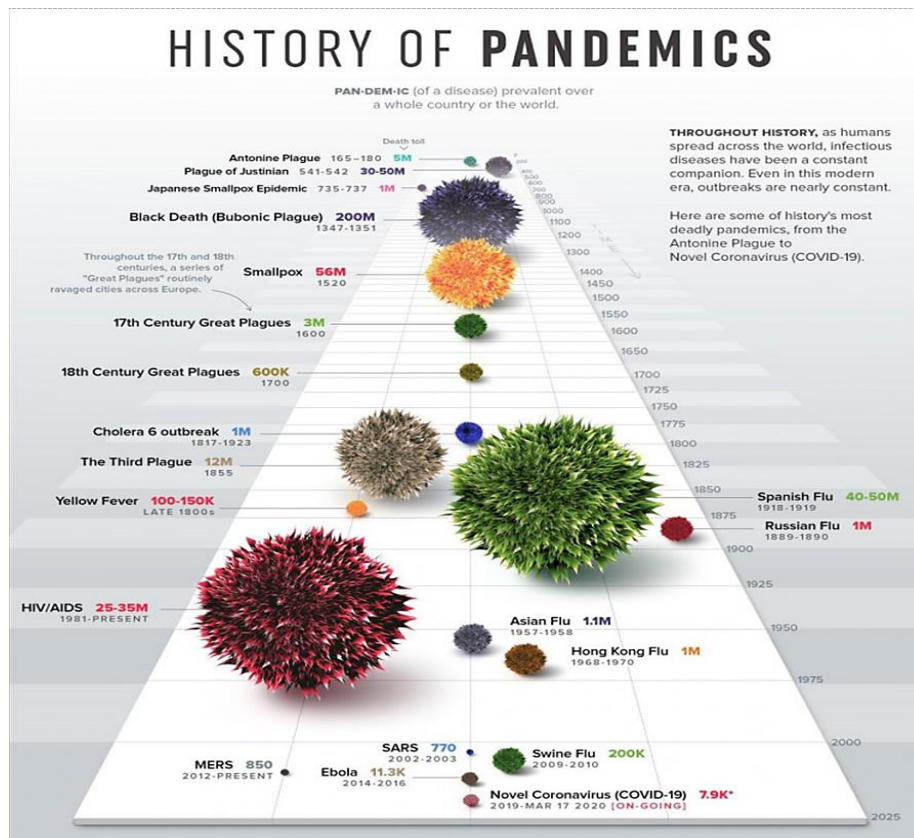


Fig.1: storia delle pandemie mondiali.

STUDIO 1

INTRODUZIONE

L'influenza

L'influenza è una malattia respiratoria provocata da virus a RNA a filamento negativo appartenenti alla famiglia degli Orthomixoviridae. Da un punto di vista clinico, la malattia si presenta con sintomi respiratori (mal di gola, tosse, raffreddore) e sintomi generali (febbre alta, mialgia, cefalea, sensazione di freddo e un malessere generale) (Barik S., 2012) e, delle volte, soprattutto in anziani e bambini, possono insorgere alcune complicazioni che potrebbero portare a ospedalizzazione e addirittura a decesso. Il virus influenzale causa ogni anno epidemie, soprattutto durante la stagione invernale e occasionalmente pandemie, caratteristica che lo distingue da altri virus simili in grado di dare la stessa sintomatologia clinica, come virus parainfluenzali o adenovirus. (Kuszewski K., et al., 2000). Di solito il virus è trasmesso per via aerea con la tosse o gli starnuti: ciò si ritiene che accada per lo più a distanza relativamente ravvicinata. L'influenza può essere spesso trasmessa toccando superfici contaminate dal virus e poi portandosi le mani alla bocca e agli occhi (Brankston G., et al., 2007)

Il periodo di contagiosità inizia un giorno prima della comparsa dei sintomi e termina circa una settimana dopo, ma bambini e persone immunodepresse possono essere contagiose per un periodo più lungo (CDC, 2015).

Nonostante una salda sorveglianza influenzale organizzata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO), ancora oggi la malattia virale rappresenta un problema per la salute umana a causa degli alti tassi di morbilità e mortalità. Negli Stati Uniti, l'influenza stagionale uccide circa 36000 persone ogni anno. Per questo motivo, è bene individuare e studiare l'ecologia del virus dell'influenza, la patogenesi molecolare e la trasmissione, al fine di migliorare la sorveglianza e mettere a punto nuovi protocolli terapeutici. (Salomon R., et al., 2009)

I virus dell'influenza sono di solito altamente specie specifici e solo raramente causano infezione in altre specie (Kamps BS., et al., 2006). Un'ampia varietà è stata isolata negli uomini (H1, H3), nei suini, negli uccelli (H4, H6, H9, H10), negli equini e nei mammiferi marini Webster RG., et al., 1992). I virus influenzali probabilmente subiscono una serie di mutazioni genetiche per diffondersi da animali serbatoi come uccelli selvatici, ad altri ospiti, e tali cambiamenti sono facilitati quando più specie di uccelli e mammiferi si trovano a stretto contatto nei mercati di animali vivi (Webster RG., 2004).

Negli animali acquatici, sono stati ritrovati i 16 sottotipi di emoagglutinina (HA) e tutti i 9 tipi di neuraminidasi (NA) (Fouchier RA., et al., 2005) e anche in diverse combinazioni (H1N1, H16N3) (Fouchier RA., et al., 2007). Negli uomini invece solo pochi sottotipi si sono stabiliti. I virus dell'influenza aviaria si replicano in maniera meno efficiente negli esseri umani (Beare AS., et al., 1991). Analogamente, anche quelli umani non si comportano in egual misura negli uccelli acquatici (Hinshaw VS., et al., 1983).

Di fronte a questo fatto, Scholtissek et al. ipotizzarono che i suini potessero fungere da cosiddetti "mixing vessel" (Scholtissek C., et al., 1985). Se ciò accadesse contemporaneamente, sarebbe possibile che i diversi tipi di virus riscontrati negli umani, suini e negli uccelli scambino il proprio materiale genetico generando nuove varianti (Scholtisrek C., et al., 1998). Una possibile sequenza di trasmissione potrebbe essere: uccelli acquatici-suini galline-uomini. (Salomon R., et al., 2009).

Dato che i virus dell'influenza aviaria e umana mostrano differenti affinità per residui di acido sialico di glicoproteine della superficie cellulare, di tipo $\alpha 2-3$ e $\alpha 2-6$ (Rogers GN., et al., 1983) e l'epitelio di rivestimento della trachea umana possiede specialmente quest'ultimo recettore (Couceiro JNSS., et al., 1993), si può dire che queste glicoproteine potrebbero giocare un ruolo importante nella replicazione virale. Negli uccelli, i virus influenzali infettano con maggior

frequenza le cellule che rivestono il tratto intestinale, forse perché proprio nell'intestino sono presenti residui di acido sialico di tipo α -3. L'alta diffusione dei virus negli uccelli acquatici potrebbe, quindi, essere dovuta all'efficiente via di trasmissione oro-fecale (Webster RG., et al.,1992).

Studiare attentamente le specifiche mutazioni che avvengono durante il riassortimento virale, che porta quindi questi agenti a superare barriere specie-specifiche, è essenziale per sviluppare e migliorare opportune misure preventive (Ito T., et al.,1998), come ad esempio la produzione di vaccini efficaci.

Il Virus dell'influenza

I virus influenzali appartengono alla famiglia degli Orthomixoviridae, che comprende virus rivestiti costituiti da un genoma a RNA a singolo filamento negativo (Taubenberger JK., et al.,2010).

Si possono distinguere 5 generi che includono: Influenza virus A (IAV), Influenza virus B (IBV), Influenza virus C (ICV), Thogotovirus e Isavirus (Infectious Salmon Anemia virus) (Palese P., et al., 2007) (Wright PF., et al., 2007), di cui, comunque, solo il genere A e quello B sono clinicamente rilevanti per l'uomo.

I primi tre generi differiscono per quanto riguarda la patogenicità e il tipo di animale che preferenzialmente infettano (Taubenberger JK., et al., 2010), oltre che sulla base di differenze antigeniche tra la matrice e le nucleoproteine specifiche (Wilschut JC., et al., 2006).

I virus A e B hanno un genoma segmentato composto da otto frammenti di RNA a singolo filamento negativo, che codifica per 12 proteine: le glicoproteine di superficie, emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), due proteine della matrice (M1 e M2), la nucleoproteina (NP), tre proteine complesse della polimerasi PB1, PB2 e PA e quattro proteine non strutturali NS1, NS2, PA-X e PB1-F2. (Fig.2)

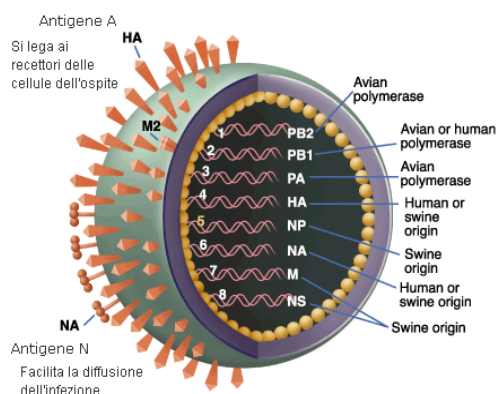


Fig. 2: *Virus dell'influenza suina.*

I segmenti di RNA sono impacchettati nel nucleo virale che è circondato da una membrana lipidica, o "involucro", derivato dalla gemmazione della membrana della cellula ospite infettata. La forma virionica dell'influenza è approssimativamente sferica con un diametro che va da 80 a 120 nm, sebbene possano verificarsi particelle pleomorfe. Lo strato lipidico esterno contiene numerose copie delle due principali glicoproteine di superficie HA e NA e quantità minori della proteina M2, canale ionico protone-selettivo. Le glicoproteine di superficie HA e NA hanno proprietà antigeniche, infatti sono in grado di indurre una risposta anticorpale nell'uomo (Palese P., et al., 2007).

Le principali proteine codificate dal virus sono:

EMOAGGLUTININA (HA): è una proteina integrale di membrana glicosilata. Inizialmente viene sintetizzata come precursore polipeptidico a singola catena (HA0), che una volta in superficie verrà clivato ad opera di specifiche proteasi della cellula ospite in due subunità chiamate HA1 e HA2, biologicamente attive (Bertram S., et al., 2010).

Nella fase iniziale della replicazione virale, l'HA si lega a recettori specifici di acido sialico (acido N-acetil-neuraminico) presenti nelle glicoproteine e glicolipidi di membrana di superficie delle cellule bersaglio (Gamblin SJ., et al., 2010). I virus dell'influenza umana si legano preferenzialmente a recettori di acido sialico di tipo α 2-6 che sono per lo più espressi nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio dell'uomo, mentre i virus aviari legano recettori di tipo α 2-3, che sono abbondanti nelle cellule epiteliali intestinali degli uccelli e nel basso tratto respiratorio dell'uomo (Van Riel D., et al., 2006).

NEURAMINIDASI (NA): è una glicoproteina integrale di membrana di tipo 2 con attività enzimatica, richiesta sia per il clivaggio del legame glicosidico tra i recettori di acido sialico della cellula ospite e l'emoagglutinina, favorendo il rilascio di nuovi virioni, che per il clivaggio di residui di acido sialico da glicoproteine virali per prevenire l'aggregazione di nuove particelle virali (Taubenberger JK., et al., 2010).

NS1: è una proteina dimerica multifunzionale associata a numerose funzioni regolatorie specie specifiche durante l'infezione virale, tra cui quella di conferire resistenza nei confronti dell'attività svolta dall'interferone (Berenice C., et al., 2014).

NS2: è coinvolta nell'assemblaggio virale, fornendo un segnale di esportazione nucleare e una regione di legame per la proteina M1 (Schmitt AP., et al., 2005).

M2: è una proteina integrale di membrana di 97 residui, che funge da canale favorendo l'entrata e l'assemblaggio virale. La proteina si compone di tre domini: uno N-terminale (residui 1-21), un dominio centrale a α -elica che comprende una elica transmembrana (TM) (residui 22-46) collegato ad un'elica anfipatica (AH), e una coda citoplasmatica C terminale (residui 63-97) (Shu Yu Liao, et al., 2013).

Ciclo replicativo del virus influenzale

Il ciclo di replicazione del virus influenzale consta di varie fasi, partendo dal suo ingresso all'interno della cellula ospite, fino ad arrivare alla sintesi di nuove proteine virali. Può essere suddiviso nelle seguenti fasi: ingresso nella cellula ospite; entrata delle ribonucleoproteine virali (vRNP) nel nucleo; trascrizione e replicazione del genoma virale ed esportazione delle vRNP dal nucleo; assemblaggio e sintesi di nuove proteine virali.

Entrata nella cellula ospite

L'HA (emoagglutinina) è un omotrimerico che forma picchi sulla membrana lipidica virale. Questi picchi di HA si legano a specifici residui di acido sialico (α 2-6, α 2-3) sulla superficie della membrana della cellula ospite (Skehel JJ., et al., 2000). Il precursore di HA, HA0, è costituito da due subunità: HA1, che contiene il dominio di legame del recettore, e HA2, che contiene il peptide di fusione. Queste subunità sono collegate mediante legami disolfuro (Huang Q., 2003). I virus umani riconoscono il legame α (2,6), mentre il virus aviario e quello equino riconoscono il legame α (2,3). I virus suini, invece, riconoscono entrambi (Skehel JJ., et al., 2000). Questo spiega l'importanza del fatto che i maiali siano un buon recipiente di miscelazione per i virus dell'influenza aviaria e umana, producendo quindi pericolosi virus patogeni. In seguito al legame con i residui di acido sialico della cellula ospite, si verifica un'endocitosi recettore-mediata e il virus entra nella cellula ospite mediante endosoma. L'endosoma ha un pH basso di circa 5-6, che innesca la fusione delle membrane virali ed endosomiali (Samji T., 2009). Il basso pH induce un cambiamento conformazionale di HA0, clivato da serin-proteasi in HA1 e HA2, importanti per l'infettività del virus. La porzione HA2 è implicata nel mediare la fusione tra l'involucro virale e la membrana cellulare mentre la porzione HA1 contiene il legame recettoriale e il sito antigenico (Steinhauer DA., 1999).

L'ambiente acido dell'endosoma non è importante solo per indurre la nuova conformazione di HA0 e, quindi, per la fusione della membrana virale ed endosomiale, ma anche per aprire il canale ionico M2; questa è una proteina transmembrana di tipo III che forma tetrameri, i cui

domini transmembrana formano un canale che agisce come canale ionico proton-selettivo (Holsinger LJ., et al., 1991) (Pinto LH., et al., 1992). L'apertura dei canali ionici M2 acidifica il nucleo virale, consentendo il rilascio di vRNP da M1, in modo tale che vRNP sia libero di entrare nel citoplasma della cellula ospite (Pinto LH., et al., 2006).

Entrata di vRNP nel nucleo

La trascrizione e la replicazione virale avvengono nel nucleo; perciò, dopo esser state rilasciate nel citoplasma, le vRNP devono entrare nel nucleo. Le proteine virali che compongono le vRNP sono NP, PA, PB1 e PB2, che sono conosciute come segnali di localizzazione nucleare (NLSs). Queste sono in grado di legarsi al sistema di importazione nucleare e quindi entrare nel nucleo (Samji T., et al., 2009).

Trascrizione e replicazione del genoma virale

Il genoma virale dell'influenza è costituito da filamenti di RNA a senso negativo. Affinché possa essere trascritto, in primo luogo deve essere convertito in un filamento a senso positivo per fungere da stampo per la produzione di RNA virale.

L'RNA virale RNA polimerasi dipendente, utilizza il vRNA a senso negativo come modello per sintetizzare due specie di RNA a senso positivo: mRNA per la sintesi delle proteine virali e dell'RNA complementare (cRNA), intermedi da cui l'RNA polimerasi trascrive poi più copie di RNA a senso negativo (vRNA) (Bouvier NM., et al., 2008).

A differenza dell'mRNA della cellula ospite che è poliadenilato da una specifica polimerasi poli(A), la coda poli(A) dell'mRNA influenzale è trascritta dalla polimerasi virale in senso positivo come una stringa di adenosine (Li X., et al., 1994) (Robertson JS., et al., 1981). Una volta poliadenilato e incappucciato, l'mRNA virale è esportato e tradotto come mRNA dell'ospite. L'esportazione nucleare di segmenti di vRNA è mediata dalle proteine virali M1 e NEP/NS2 (Cros JF., et al., 2003).

Sintesi di nuove proteine virali

I ribosomi sintetizzano le nuove proteine virali. Alcune, sono sintetizzate direttamente nella loro forma funzionale come M1, mentre altre sono rielaborate nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi, dove avviene la glicosilazione.

Le proteine modificate vengono trasportate sulla membrana cellulare e ancorate al doppio strato lipidico. Quando raggiungono una sufficiente concentrazione sulla membrana plasmatica, le vRNP e le proteine M1 si aggregano e condensano per favorire la produzione di nuove particelle

virali. Infine, il virione sarà rilasciato mediante esocitosi grazie all'azione svolta dalla neuraminidasi (Lamb RA., et al., 2001) (Fig. 3).

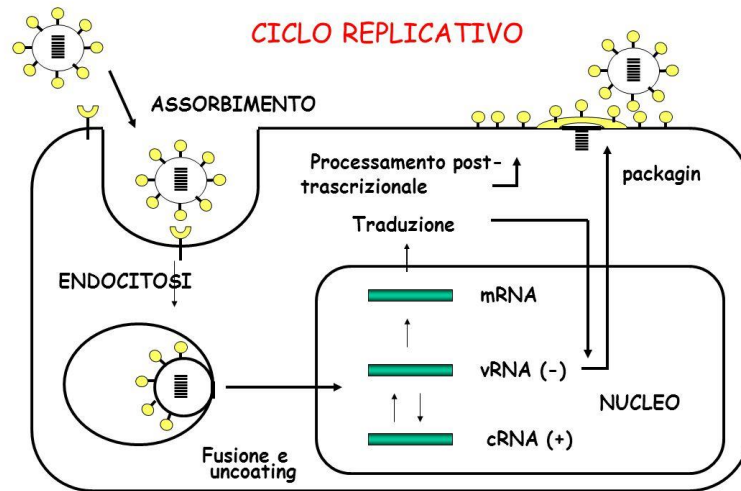


Fig. 3: *Ciclo replicativo del virus dell'influenza.*

“Antigenic Drift” e “Antigenic Shift”

I virus influenzali subiscono continuamente un'evoluzione antigenica per sfuggire all'immunità preesistente (De Jong JC., et al., 2000). Questa variazione nelle proteine virali implica che le risposte immunitarie create contro le precedenti forme del virus siano meno efficaci o completamente inefficaci rispetto alle varianti più recenti. Poiché la glicoproteina di superficie virale HA è l'antigene contro il quale sono diretti gli anticorpi neutralizzanti il virus, sono proprio le variazioni di questa proteina le principali responsabili della “fuga immunitaria” del virus dell'influenza. Altri antigeni virali subiscono variazioni significativamente inferiori, ma, sotto pressione immunologica, possono anch'essi contribuire all'evasione della difesa immunitaria dell'ospite (Thomas PG., 2006). L'evoluzione antigenica dei virus influenzali è la principale causa del verificarsi di epidemie annuali e pandemie occasionali. I virus influenzali di tipo A cambiano le loro proprietà antigeniche mediante due meccanismi distinti: " Antigenic Drift " e " Antigenic Shift ".

Antigenic Drift: consiste nell'accumulo di mutazioni puntiformi a livello dei siti di legame per anticorpi presenti nell'emoagglutinina e in misura minore nella neuraminidasi (Treanor J., et al., 2004). La maggior parte di queste mutazioni non influenza la conformazione delle proteine, tuttavia, qualcuna causa alterazioni delle proteine virali tali da compromettere il legame con gli

anticorpi dell'ospite. Di conseguenza, questi ultimi, abituati a ceppi precedentemente circolanti, non possono più inibire efficacemente l'infezione dei virus, permettendone la diffusione tra la popolazione (Kreijtz JH., et al., 2011). Durante i focolai influenzali stagionali, prevarranno i virus con più mutazioni accumulate e quindi in grado di eludere l'immunità preesistente, aggravando la diffusione delle malattie (De Jong JC., et al., 2000).

Antigenic Shift: consiste in un riassortimento genico dei segmenti che codificano per HA e NA. Il riassortimento si può verificare in corso di coinfezione, ovvero quando una cellula dell'ospite è infettata da due tipi di IAV, che può terminare con il rilascio di nuovi virus che contengono segmenti genici di entrambi i virus parentali (Taubenberger JK., et al., 2011).

L'introduzione di una nuova HA in virus umani può scatenare una pandemia o un'epidemia mondiale, causando centinaia di migliaia di morti da influenza.

Epidemie e Pandemie

I virus influenzali sono la principale causa delle infezioni a livello del tratto respiratorio superiore e sono responsabili delle epidemie annuali che si verificano generalmente nei mesi invernali. Durante queste epidemie stagionali circa il 5-10% della popolazione è infettata dai virus influenzali di tipo A (H3N2 o H1N1) o di tipo B. Un'elevata morbilità e mortalità è associata agli strain influenzali di tipo A mentre quelli di tipo B generalmente si presentano in maniera più mite (Stöhr K., 2002). Occasionalmente, però, anche i virus di tipo B possono causare epidemie della stessa gravità di quella di tipo A. L'influenza di tipo B colpisce solo gli uomini ed è soprattutto riscontrata nell'età infantile.

Il peso economico delle epidemie annuali varia in maniera importante in termini di ospedalizzazione e decessi. Negli Stati Uniti, ad esempio, l'influenza comporta l'ospedalizzazione di più di 200,000 persone ogni anno e conta circa 36,000 decessi a causa dell'influenza o di complicanze a essa correlate (Lofgren E., et al., 2007).

Generalmente nei climi temperati le epidemie influenzali avvengono durante l'inverno con un aumento considerevole dei casi d'influenza, anche se in queste aree la malattia persiste per tutto l'anno a livelli molto bassi (Lofgren E., et al., 2007). Le epidemie avvengono anche nelle aree tropicali ma la tempistica non è stata ancora ben definita, con una circolazione virale durante tutto l'anno o picchi in due stagioni durante l'anno (Simonsen L., et al., 2011).

Dalla fine del XIX secolo, le epidemie influenzali hanno colpito le umanità numerose volte (1803, 1830-33, 1836-37) (Miroslawska&Kosek, 2013). La più grande epidemia del XIX

secolo accadde probabilmente a Novembre-Dicembre del 1889. Questa partì dall'est e si diffuse in tutta l'Europa, prendendo il nome di "Influenza Russa" o "Influenza Asiatica". L'epidemia in pochi mesi si diffuse in tutto il mondo (Shope R.E., 1958) ed è ricordata come il primo caso d'influenza "nell'era della batteriologia". I primi 3 casi si verificarono in 3 località indipendenti e distanti tra loro: Bukhara nell'Asia Centrale, Athabasca in Canada (nord-ovest) e Groenlandia. Oltre alle epidemie, i virus influenzali sono in grado di provocare anche delle pandemie che coincidono con la comparsa di un nuovo sottotipo di virus influenzale A, la cui HA è differente da quelle circolate in precedenza (Webster R.G. et al., 1972). Considerando che l'immunità verso l'influenza è conferita principalmente dagli anticorpi diretti contro l'HA (Santiago F.W., et al., 2012), la comparsa di un nuovo sottotipo implica che l'immunità acquisita in precedenza non è più in grado di fornire protezione, determinando lo stato di popolazione naïve e permettendo così al virus di diffondere in maniera incontrollata.

Potter (Potter C.W., 2001) ha individuato 10 pandemie influenzali, ben definite sia clinicamente sia epidemiologicamente, verificatesi negli ultimi 300 anni, con un rapporto di 3 ogni secolo o 1 ogni 33 anni.

Il XX secolo è stato caratterizzato da 3 pandemie influenzali: nel 1918 ("Spagnola" A/H1N1), nel 1957 ("Asiatica" A/H2N2) e 1968 ("Hong Kong" A/H3N2) (Fig. 4). Ciascuna di esse differiva dalla precedente per l'agente eziologico, l'epidemiologia e la gravità della malattia (Kilbourne E.D., 2006).

La pandemia del 1918-1919, ricordata anche come "la Spagnola", è stato uno degli eventi più devastanti nella storia della medicina, stimando circa 20 - 40 milioni di decessi in tutto il mondo a causa della pandemia (Crosby A.W., 1989).

L'origine di questa pandemia è tuttora controversa e sconosciuta, i dati storici ed epidemiologici sono inadeguati per identificare l'origine geografica di questo virus ma è provato che comparve contemporaneamente in 3 distinte aree geografiche nel giro di un anno, rispettivamente in America settentrionale, in Asia e in Europa (la prima ondata è stata descritta dettagliatamente negli Stati Uniti nel Marzo 1918) (Jordan E., 1927).

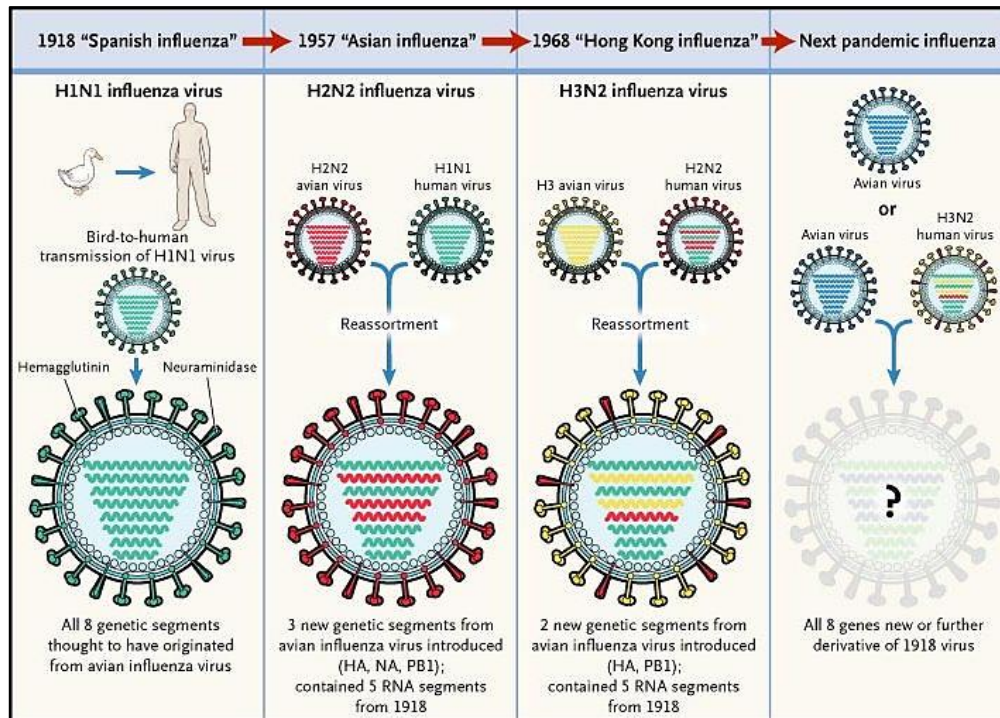


Fig. 4: Meccanismo da cui può originare una pandemia. Il nuovo virus circolato nell'uomo fino al 1968, fino a quando fu sostituito da un altro virus riassortante, il virus H3N2 di Hong Kong - creato dalla sostituzione dei geni della emoagglutinina (H2) e della polimerasi (PB1) del virus H2N2, con due nuovi geni aviari, H3 e una nuova PB1. Oggi, i discendenti di questo virus continuano a causare la maggior parte delle infezioni da influenza negli esseri umani. Cinque dei geni del virus influenzale H3N2 di oggi hanno la loro origine nella pandemia del 1918 (Belshe R., 2005).

La prima ondata si rivelò mite ma si tramutò in una malattia più grave e letale con la seconda ondata. S'ipotizza infatti che nella seconda ondata, il virus abbia infettato i suini nei quali persiste ancora oggi. Solo in America la Spagnola costò la vita a 500,000 persone tra il 1918 e 1919 (Hilleman M.R., 2002) (Klimov A., et al., 1999).

La pandemia fu causata da un virus H1N1 (Taubenberger J.K., et al., 2001) e la caratteristica che l'ha resa unica è stata la capacità del virus di infettare simultaneamente uomini e suini. Il virus della Spagnola infatti probabilmente esprimeva un sottotipo antigenicamente nuovo a cui la maggior parte della popolazione e dei suoni era naïve.

Analisi filogenetiche, supportate anche da studi più recenti, ipotizzano che i geni codificanti per HA e NA del virus della Spagnola derivassero da un virus *avian-like* che era circolato poco nelle decadi precedenti (Reid A.H., et al., 1999).

L'impatto di questa pandemia, però, non è circoscritto solo al 1918-1919. Tutti i virus influenzali pandemici di tipo A da quel momento in poi, e quasi tutti i casi d'influenza A al livello mondiale (ad eccezione delle infezioni umane da virus aviari come H5N1 e H7N1), derivano da discendenti del virus del 1918, includendo virus H1N1 *drifted* e virus H2N2 e H3N2 riassortiti. Gli ultimi infatti sono composti dai "geni chiave" del virus del 1918, aggiornati con successive inclusioni di geni aviari che codificano per nuove proteine di superficie, rendendo così il virus del 1918 "la madre" di tutte le pandemie (Taubenberger J.K. & Moorens D.M., 2006).

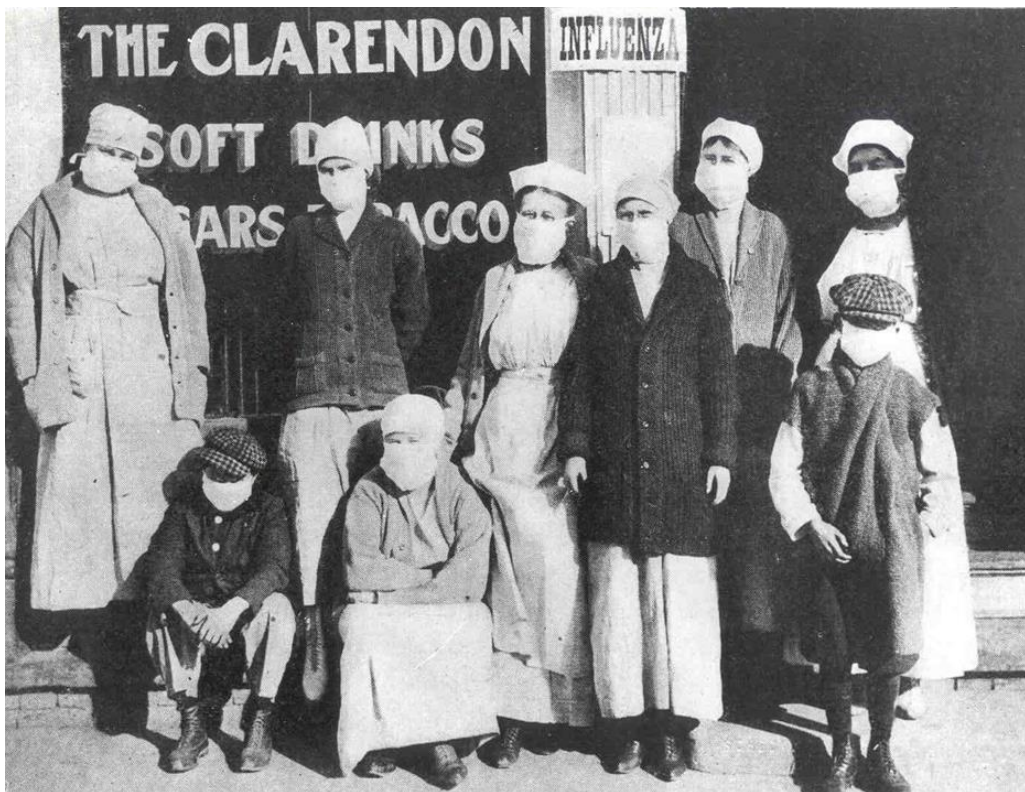


Fig. 5: Foto del 1920. La pandemia influenzale del 1918 ha ucciso fino a 100 milioni di persone in tutto il mondo, sei volte il numero morti causati dalla Prima Guerra Mondiale. (Underwood and Underwood/Time & Life Pictures/Getty Images).

Le altre 2 pandemie verificatesi nel XX secolo risalgono al 1957 e 1968. Quella del 1957, comparsa in Cina, fu determinata da cambiamenti in entrambi gli antigeni (HA e NA) (H2N2) e fu caratterizzata da un alto tasso di malattia e mortalità. Ad eccezione infatti delle persone di età superiore a 70 anni, l'intera umanità si confrontò con un virus con cui non aveva nessuna

esperienza pregressa e il virus, da solo, senza confezioni batteriche, si rivelò fatale (Kilbourne E.D., 2006).

Quella invece del 1968 si presentò nel sud-est asiatico, acquisì il nome di “Hong Kong” sulla base del sito di emergenza, e differiva dall’Asiatica per l’HA ma manteneva la stessa NA (H3N2) (Schulman J.L. & Kilbourne E.D., 1969). Dopo 30 anni, il sottotipo H3N2 ancora persisteva come il più arduo dei virus influenzali di tipo A negli uomini.

Nel 2003 gli esperti nel campo dell’influenza concordavano sul fatto che un’altra pandemia influenzale sarebbe stata inevitabile e probabilmente anche imminente poiché dal 1997 si era verificato un aumento sproporzionale di casi di nuovi sottotipi negli uomini e di specie animali e di uccelli coinvolti (Webby R.J. & Webster R.G., 2003).

Particolare preoccupazione destarono le minacce di possibili pandemie legate all’insorgenza del virus aviario H5N1 nel 1997, del virus H9N2 nel 1999 e del riemergere dello strain H5N1 nel 2003 in concomitanza con il virus H7N1.

Il virus aviario H5 minacciò di emergere come un patogeno umano potenzialmente pandemico a partire dal 1997 quando uccise 6 delle 18 persone infettate. Prima di allora si pensava che la specificità di recettore dei virus aviari rappresentasse un impedimento per la trasmissione diretta agli uomini e che tale trasmissione (dagli uccelli acquatici agli uomini) richiedesse l’infezione di un ospite intermedio che presentasse entrambi i recettori, come ad esempio il maiale. Gli eventi del 1997 dimostrarono, invece, che anche il pollame domestico poteva fungere da ospite intermedio (Webby R.J. & Webster R.G., 2003).

La prima pandemia del XXI secolo, invece, avvenne nel 2009 quando nel mese di Marzo-inizi di Aprile sono stati identificati i primi casi di virus A/H1N1 in Messico e negli Stati Uniti con conseguenza rapida trasmissione mondiale da uomo a uomo del virus (Dawood F.S., et al., 2012). Generalmente la pandemia del 2009 è identificata come “*swine-origin influenza virus*” (S-OIV) o semplicemente influenza pandemica A(H1N1) 2009, questo perché è stato riscontrato che il virus in questione non presentava correlazioni antigeniche con i virus influenzali umani stagionali ma era geneticamente correlato ai virus che circolano nei suini (Girard M.P., et al., 2010).

Il virus della pandemia del 2009 è un esempio di triplo riassortimento (Fig. 6) includendo segmenti da virus umani, aviari e suini (Wang T.T. & Palese P., 2009).

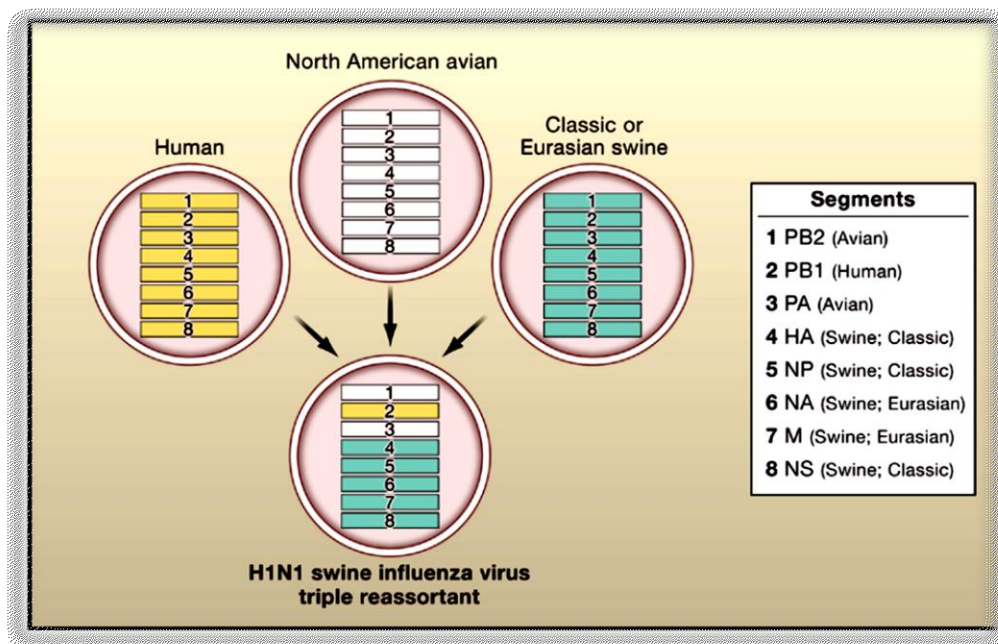


Fig. 6: Lineage dell'influenza pandemica del 2009 (Wang T.T & Palese P., 2009).

Nel Dicembre 2009 più di 208 nazioni e comunità avevano riportato almeno un caso confermato d'influenza pandemica H1N1 con un totale di 622,000 casi confermati e almeno 12,220 decessi anche se pare che il numero dei casi riportati sottostimi il numero reale probabilmente perché molte nazioni hanno avuto difficoltà nel monitorare il numero dei casi.

Fasi della Pandemia

La definizione di pandemia accettata in campo internazionale e presente nel "Dictionary of Epidemiology" la definisce come "un'epidemia che si verifica al livello mondiale, o su una vasta area, superando i confini internazionali e generalmente colpendo un gran numero di persone" (Last J.M., 2001).

L'emergere di un nuovo virus influenzale A che differisce da quelli circolanti deve soddisfare queste 3 caratteristiche:

- deve essere capace di infettare gli uomini;
- deve essere capace di provocare malattia negli uomini;
- deve essere capace di trasmettersi da uomo a uomo in maniera semplice.

Le fasi di una pandemia sono state definite dall'OMS nel 1999 e riviste nel 2005 (WHO, 2009) (Fig. 7). Queste fasi sono applicabili a tutto il mondo e forniscono dei punti di riferimento per

le nazioni nella preparazione in caso di pandemia e nella programmazione di un'adeguata risposta a essa.

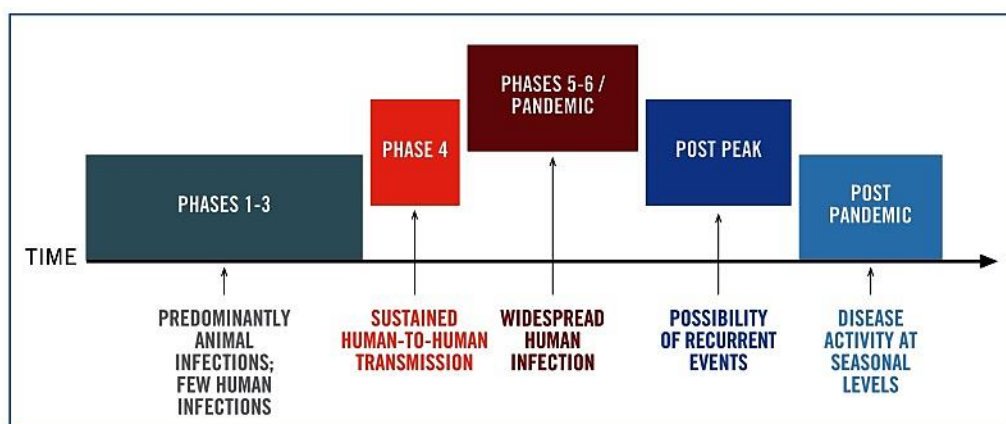


Fig. 7: Fasi di una pandemia per l'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Le fasi di una pandemia sono:

Fase 1: anche se in natura i virus circolano continuamente tra gli animali, specialmente gli uccelli, nella fase 1, nessuno di questi virus ha sviluppato capacità di infettare gli uomini;

Fase 2: virus animali influenzali circolanti tra uccelli selvatici o domestici hanno sviluppato capacità di infettare gli uomini e perciò possono essere considerati come potenziali rischi pandemici;

Fase 3: un virus animale o derivato da un riassortimento tra virus umano e animale ha causato casi sporadici o ha infettato piccoli gruppi di persone, ma la trasmissione uomo-uomo non ha ancora raggiunto livelli tali da poter coinvolgere intere comunità. Casi di trasmissione uomo-uomo si possono verificare in determinate circostanze come ad esempio rapporti ravvicinati con la persona infetta. Una limitata trasmissione di questo tipo non implica che il virus abbia sviluppato dei livelli di trasmissibilità tali da determinare una pandemia;

Fase 4: è caratterizzata da un'accertata trasmissione uomo-uomo di un virus animale, o derivato da un riassortimento tra virus umano e animale, in grado di provare "community-level outbreak". Questo stadio comporta il rischio reale che il virus abbia sviluppato la capacità di determinare una pandemia. Nel caso una nazione si renda conto che si sono verificate le condizioni per dichiarare una fase 4 è necessario che si consulti immediatamente con l'OMS e che implementi le misure di contenimento. La fase 4 indica un aumento significativo nel rischio di una pandemia, anche se non implica che si debba necessariamente verificare;

Fase 5: è caratterizzata da una trasmissione uomo-uomo del virus in almeno 2 nazioni in una delle regioni dell'OMS. Anche se molte nazioni possono non essere coinvolte in questa fase, la dichiarazione di fase 5 è un segnale molto forte di un'imminente possibile pandemia;

Fase 6: la malattia si è diffusa in almeno un'altra nazione oltre a quelle previste nella fase 5. Questa fase indica che una pandemia globale è oramai in corso.

Durante la fase "**post-picco**", sotto un'adeguata sorveglianza sanitaria, si riscontrano diminuzioni dei livelli pandemici, anche se in questa fase non si è sicuri di poter escludere future eventuali ondate e le nazioni devono comunque essere pronte a fronteggiare una seconda ondata pandemica.

Nella fase "**post pandemica**", i livelli influenzali sono paragonabili a quelli dell'influenza stagionale e il virus pandemico si comporta come uno stagionale di tipo A.

Virus dell'influenza aviaria A/H5N1

I virus responsabili dell'influenza negli uccelli possono essere di due tipi: a bassa patogenicità (LPAI) e ad alta patogenicità (HPAI) sulla base di criteri genetici e patogenesi molecolari specifici. La maggior parte dei virus dell'influenza aviaria sono virus LPAI che sono di solito associati con la malattia lieve nel pollame. Al contrario i virus HPAI possono causare malattie gravi e un'elevata mortalità del pollame. Virus LPAI possono trasformarsi in virus HPAI e questo è stato visto in alcuni focolai di pollame. I virus dell'influenza aviaria A dei sottotipi H5 e H7, tra cui H5N1, H7N7 e H7N3, sono stati associati con HPAI e possono causare nell'uomo da lievi patologie con sintomi molto lievi blandi (ad esempio, congiuntivite) a malattia simil-influenzale (come nel caso di H7N3, H7N7) a malattie gravi e fatali (come nel caso di H7N7, H5N1). Esempi invece di virus LPAI che hanno infettato gli esseri umani comprendono H7N7, H9N2 e H7N2.

La maggior parte dei virus aviari sono stati isolati negli animali acquatici (come oche selvatiche e anatre) che sono le principali riserve naturali. Tuttavia molti di essi hanno acquisito la capacità di diffondersi anche nei mammiferi marini, suini, cani, gatti e cavalli. (Loeffelholz M.J., 2011) (Suarez D.L. & Schultz-cherry S., et al, 2000).

Ad oggi sono 5 i sottotipi di AIV (Virus Influenzali Aviari) H1N1, H3N2, H2N2, H1N2 e il virus altamente patogeno H5N1, in grado di replicarsi nelle cellule umane e quindi di causare delle epidemie e/o pandemie.

Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato che alcune cellule del basso tratto respiratorio umano, come gli pneumociti di tipo II, i macrofagi alveolari, le cellule epiteliali cuboidali non ciliate dei bronchioli terminali, esprimono recettori con l'acido sialico (SA) legato al galattosio con un legame α 2,3 (Nicholls J.M., et al., 2007).

In più, eventuali mutazioni a livello del sito di legame per il recettore per l'HA, possono ampliare il legame e alterare la risposta infiammatoria dell'ospite o la virulenza del virus (Ayona-Talavera G., et al., 2009) (Gao Y. et al., 2009) (Mänz B., et al., 2010).

I maiali e alcuni tipi di uccelli presentano sia i recettori con alfa 2-3 SA che i recettori con alfa 2-6 SA (alcuni hanno anche un terzo recettore), quindi un'eventuale co-infezioni di due diversi virus (ad esempio umano e aviario) può dare origine a un nuovo virus riassortito che aumenta la capacità di trasmettersi da animale all'uomo e tra uomo-uomo (Gambaryan A.S., et al., 2008) (Kimble B., et al., 2010).

Questi animali sono suscettibili a tutti i sottotipi di virus influenzali aviari, anche se in natura sono stati isolati solo i sottotipi costituiti da H1- H3 e N1 e N2, con l'eccezione di un H1N7 isolato nel 1994 nei maiali inglesi (Brown I.H., et al., 1994).

Alcuni studi hanno mostrato che la proteina HA può indurre un'autofagia delle cellule epiteliali del polmone, che sembra favorire la diffusione del virus negli atri tessuti (Mänz B., et al., 2010). Un'epidemia del virus A/H5N1 fu registrata per la prima volta nei polli in Guangdong, in Cina nel 1996. Rispetto al virus H5N1 a bassa patogenicità isolato in precedenza nelle oche (1961), questo nuovo strain presentava solo qualche mutazione a livello del gene HA (Medina R.A. & Garcia-Sastre A., 2011).

L'anno successivo, nel marzo del 1997 lo stesso strain H5N1 isolato in Cina, esplose in un'importante epidemia tra i polli in Hong Kong (Centers for Disease Control and Prevention, 1997), che si diffuse pian piano anche nell'uomo, portando a un totale di 18 casi, di cui 6 furono mortali.

Nel 1998 emerse un differente sottotipo di H5N1 e dopo qualche anno di silenzio, nel febbraio del 2003, il virus HPAI A/H5N1 fu nuovamente diagnosticato nell'uomo (Li K.S., et al., 2004). Nel maggio del 2005 più di 6000 uccelli selvatici furono infettati nel lago Qinghai nell'ovest della Cina e durante la stagione migratoria, il virus H5N1 fu diffuso anche in Europa e in Africa negli anni successivi (Lei F. & Shi W., 2011).

Nel 2008 un nuovo sottotipo di H5, che aveva aumentato la sua affinità con i recettori umani, fu isolato in Egitto (Watanabe Y., et al., 2012).

Dal 1996 al 2008 il virus H5N1 aveva subito uno shift antigenico a livello dell'HA, passando da una clade 0 a una clade 2.3 e, nonostante la morbilità rispetto ai virus influenzali stagionali era pressoché simile, il tasso di mortalità era più alto di almeno il 60%.

Dal 2003 al 2012 in 15 differenti paesi, i casi confermati d'infezione da A/H5N1 nell'uomo furono 610, di cui 360 furono mortali (59%) (Yin J., et al., 2013).

Dal 2012 a febbraio 2013, 12 casi confermati di A/H5N1, di cui 8 fatali, sono stati riportati in Cambogia, Cina, Egitto e Indonesia, dove il virus HPAI A/H5N1 è presente nei polli (WHO, 2013). Da Settembre 2013 a Febbraio 2014 i casi confermati di A/H5N1 sono invece 15, di cui 9 fatali, in Cambogia, Canada, Cina, Indonesia e Vietnam. Il virus A/H5N1 è presente in ciascuno di questi paesi, eccetto che in Canada.

Da Dicembre 2003 si sono verificati un totale di 668 casi con 393 decessi in un totale di 16 diversi paesi. Non ci sono comunque dati evidenti che dimostrano l'effettiva trasmissione uomo-uomo.

(WHO, Febbraio 2014, http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/AvianInfluenza/en/)

Il virus A/H5N1, come il virus influenzale stagionale, è isolato soprattutto nei mesi invernali, anche se la migrazione degli uccelli selvatici, che sono ad oggi i principali serbatoi del virus HPAI H5N1, determina la diffusione e la trasmissione del virus negli altri animali, selvatici e domestici, durante tutte stagioni dell'anno (Abdelwhab E.M. et al., 2011).

La maggior parte dei casi d'infezioni riscontrati nell'uomo è il risultato di un'esposizione dell'uomo con polli infetti e al contatto diretto, soprattutto in luoghi chiusi, con soggetti malati (Ungchusak K., et al., 2005).

Studi hanno inoltre reso evidente che alcuni virus A/H5N1 derivati da polli possono attraversare la barriera di specie e replicarsi nelle cellule mammifere senza una mutazione, indicando che i virus aviari possono adattarsi alle cellule mammifere in natura (Suksatu A., et al., 2009).

L'influenza pandemica può emergere da un importante cambiamento delle proprietà antigeniche (*antigenic shift*) delle glicoproteine di superficie HA e NA a causa di riassortimento genetico umano e animale (o di solito aviaria o suina) che produce un nuovo virus influenzale A, il quale è virulento contro gli esseri umani che sono immunologicamente naïve.

È stato osservato che anche lievi variazioni come a livello di 2 aminoacidi del recettore di legame del H5 possono portare a un virus che riconosce in modo efficiente i recettori sulle cellule umane. Il virus aviario A/ H5N1 è particolarmente preoccupante, poiché esso muta rapidamente, può acquisire geni da virus che infettano altre specie animali, ed è già in grado di infettare e causare malattie gravi negli esseri umani

La malattia causata dal virus H5N1 spesso segue un decorso clinico insolitamente aggressivo, con rapido deterioramento e alti tassi di mortalità. Il periodo d'incubazione dell'influenza aviaria H5N1 può essere più lungo (fino a 17 giorni) rispetto a quello per l'influenza stagionale (2-3 giorni).

I sintomi iniziali includono febbre alta e altri simil-influenzali. Diarrea, vomito, dolore addominale e al petto, sanguinamento dal naso e gengive, sono stati segnalati anche come i primi sintomi in alcuni pazienti. Diarrea acquosa senza sangue sembra essere più comune nell'influenza aviaria H5N1 che nell'influenza stagionale. Sintomi del tratto respiratorio inferiore (coinvolgendo talvolta secrezioni respiratorie sanguinose) sono comuni, ma non sempre presenti. Quasi tutti i pazienti sviluppano la polmonite.

L'attuale emergenza d'influenza A/H5N1 nel pollame e negli esseri umani ha generato un livello di allerta ed un aumento degli sforzi di sorveglianza globale e di pianificazione di preparazione in caso di pandemia. La vaccinazione contro la pandemia è considerata l'opzione più efficace per limitare la diffusione di un ceppo pandemico.

Pertanto, vaccini efficaci contro l'influenza aviaria ad alta patogenicità H5N1 virus sono una priorità di salute pubblica urgente e globale.

Vaccini influenzali

Il vaccino è uno delle più importanti scoperte del ventesimo secolo. Il primo che individuò i possibili benefici della vaccinazione fu il Dr Edward Jenner che, nel 1796, dimostrò che inoculando in alcuni individui il vaiolo bovino, poco virulento, era possibile proteggere gli stessi dal vaiolo umano che provocava la morte di una moltitudine di individui. Tramite il vaccino si cerca dunque di rendere gli individui immuni per molto tempo. Per il vaccino influenzale la situazione è diversa perché un individuo che contrae l'influenza non resta immunizzato per gli altri ceppi del virus (Geiger DA., et al., 2006), per questo motivo, prima dell'infezione con il virus si cerca di indurre la sintesi di anticorpi che dovrebbero fermare la sua replicazione (Subbarao K., et al., 2006).

Per la prevenzione e il controllo dell'influenza ci sono una serie di norme igieniche che possono essere rispettate, inoltre vengono utilizzati farmaci influenzali antivirali. Questi possono fornire una risposta veloce contro il virus dell'influenza e sono utili per il contenimento di una eventuale pandemia, ma a lungo termine, il controllo dell'infezione dipende dalla vaccinazione (Geeraedts F., et al., 2010).

Infatti la prima strategia per la riduzione della morbilità e mortalità dell'influenza è la vaccinazione (Nichol KL., et al., 2006).

Il grado di protezione fornito dalla vaccinazione dipende dall'interazione tra la composizione del vaccino e i virus influenzali circolanti, dall'età dei soggetti da vaccinare e la loro precedente esposizione all'influenza (Trombetta CM., et al., 2014).

I vaccini influenzali annuali contengono antigeni da due ceppi influenzali A e B in accordo con le raccomandazioni annuali della *World Health Organization* (WHO). Queste sono basate su una intensa sorveglianza di nuovi ceppi influenzali circolanti nel mondo. (Ghendon Y., 1991)

La *World Health Organization* si avvale ogni anno da febbraio e settembre, di consulenti tecnici, per raccomandare i virus da inserire nei vaccini influenzali di quell'anno in tutto l'emisfero settentrionale e meridionale (WHO, 2013). Quasi ogni anno, nuove varianti di virus appaiono con una differente specificità a livello delle proteine dell'*envelope* (emoagglutinina e neuraminidasi) che aiutano questi a sfuggire alla neutralizzazione di anticorpi che si sono sviluppati durante infezioni o vaccinazioni precedenti. Per questo nella produzione di vaccini influenzali alcuni ceppi virali cambiano ogni anno o due (Ghendon Y., 1991).

Attualmente sono autorizzati due differenti tipi di vaccini per la prevenzione dell'influenza stagionale, uno contenente virus inattivati (TIV) e uno contenente virus vivi attenuati (LAIV). Entrambi i vaccini sono trivalenti, con i tre componenti aggiornati annualmente in base alle esigenze e sulla base delle raccomandazioni nazionali ed internazionali (Fiore AE., et al., 2008). Entrambi i vaccini contengono le varianti antigeniche predominanti di influenza A (H3N2), A(H1N1), e influenza B (Nichol KL., et al., 2006).

Sebbene due linee distinte di virus B (Yamagata e Victoria) sono in circolazione ogni anno, solo una può essere inclusa nel vaccino influenzale stagionale (Monto AS., et al., 2009).

Le differenze fondamentali tra i due vaccini sono la via di somministrazione e la struttura, il TIV è somministrato con un'iniezione intramuscolare, mentre LAIV con una iniezione intranasale. Per quanto riguarda la struttura TIV contiene emoagglutinina pura e neuraminidasi, mentre LAIV contiene virus attenuati; perciò, questi provocano differenti risposte: TIV scatena una più alta risposta anticorpale rispetto a LAIV che invece innesca una più alta risposta mucosale (IgA) che si presenta nel sito in cui il virus entra nel corpo, perciò aiuta a prevenire l'infezione prima che avvenga la replicazione virale (Nichol KL., et al., 2006).

Per quanto riguarda i vaccini interamente inattivati (TIV), che sono quelli maggiormente utilizzati per i vaccini stagionali, possono essere di tre tipi: intero, split e a subunità (Jennings R., et al., 1981).

I vaccini virali interamente inattivati sono la maggior parte delle volte altamente immunogeni. Sono state introdotte, infatti, tecniche per la purificazione del virus, comunque si potrebbero avere reazioni locali e effetti collaterali sistemici associati all'uso di questi vaccini, in maggior misura nei neonati (Ruben FL., 1987).

Nel vaccino split invece il virus viene trattato con detergenti e quindi distrutto, in questo modo i virus presentano minore tossicità per l'uomo.

Nel vaccino a subunità vengono invece purificate le glicoproteine di superficie HA e NA (Jennings R. et al., 1981) (Hilleman MR., 2002).

I produttori di vaccini devono dimostrare che i vaccini siano sicuri ed efficaci nell'uomo, che possano essere realizzati in modo coerente e siano stabili. Devono essere raccolti dati pre-clinici per stabilire le caratteristiche di questo e per assicurare che i potenziali rischi siano compensati dai potenziali benefici.

La sperimentazione clinica di un vaccino è divisa in tre fasi (Fig. 8):

- **FASE 1:** vengono raccolti dati clinici in un numero ristretto di soggetti per determinare la sicurezza e l'immunogenicità del vaccino.
- **FASE 2:** i dati vengono raccolti su un numero relativamente alto di sieri di volontari sottoposti a vaccinazione per ottenere dati di sicurezza aggiuntivi e per capire meglio l'immunogenicità e il range di dosaggio.
- **FASE 3:** vengono eseguiti studi in larga scala che dimostrano definitivamente la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia.

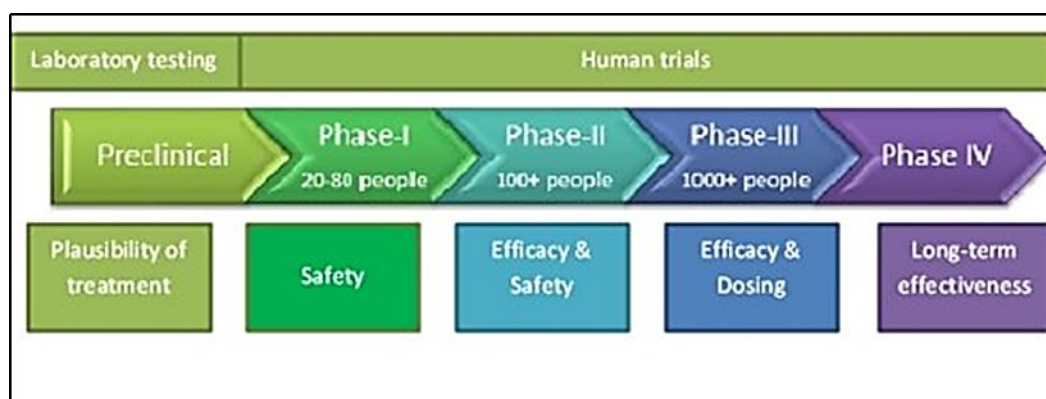


Fig. 8: Fasi che compongono uno studio clinico. (Borradale D., 2013).

Ci deve anche essere un controllo soddisfacente della struttura di produzione dei vaccini prima che possa essere data la licenza di approvazione. Una volta che il vaccino è concesso in licenza si ha la fase IV di farmacovigilanza in cui vengono valutati la sicurezza e l'efficacia dopo la

commercializzazione. Inoltre ispezioni nella struttura di produzione servono a monitorare i vaccini e garantire che continuino a soddisfare i parametri stabiliti durante lo sviluppo del prodotto (Wood JM., et al., 2003).

Nei vaccini influenzali inattivati vengono usati spesso alcuni componenti aggiuntivi, chiamati adiuvanti (dal latino “adiuvare”: aiutare) che potrebbero essere utili per aumentare l’immunogenicità del vaccino.

Gli adiuvanti sono utilizzati principalmente per due ragioni:

1. Migliorare la risposta ad un vaccino nella popolazione generale, aumentando titoli anticorpali o la frazione di soggetti immunizzati.
2. Migliorare i tassi di sieroconversione in popolazioni con un sistema immunitario compromesso, come soggetti malati o che hanno subito interventi chirurgici, anziani e neonati.

Gli adiuvanti hanno un ruolo critico nell’indurre una risposta immunitaria innata, adattativa e una memoria immunologica nei confronti di alcuni antigeni (Lee YT., et al., 2014).

Uno degli adiuvanti utilizzati in vaccini influenzali (Fluad) e in vaccini influenzali pandemici è l’MF59, questo è un’emulsione di olio e acqua, che può stimolare, nel sito dell’infezione, le cellule ad esprimere chemochine e citochine che reclutano cellule della risposta immunitaria innata (APC).

Molte cellule presentanti l’antigene successivamente inglobano il complesso antigene MF59 e migrano ai linfonodi per indurre la risposta immunitaria adattativa (O’Hagan DT., et al., 2012) (Seubert A., et al., 2008).

Nel caso di epidemie/pandemie, la WHO sostiene lo sviluppo di vaccini efficaci e sicuri al fine di limitare il più possibile il diffondersi di quest’ultime. Oltre a valutare il tipo di vaccino e la via di somministrazione più efficaci, di grande importanza sono anche i tempi necessari alla produzione di un vaccino dopo l’inizio di un’eventuale pandemia. La convenzionale tecnologia di produzione del vaccino influenzale consiste nella produzione di un antigene riassortante, ottenuto cioè tramite la co- infezione di uova embrionate di pollo di uno strain circolato durante l’ultima epidemia e uno strain “adattato alle uova” in laboratorio (solitamente è lo strain A/PR/8/34) al fine di aumentare la capacità replicativa nelle uova.

Questa metodica richiede, però, molto tempo e le quantità di antigene prodotto sono molto limitate (generalmente 1 uovo è necessario per la produzione di una dose di vaccino contenente 15 microgrammi di HA).

Nuove tecnologie sono state sviluppate per ottenere una produzione vaccinale rapida e sicura.

L'uso ad esempio di un virus vivo attenuato per lo sviluppo di un vaccino influenzale è stato sperimentato con successo in Russia e negli Stati Uniti (Belshe R., 2008).

Il ceppo di virus influenzale coinvolto in una pandemia è noto solo dopo il verificarsi della pandemia stessa, per questo, i potenziali vaccini possono essere preparati solo dopo l'inizio di una pandemia e dopo che il ceppo è stato identificato.

Nell'Unione europea (UE), la Commissione europea e l'Agenzia europea per i medicinali hanno messo in atto procedure al fine di accelerare la valutazione e l'autorizzazione dei vaccini per l'uso nel corso di una pandemia influenzale. Le principali procedure sono: il mock-up e le procedure di emergenza.

La procedura di mock-up consente di sviluppare e autorizzare un vaccino prima di una pandemia. Essi contengono un ceppo di virus influenzale che ha infettato solo poche persone ma che potrebbe potenzialmente causare una pandemia. I vaccini sono testati per determinare se essi conferiscono protezione contro il ceppo virale di cui sono costituiti. Una volta identificato il ceppo virale responsabile della pandemia, il produttore può includere questo ceppo contenuto nel vaccino mock-up (EMA 2013).

Quattro vaccini 'mock-up' sono attualmente autorizzati nell'Unione europea. Questi possono essere modificati in vaccini pandemici-influenzali in una futura pandemia.

La procedura di emergenza consiste invece nell'approvazione accelerata di un nuovo vaccino messo a punto dopo che una pandemia è stata dichiarata. L'autorizzazione di questi vaccini pandemici è più veloce rispetto ad un vaccino normale, poiché le informazioni fornite dal produttore sono valutate in un lasso di tempo accelerato, circa 70 giorni "attivi" invece dei soliti 210.

Una terza procedura consiste nel modificare vaccini autorizzati per l'uso contro l'influenza stagionale, in modo che possano proteggere anche dall'influenza pandemica.

I vaccini pre-pandemici a oggi disponibili contengono il ceppo virale A/ H5N1 perché gli esperti sanitari ritengono che questo ceppo potrebbe causare la prossima futura pandemia influenzale.

Quattro vaccini pre-pandemici sono autorizzati a livello centrale nell'Unione europea.

Criteria EMA per l'approvazione di un vaccino

Il *Committee for Proprietary Medicinal Products* (CMPC) considera il test di *Haemagglutination Inhibition* (HAI) e il test di *Single Radial Haemolysis* (SRH), le metodiche

standard per la valutazione della risposta anticorpale per l'approvazione di un nuovo candidato vaccino influenzale. (CPMP/BWP/214/96).

Numerosi studi hanno dimostrato la scarsa sensibilità del HAI al virus aviario H5N1 (Profeta ML., 1986), per questo vengono affiancati ai risultati di HAI ed SRH, quelli ottenuti con la metodica di Micro-neutralizzazione (MN). Essa non è una metodica standardizzata e non esistono dei veri e propri cut-off internazionalmente accettati per la valutazione della sieroprotezione. Il cut off ≥ 20 preso in considerazione, è comunque accettato dall'ente Regolatorio (EMA).

L'interpretazione dei risultati si basa sui seguenti criteri:

a) la **sieroconversione**, definita come:

siero pre- vaccinazione negativo e siero post-vaccinazione positivo protetto ($\geq 1:40$ per HAI; area $> 25\text{mm}^2$ per SRH; $\geq 1:20$ per MN)

siero pre- vaccinazione $> 4\text{mm}^2$, tra siero pre-post si deve avere un aumento significativo del titolo anticorpale (almeno del 50%);

b) l'**aumento della media geometrica** del titolo anticorpale dei sieri in pre-e post vaccinazione;

c) la **sieroprotezione** intesa come titolo anticorpale dei sieri in pre e post vaccinazione;

I criteri EMA utilizzati per valutare un nuovo vaccino sono differenti nel caso di soggetti adulti di età compresa tra 18 e 59 anni e nel caso di soggetti adulti maggiori di 59 anni.

Per i soggetti di età compresa tra 18 e 59 anni (adulti), vale almeno uno dei seguenti criteri:

a) il numero di siero-conversioni o l'aumento significativo del titolo anticorpale deve essere $> 40\%$;

b) l'aumento della media geometrica del titolo anticorpale > 2.5 ;

c) la proporzione dei soggetti con un titolo anticorpale maggiore di 25mm^2 (SRH) o di 20 (MN) deve essere $> 70\%$;

Per i soggetti di età superiore a 59 anni, deve essere rispettato almeno uno dei seguenti criteri:

a) il numero di siero conversioni o l'aumento significativo del titolo anticorpale deve essere $> 30\%$;

b) l'aumento della media geometrica del titolo anticorpale > 2.0 ;

c) la proporzione dei soggetti con un titolo anticorpale maggiore di 25 mm² (SRH) o di 20 (MN) deve essere >60%;

SCOPO DELLO STUDIO 1

Lo scopo del primo studio è quello di determinare l'immunogenicità e l'efficacia del vaccino influenzale pandemico diretto contro lo *strain* A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) e di valutarne l'immunità cross protettiva nei confronti di due *strain* influenzali eterologhi: l'A/Turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) e l'A/Anhui/1/2005 (H5N1).

Disegno dello studio

In questo primo studio, condotto nell'Aprile/Maggio 2019, 100 soggetti adulti sani (da 18 a 60 anni) hanno ricevuto due dosi di vaccino con 15 µg o 30 µg di emoagglutinina (HA). Tutti i soggetti hanno ricevuto due iniezioni, a 21 giorni di distanza l'una dall'altra.

È stata valutata l'immunogenicità per lo *strain* omologo A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), utilizzando il test di *Haemagglutination Inhibition* (HAI), quello di *MicroNeutralization* (MN) (MN) e il test di *Single Radial Hemolysis* (SRH). Inoltre, al fine di valutare l'immunità cross-protettiva in entrambe le coorti di soggetti vaccinati, i campioni di siero, sono stati analizzati, per determinare la risposta anticorpale contro due *strain* influenzali eterologhi applicando gli stessi test (HAI, MN, SRH). In dettaglio, sono state testate, le visite di *screening* (Day 1), post prima iniezione (Day 22) e post seconda dose (Day 43) per 100 soggetti che rappresentano entrambe le coorti da 15 µg e 30 µg. I due *strain* eterologhi analizzati, sono: l'A/Turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) e l'A/Anhui/1/2005 (H5N1).

I test sierologici più comuni hanno come target l'emoagglutinina (HA), che è l'antigene più rappresentativo sulla superficie virale, in questo studio però, abbiamo anche analizzato la risposta anticorpale contro la Neuraminidasi (NA), mediante il test *Enzyme Linked Lectin Assay* (ELLA). Questa analisi è stata condotta utilizzando *pseudotypes*, con neuraminidasi di tipo 1 (N1) dello *strain* omologo A/Vietnam /1194/2004 e di quello eterologo A/California/7/2009.

Una prima analisi è stata effettuata considerando la **siero-conversione** offerta dai tre metodi HAI, SRH, MN.

Per ogni metodica i dati sono stati elaborati prendendo in considerazione due coorti distinte:

- dose di vaccino: 15 µg e 30 µg
- gruppi di età: 18-40 e 41-60 anni

Per descrivere il criterio applicato: la sieroconversione in HAI è la percentuale di soggetti con valore basale negativo (titolo HAI <10) che mostra un titolo HAI ≥ 40 dopo due somministrazioni di vaccino (Grafici 1, 2). In SRH, è la percentuale di soggetti con valore basale negativo (area di emolisi <4mm²) che dopo la seconda dose presentano un'area di emolisi ≥ 25 mm² e sono quindi in grado di raggiungere un aumento dell'area di almeno il 50% rispetto a quella basale (Grafici 3, 4).

Il test MN, come descritto in precedenza, non ha un cut-off ufficiale di sieroconversione, pertanto, quest'ultimo, è stato valutato in base agli studi precedenti condotti per i virus influenzali H5N1 (Ehrlich HJ., et al., 2008). La sieroconversione in MN è quindi, la percentuale di soggetti con valore basale negativo (titolo MN <10) e titolo MN alla terza visita ≥ 20 (Grafici 5, 6).

Le percentuali rappresentate nei grafici si riferiscono al numero di soggetti presenti nelle due coorti: 15µg / 30 µg sono rappresentati da 50 soggetti ciascuno, mentre le fasce di età 18-40 / 41-60 sono composte, rispettivamente, da 53 e 47 soggetti.

Nella seconda analisi viene valutata la **siero-protezione**, dopo le due dosi di vaccino e per tutti i ceppi virali in tutti i metodi di studio precedentemente illustrati (Grafico 7).

Il totale dei 100 soggetti è presentato in termini di tasso di siero-protezione al giorno 43: in HAI (titolo post-vaccinazione ≥ 40), SRH (alone di emolisi post-vaccinazione ≥ 25 mm²) e MN (titolo post-vaccinazione ≥ 20).

Infine, i risultati ELLA presentano la risposta anticorpale contro la neuraminidasi. In particolare, sono state osservate due NA: N1 dell'A/Vietnam/1194/2004 e N1 dello *strain* eterologo A/California/7/2009.

Questi dati sono mostrati in termini di aumento del titolo della media geometrica (GMT) per ogni visita (*Day 1, Day 22, Day 43*), considerando le coorti di 15 µg / 30 µg, riportate nel Grafico 8 per l' A/Vietnam e nel Grafico 9 per l' A/California e i gruppi di età 18-40 e 41-60, corrispondenti al Grafico 10 per l' A/Vietnam e il Grafico 11 per l' A/California.

In fine, sono mostrati, i GMT (grafico 12) di ogni visita per entrambi gli *strains*, al fine di presentare la differenza nel rilevamento del titolo anticorpale per i due tipi di neuraminidasi.

MATERIALI E METODI

Haemagglutination Inhibition (HAI):

Questo metodo tradizionale per l'identificazione degli isolati influenzali, originariamente descritto da Hirst (1942) e poi modificato da Salk (1944), sfrutta la tendenza dell'HA dei virus influenzali di legarsi ai globuli rossi (RBC) causando la loro agglutinazione. Quando gli anticorpi si legano ai siti antigenici sulla proteina HA, questi siti diventano bloccati e quindi non disponibili per il legame con i globuli rossi. (Fig. 9) La conseguente inibizione dell'emoagglutinazione è la base per il test HAI (Hirst G.K., 1941). Il titolo anticorpale HAI è espresso come il reciproco della maggiore diluizione che mostra completa inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando quattro o otto unità di emoagglutinazione virale (Goodeve A.C., 1983) (Hannoun C., et al., 2004).

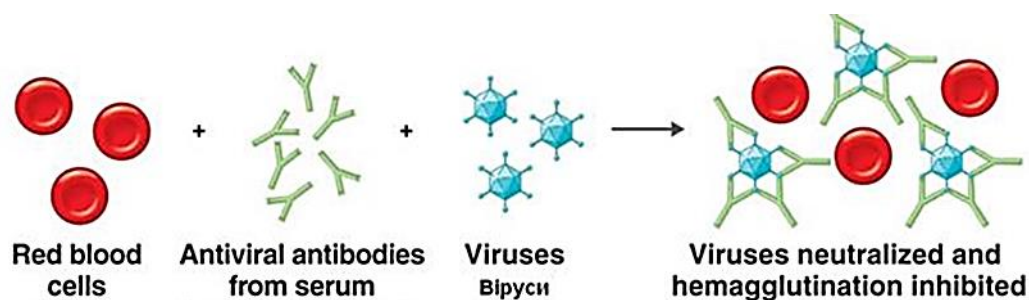


Fig. 9: Rappresentazione del test HI.

La maggior parte dei risultati indicano che dopo la vaccinazione (vaccino inattivato) i titoli in HAI compresi tra 30 e 40 conferiscono protezione dall'infezione nel 50% dei vaccinati (Hobson D., et al., 1972), mentre gli anticorpi compresi nell'intervallo da 120 a 160 proteggono circa il 90% dei soggetti (Hannoun C., et al., 2004) (Hinshaw V.S., et al., 1981).

Il test HAI è considerato il "*gold standard*" per la valutazione dell'immunogenicità e rimane il test di scelta per la sorveglianza dell'influenza e per la determinazione delle caratteristiche antigeniche dei ceppi virali influenzali. Gli svantaggi del test HAI includono la necessità di rimuovere gli inibitori non specifici di emoagglutinazione che si trovano naturalmente nel siero, la necessità di standardizzare gli antigeni ogni volta che è eseguito un test e la necessità di competenze specializzate nella lettura dei risultati del test. Tuttavia, il test HAI è sensibile, facile da eseguire, richiede attrezzature e reagenti poco costosi ed è molto affidabile se fatto correttamente.

La metodica HAI è relativamente insensibile alla misurazione dei titoli anticorpali anti-H5. Una maggiore sensibilità è stata ottenuta sostituendo i classici globuli rossi di tacchino o pollo con quelli di cavallo, anche se la metodica non è stata ancora standardizzata. Infatti la specificità del recettore dei virus influenzali è correlata con la capacità di agglutinare i globuli rossi di specie diverse. I virus umani si legano preferenzialmente agli oligosaccaridi contenenti acido N-acetilneuraminico $\alpha 2,6$ -galattosio (NeuAc $\alpha 2,6$ Gal), mentre i ceppi d'influenza aviaria e di equini legano a NeuAc $\alpha 2,3$ Gal. Molte specie animali, tra cui il cavallo e la mucca, hanno elevate quantità di recettori per NeuAc $\alpha 2,3$ Gal ma nessun NeuAc $\alpha 2,6$ Gal. Globuli rossi di pollo hanno meno NeuAc $\alpha 2,6$ Gal e più NeuAc $\alpha 2,3$ Gal, globuli rossi di tacchino hanno più NeuAc $\alpha 2,6$ Gal (Hirst G.K., 1941). Pertanto, H1 stagionale e virus influenzali H3 preferenzialmente agglutinano i globuli rossi del tacchino, mentre i virus aviari agglutinano preferenzialmente globuli rossi di cavallo o di mucca, anche se la specificità si riduce con l'aumentare dell'età degli eritrociti e si consiglia di utilizzare il sangue solo entro una settimana dopo la raccolta (Stephenson I., 2006), (Profeta M.L., 1986).

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Phosphate saline Buffered (PBS) 0,01 M, pH 7,2;
- Sodium Chloride (NaCl) (0.85% NaCl);
- Soluzione di globuli rossi di tacchino (RBCs) allo 0,5% disciolti in PBS;
- Receptor Destroying Enzyme of Vibrio Cholerae (RDE), Denka, disciolti in PBS;
- Antiseri iperimmuni di pecora (NIBSC);
- Siero negativo umano privato di IgM, IgG, IgA;
- Antigeni virali propagati in uova embrionate di pollo inattivati tramite una soluzione di formaldeide al 37 % in H₂O, contenente 10-15% metanolo;

Protocollo dell'HAI

Il test HI è stato condotto in micro-piastre da 96 pozzetti con il fondo a V. È stato utilizzato sangue di tacchino alla concentrazione finale di 0,5%. Il sangue è stato lavato e centrifugato con PBS per tre volte. Il pellet ottenuto è stato risospeso in PBS per ottenere la concentrazione appropriata, di sospensione di globuli rossi, da impiegare.

Il test è diviso in vari step: titolazione del virus, trattamento sieri, rilevamento agglutinine aspecifiche e test HI. Di seguito vengono descritti i vari passaggi.

Titolazione del virus

Prima di iniziare il test è necessario conoscere il titolo emoagglutinante dell'antigene impiegato. Ad una micro-piastra a 96 pozzetti sono stati aggiunti 50 μ l PBS (pH 7,2), nei pozzetti da 2 a 12 di ciascuna fila (es. A2–A12 fino a H2–H12) escluso la prima. In quest'ultima, sono stati aggiunti 100 μ l di antigene ai primi pozzetti delle file A–F (es. A1–F1). L'antigene è stato pre diluito 1/10 e 1/100 (Fig.10).

In piastra è stato inserito anche un controllo, in solo pozzetto della fila H (H1), contenente solo la soluzione di globuli rossi e il PBS.

Sono state eseguite diluizioni seriali in base 2 trasferendo 50 μ l, dai primi pozzetti della prima fila, alle successive. Dopo questo step sono stati aggiunti 50 μ l, della soluzione di globuli rossi, a ciascun pozzetto. Le piastre sono state agitate manualmente per 10 secondi e lasciate a temperatura ambiente per 30 minuti.

Quando nella fila di controllo, contenente globuli rossi e PBS, tutte le cellule si sono depositate (all'incirca dopo 30 minuti) è iniziata la lettura delle piastre.

Le piastre sono state lette inclinandole con un angolo di 45°. Se i globuli rossi depositati in fondo “si allungavano” o formavano una goccia, contemporaneamente ai pozzetti di controllo, venivano considerate negative per l'emoagglutinazione.

Il titolo emoagglutinante, end-point, è definito come il reciproco della più alta diluizione del virus che riesce ad agglutinare completamente i globuli rossi, quindi, i pozzetti che mostrano una parziale emoagglutinazione (+/-) sono considerati negativi.

Nel test HAI sono aggiunte, a ciascuna diluizione del siero, 4 unità emoagglutinanti dell'antigene. Essendo stati aggiunti 25 μ l dell'antigene, a ciascun pozzetto, è necessaria una diluizione che contenga 4 unità emoagglutinanti in 25 μ l (equivalente a 8 unità in 50 μ l). Quindi, per calcolare la diluizione dell'antigene necessaria per il test, il titolo emoagglutinante, calcolato in 50 μ l, è stato diviso per 8.

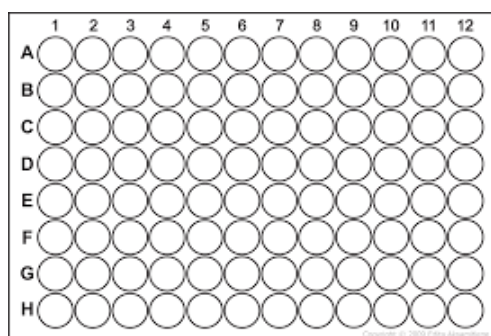


Fig. 10: Rappresentazione di una piastra per titolazione e test HI.

Trattamento dei sieri con RDE

Al fine di inattivare inibitori non specifici, che normalmente sono presenti nel siero, ciascun siero, compresi un controllo negativo ed uno positivo, è stato prima trattato con RDE. Sono stati aggiunti 3 volumi di RDE a 1 volume di siero. I sieri sono stati messi ad incubare overnight a $37\pm 1^\circ\text{C}$ in bagnetto e successivamente a $56 \pm 1^\circ\text{C}$ per 30 minuti, per inattivare permanentemente l'RDE rimanente. Infine, sono stati aggiunti 6 volumi di soluzione fisiologica ogni volume di siero. La diluizione finale dei sieri è quindi 1:10.

Rivelazione di agglutinine non-specifiche in sieri trattati con RDE e assorbimento

Per capire se nel siero sono presenti agglutinine aspecifiche è stato fatto un test. Sono stati aggiunti 25 μl di PBS (pH 7.2) a tutti pozzetti delle file da B a H e 50 μl , di ciascun siero trattato con RDE, ai primi 11 pozzetti della fila A. Al primo pozzetto della colonna 12 sono stati aggiunti 50 μl di PBS come controllo negativo.

Sono state eseguite diluizioni seriali in base 2 trasferendo 25 μl dal primo pozzetto delle colonne 1-12 ai successivi pozzetti di ciascuna colonna. Sono stati aggiunti 25 μl di PBS a tutti pozzetti e subito dopo 50 μl di soluzione di globuli rossi.

La presenza di agglutinine aspecifiche è stata valutata dopo 30 minuti. Quando il siero presentava aspecifici i pozzetti contenenti PBS, siero diluito e sangue formavano una goccia, contemporaneamente al pozzetto di controllo. Questo a dimostrazione del fatto che nel siero erano presenti agglutinine che potevano dare falsi negativi nel test HI.

Per i sieri aventi aspecifici, lo step successivo è stato quello di rimuoverli mediante l'assorbimento con il sangue. Ogni venti volumi di siero viene aggiunta una parte di pellet di globuli rossi. I sieri stati incubati successivamente a 4°C per un'ora e centrifugati a 1200 rpm per 10 minuti. Il siero assorbito stato rimosso è stato trasferito in un'altra eppendorf cercando di non intaccare il pellet di sangue.

Dopo aver verificato se sono ancora presenti agglutinine aspecifiche, eseguendo nuovamente il test (come sopra elencato), il siero è stato usato nel test HI.

Fasi operative del test

Prima di iniziare il test è stata fatta la titolazione della soluzione di antigene preparata, per capire se contenesse 4 HAU/25 μl (come descritto nella titolazione del virus).

Una volta accertati che la concentrazione fosse giusta, sono stati aggiunti 25 μl di PBS in tutta la piastra eccetto che nella prima colonna della prima fila dove sono stati aggiunti i sieri trattati (diluiti 1:10) (Fig.11). Sono state condotte diluizioni in base 2 dei sieri e successivamente aggiunti 25 μl di antigene diluito a 4 HAU/25 μl a tutti i pozzetti. Dopo 15 minuti è stata dispensata la soluzione di globuli rossi di tacchino allo 0,5%. È stata preparata anche una piastra

di controllo, contenente sieri di controllo positivi e negativi, specifici del ceppo in esame. Questi sono diluiti in piastra come i campioni.

Dopo 30 minuti, le piastre sono state lette. I titoli HI sono stati registrati come il reciproco della più alta diluizione di siero che riesce completamente ad inibire l'agglutinazione dei globuli rossi. Il risultato corrisponde al titolo HI.

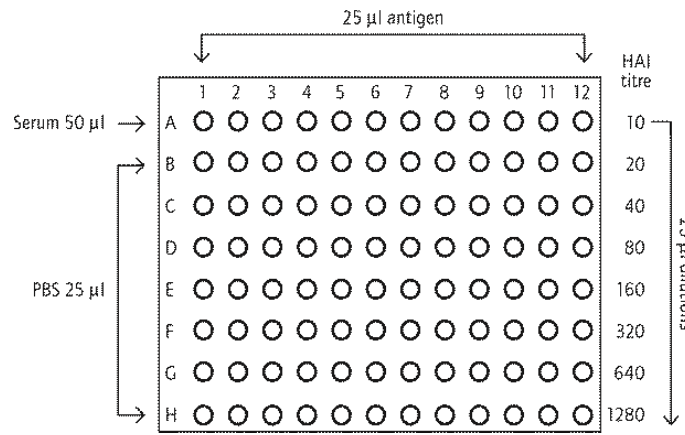


Fig. 11: Profilo schematico di come seminare una piastra per il test HI.

Single Radial Haemolysis (SRH):

La metodica “*Single Radial Haemolysis*” (SRH) è una tecnica sierologica sviluppata nel 1975 (Schild G.C., et al., 1975) che combina i vantaggi di altri 2 test immunoenzimatici, rispettivamente “*Single Radial Diffusion*” (SRD) e “*Hemagglutination Inhibition*” (HAI).

Questa tecnica si basa sulla diffusione anticorpale in gel per determinare la presenza o assenza di anticorpi nei campioni analizzati. L'emolisi, mediata dal complemento e indotta dal complesso antigene-anticorpo, produce una “zona di emolisi”, facilmente individuabile, la cui misura è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti influenza presenti nel campione (Fig. 12A-12B). SRH identifica non solo anticorpi diretti verso il virus influenzale ma anche verso altri numerosi virus come i coronavirus, i virus para influenzali, i virus Dengue e Japanese Encephalitis (Chan Y.C., et al., 1985)

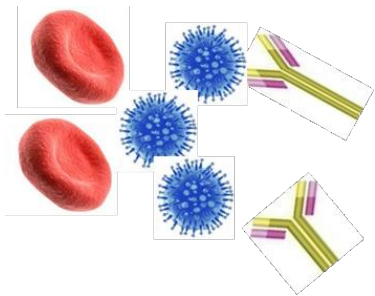


Fig.12A: *Complesso antigene-anticorpo causa emolisi*

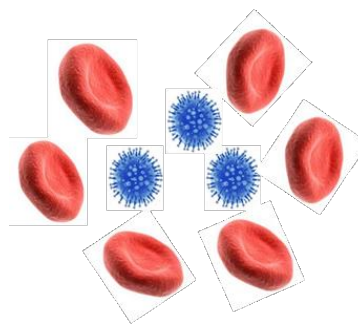


Fig.12B: *Assenza anticorpi no emolisi*

Il grande vantaggio di questa tecnica è la sua sicurezza perché a differenza della Micro neutralizzazione (MN) che richiede un virus vivo, SRH prevede l'utilizzo di un virus inattivato. Quest'aspetto si è rivelato particolarmente utile nel caso dei virus aviari come il H5N1 perché i test di laboratorio possono essere eseguiti in biosicurezza 2 (Wood J.M., et al., 2001). Altre caratteristiche importanti sono rappresentate dall'essere una tecnica economica, veloce, affidabile, riproducibile e i risultati, ottenuti dopo un'incubazione overnight, si esprimono numericamente il che implica che non sono soggetti all'interpretazione dell'operatore (Chan Y.C., et al., 1985).

In più la metodica SRH permette di analizzare contemporaneamente un gran numero di campioni, che non richiedono nessun trattamento particolare se non un'inattivazione del complemento e la quantità necessaria è estremamente esigua.

In seguito all'emergere dei virus aviari e alla scarsità di utilizzo dell'HAI perché sottostimava la risposta immunitaria verso questi virus (Nicholson G., et al., 2001), la metodica SRH è stata ampiamente usata negli studi clinici come tecnica adatta e specifica per rilevare anticorpi umani diretti contro i virus influenzali aviari.

Questa tecnica è ufficialmente riconosciuta dall'*European Medicines Agency* (EMA) (EMA, 2013) e quindi universalmente utilizzata per studi d'immunogenicità di ciascun nuovo vaccino influenzali stagionale e pandemico.

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Gel di agarosio low gelling temperature;
- Gel di agarosio;
- Cromo (III) cloruro esaidrato (CrCl_3)1M;
- Complemento di Guinea Pig;

- Tampone fosfato salino (PBS);
- Sodio azide (NaN₃);
- Globuli rossi di tacchino al 50% in Alsever;

Preparazione dei reagenti

Tampone fosfato salino (PBS):

La soluzione viene preparata disciogliendo una tavoletta di PBS in 200 ml di acqua distillata e sterilizzata con l'autoclave a 121° per 20 minuti.

Gel di agarosio 1,5% contenente 0,01% di Sodio Azide:

Si ottiene disciogliendo in 100ml di PBS: 1 g di agarosio, 0,5 g di agarosio low gelling e 0,1g di Sodio Azide (NaN₃). La soluzione viene fatta bollire per ottenere la completa solubilizzazione di agarosio nel PBS.

Cromo (III) cloruro esaidrato (CrCl₃) 1M:

2,66 g di CrCl₃ vengono aggiunti a 10 ml di acqua distillata.

Sospensione di globuli rossi 10-13%:

Vengono centrifugati 5 ml di stock solution di globuli rossi al 50% in Alsever per 15 minuti a 1600rpm, viene prelevato il sopranatante e il pellet di globuli rossi viene sospeso con 10 ml di tampone PBS. La soluzione viene centrifugata di nuovo per 15 minuti a 16000rpm e il sopranatante viene eliminato. Una volta prelevata la quantità di globuli rossi necessaria per la prova, questa viene risospesa in tampone PBS per avere una concentrazione finale pari a 10-13%.

Complemento Guinea Pig:

Viene preparato sul momento secondo le indicazioni del fornitore e non può essere riutilizzato. Si trova in forma liofilizzata.

Protocollo dell'SRH

La prova viene eseguita su piastre di polistirolo compresso di dimensioni di 70 × 22 mm e volume di 3cc per il gel di agarosio, in cui sono stati ottenuti non più di 20 pozzetti.

Il test si compone di due step: titolazione del virus, fasi operative del test vero e proprio.

Titolazione del virus

Prima di iniziare il test, è necessario valutare l'attività emoagglutinante della soluzione virale da utilizzare nel dosaggio degli anticorpi. Tale valutazione può essere effettuata mediante un metodo operativo definito macro metodo. Questo metodo si basa sulla reazione di emoagglutinazione dei globuli rossi, causata dal virus influenzale e rilevabile ad occhio nudo. Il virus influenzale, infatti si lega ai recettori di acido sialico presenti sulla superficie dei globuli rossi, creando un reticolo formato da globuli rossi aggregati.

Le fasi del macro metodo sono le seguenti: si preparano 4 file da 15 tubi e si mettono 250 μ l di soluzione salina in tutti i tubi eccetto il primo di ogni fila; si preparano due diluizioni in base 10 (1/10 e 1/100) di antigene virale (Ag); si trasferiscono 500 μ l di Ag diluito 1/10 nel primo tubo delle prime due file, così da poter fare una valutazione in duplicato. Quindi si trasferiscono 250 μ l del contenuto del primo tubo di ciascuna fila al secondo tubo, fino ad arrivare all'ultimo tubo della fila, i 250 μ l avanzati nell'ultimo tubo vengono scartati. La stessa procedura viene eseguita per l'Ag diluito 1/100.

Vengono, poi, aggiunti 250 μ l della soluzione di globuli rossi allo 0,35% ad ogni tubo. Segue un'incubazione di 60 minuti a temperatura ambiente.

Al fine di verificare la capacità emoagglutinante del virus vengono fatti due tipi di controlli. Per il controllo positivo, vengono preparati 4 tubi, costituiti da Ag non diluito con un egual volume di globuli rossi. Per il controllo negativo si preparano 4 tubi contenenti globuli rossi incubati con un volume equivalente di soluzione salina.

Il controllo positivo deve mostrare completa emoagglutinazione, in caso contrario la soluzione virale non è sufficientemente concentrata.

Per la valutazione del titolo si calcola la media geometrica del logaritmo dell'inverso della diluizione dell'ultimo tubo in cui è ancora visibile la presenza di emoagglutinazione per entrambe le diluizioni iniziali (1:10 e 1:100). Il valore ottenuto viene utilizzato come esponente di 10 e corrisponde al titolo del virus.

Conoscendo il titolo del virus, si può calcolare la diluizione dell'Ag al fine di utilizzare il virus nel test SRH con un titolo di 2000 HAU/ml.

Per ottenere 2000 HAU/ml moltiplico il titolo ottenuto in 250 μ l per 4 per averlo in ml e poi si divide per 2000. Il valore risultante è il reciproco della diluizione da eseguire sull'antigene di partenza.

Fasi operative del test

Il test SRH prevede come primo passaggio, l'inattivazione del complemento endogeno sui sieri da testare, i quali vengono inattivati grazie ad un'incubazione per 30 minuti a 56° C. Successivamente sarà aggiunta una quantità di complemento animale che generalmente è di *Guinea Pig*.

La prova viene eseguita su piastre di polistirolo compresso di dimensioni di 70 × 22 mm e volume di 3cc per il gel di agarosio, in cui sono stati ottenuti non più di 20 pozzetti.

Per ogni piastra vengono utilizzati:

- 0,3 ml di sospensione di globuli rossi al 10-13 %;

- 2,55 ml di gel di agarosio 1,5% in PBS;
- Sodio Azide (NaN_3);
- 0,3 ml di CrCl_3 2,5mM;
- 0,15ml di *Guinea Pig*.

All'inizio per ogni piastra, vengono sottoposti a incubazione 0,3 ml di globuli rossi di tacchino al 10-13% con 0.3 ml di antigene diluito alla concentrazione di 2000 UE/ml. Il tutto viene incubato a +4°C all'incirca per 20 minuti. Dopo la prima incubazione vengono aggiunti 0,3 ml di CrCl_3 (Cloruro di Cromo) 2,5mM e viene posto ad incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Trascorso il tempo, la miscela viene centrifugata per 15 minuti a 1600rpm. Il sopranatante viene eliminato ed il pellet di ogni piastra, viene risospeso con 0,27 ml di soluzione tampone PBS.

Si passa poi alla preparazione di una matrice di gel di agarosio all'1,5%, il quale è un composto disciolto in PBS che comprende agarosio, agarosio *low gelling temperature*, per rallentare il processo di gelificazione a temperatura ambiente e Sodio Azide (NaN_3) che è un conservante battericida. Inoltre al suo interno conterrà: globuli rossi di tacchino sensibilizzati con 2000HAU/ml di virus e una soluzione di CrCl_3 che è necessario per stabilizzare il legame tra l'antigene e l'eritrocita. Il terreno solido viene mantenuto in un bagnetto a bagnomaria alla temperatura di 47,5°C.

Come detto in precedenza, a questo punto al gel viene aggiunto il complemento di Guinea Pig. Per ogni piastra si distribuiscono 3ml di sospensione. Si incuba tutto per 30 minuti a temperatura ambiente e poi per 10 minuti a +4°C.

Una volta solidificato il gel, mediante un punzone calibrato, vengono applicati 20 fori in tutte le piastre, i quali hanno un diametro di 2,25mm.

Nei primi 18 pozzetti vengono seminati i sieri in esame, 6µl in ogni foro, che diffondono nel gel. Negli ultimi due pozzetti si seminano i controlli.

Il controllo positivo è rappresentato dall'antisiero di riferimento corrispondente al ceppo utilizzato e corrisponde ad un siero di pecora iperimmune. Il controllo negativo invece sarà siero umano privo di IgG/IgA/IgM.

Le piastre vengono poi incubate in una camera umida per 16 ore a +4°C e successivamente a 37°C per 90 minuti.

Trascorso il tempo necessario se nel siero ci saranno anticorpi specifici per il ceppo virale, questi si attaccano ai globuli rossi, si attiverà il complemento che andrà ad emolizzare l'eritrocita e sarà così possibile evidenziare degli aloni.

Il diametro della zona di emolisi verrà evidenziato mediante uno strumento o con calibro millimetrato, quindi il diametro sarà ottenuto in millimetri che poi successivamente saranno convertiti in area.

Prima di procedere alla lettura del test è necessario accertarsi che il controllo negativo non presenti alcun alone di emolisi, mentre quello dove è stato seminato il controllo positivo deve presentare un alone di emolisi superiore a 25mm².

Il diametro delle zone di emolisi è proporzionale alla quantità di anticorpi contenuta nel campione.

In accordo con le linee guida dell'EMA (*European Medicines Agency*) sono considerati negativi i sieri che non presentano nessun alone di emolisi e cioè con un area < 4 mm², mentre sono positivi ma non protetti quelli con area di emolisi compresa tra 4 mm² e 25 mm² e infine sono considerati protetti i sieri con area di emolisi ≥25mm².

MicroNeutralization (MN):

Il saggio di micro neutralizzazione è un test molto sensibile e specifico per la rilevazione di anticorpi neutralizzanti specifici per i virus influenzali presenti nel siero umano e animale, potenzialmente è compresa anche la determinazione di anticorpi umani per sottotipi aviari. La micro neutralizzazione dà la risposta più precisa alla questione di, se o meno, un individuo presenta anticorpi in grado di neutralizzare l'infettività di un determinato ceppo virale. Il test ha diversi vantaggi supplementari al fine di ricercare gli anticorpi diretti contro i virus influenzali. In primo luogo, rileva principalmente anticorpi contro la proteina HA virale influenzale, è quindi in grado di identificare gli anticorpi funzionali ceppo-specifici nel siero umano e animale. In secondo luogo, poiché è utilizzato un virus infettivo, il dosaggio può essere fatto rapidamente dopo la comparsa di un nuovo virus riconosciuto. Sebbene i test convenzionali di neutralizzazione di virus influenzali (basati sull'inibizione della formazione dell'effetto citopatico in coltura cellulare MDCK) siano laboriosi e piuttosto lenti, un saggio di micro neutralizzazione con lettura dell'effetto citopatico (CPE) per rilevare le cellule infettate da virus può produrre risultati entro 5 giorni. Il test di micro neutralizzazione per il virus dell'influenza si basa sul presupposto che gli anticorpi sierici neutralizzanti contro l'HA virale inibiscano l'infezione virale delle cellule MDCK. Un siero diluito serialmente deve essere pre-incubato con una quantità standardizzata di virus prima dell'aggiunta delle cellule. Dopo l'incubazione, che può durare dai 3-5 giorni, è osservato l'eventuale effetto citopatico prodotto dal virus (Fig.13).

L'assenza d'infettività costituisce una reazione di neutralizzazione positiva e indica la presenza di anticorpi specifici del virus nel campione di siero. In caso di malattia simil-influenzale, sono preferiti i campioni di siero nella fase acuta e in quella di convalescenza. Un campione nella fase acuta deve essere raccolto entro sette giorni dall'inizio dei sintomi mentre quello nella fase di convalescenza almeno 14 giorni dopo il campione acuto, e preferibilmente entro 1-2 mesi dalla comparsa della malattia. Un aumento del titolo anticorpale di almeno 4 volte dimostra una sierconversione. Nel caso in cui si testino solo campioni di siero in singolo, bisogna fare attenzione nell'interpretare titoli bassi, come 20 e 40. In generale, è necessaria la conoscenza dei titoli anticorpali in una popolazione di controllo di pari età per determinare il titolo minimo che è indicativo di una risposta specifica degli anticorpi virus impiegato nel test (WHO, Maggio 2013)

Il protocollo di micro neutralizzazione è quindi diviso in tre parti:

Parte I: Determinazione della dose infettante la coltura tissutale (TCID₅₀).

Parte II: Test micro neutralizzazione.

Parte III: Lettura CPE.

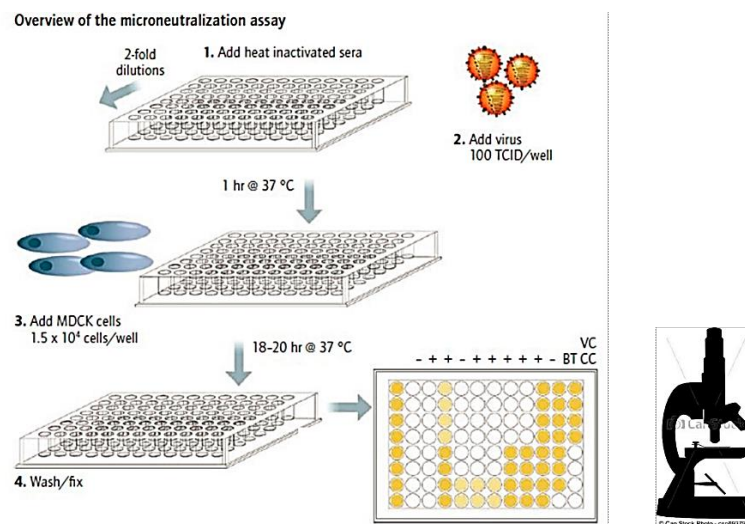


Fig.13: Una rappresentazione schematica del test micro neutralizzazione

La micro neutralizzazione è molto sensibile per la *detection* degli anticorpi H5 ma è una metodica laboriosa e necessita il maneggiamento del virus vivo e quindi anche di strutture più sofisticate (*Biosafety laboratory level 3*) (Scheda 1).

Test	Caratteristiche generali	Trattamento sieri	Letture
SRH	Facile da standardizzare	I sieri non devono essere pretrattati e pre-diluiti	non richiede personale altamente qualificato. I risultati sono quantificabili numericamente
HI	Necessita di reference e antigeni standardizzati Facile da eseguire	I sieri devono essere pretrattati	Necessita di operatori esperti per la lettura del test
MN	Non permette un grande numero di campioni contemporaneamente E' un test più laborioso Richiede l'utilizzo di virus vivo	I sieri devono essere inattivati per distruggere naturali inibitori presenti nel siero	Necessita di 4-5 giorni di incubazione prima della lettura e di operatori specializzati.

Scheda 1: Caratteristiche generali dei saggi di SRH, HI e MN.

Già da qualche anno, numerosi studi si sono concentrati per la costruzione di particelle virali di *Pseudotypes* (PPT) (Temperton N.J., et al.; 2007). Essi si basano su un processo noto come "pseudo-tipizzazione", in cui proteine essenziali retrovirali (GAG) possono interagire con glicoproteine derivate da altri virus capsulati e assemblati in particelle infettive.

Gli *Pseudotypes* esprimono HA che sono state incubate con diluizioni seriali del siero umano e i titoli anticorpali possono essere determinati con metodi diversi:

- Saggio d'infezione: infettività è stata valutata mediante inoculazione di cellule bersaglio e quantificati tramite un test basato sulla luciferasi;
 - Analisi Western Blot su sovranatanti e lisati cellulari;
 - FACS analisi su cellule transfettate per misurare il livello di espressione dell'antigene HAII
- Il principale vantaggio del dosaggio PPN è che non richiede l'utilizzo del virus wild-type che nel caso di H5N1 è spesso difficile da ottenere e pericoloso da manipolare e può essere eseguita in BSL2. Queste particelle subiscono le fasi d'infezione che includono l'attaccamento, la fusione, la trascrizione inversa, l'integrazione e l'espressione del gene reporter, ma non possono formare progenie infettiva perché sono privi dei geni virali necessari per diverse fasi del ciclo vitale del virus. Il PPT è prontamente adattabile e può essere facilmente standardizzato tra diversi laboratori al fine di permettere una valutazione rapida e semplice della risposta cross-neutralizzante mediante *pseudotypes* (Alberini I., et al., 2009).

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Coltura cellulare di cellule *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK);

- Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Lonza);
- Medium UltraMdcck serum free;
- Trypsin-EDTA (Lonza);
- Antiseri iperimmuni di pecora (NIBSC);
- Siero negativo umano privato di IgM, IgG, IgA;
- Antigene *wild type* propagato in uova embrionate di pollo da VisMederi.

Protocollo dell'MN

La Micro Neutralizzazione è una metodica molto laboriosa a confronto del test HAI ed è sensibile e specifica. Permette di valutare la più alta diluizione di siero che riesce ad inibire l'azione citopatica del virus che contiene 200-300 dosi infettanti.

Il test prevede tre fasi: la preparazione della sospensione cellulare, la titolazione del virus e la micro neutralizzazione.

Preparazione della sospensione di cellule MDCK

La sospensione cellulare impiegata nel test è costituita da cellule MDCK ad una concentrazione di 2×10^5 cellule/ml sospese in un medium non contenente siero (UltraMDCK Serum free). Per il mantenimento delle cellule vengono utilizzate fiasche da 175cm² che sono state portate ad una confluenza del 70-80%. Queste cellule il giorno del test sono state staccate dalla fiasca, secondo procedura, ed è stata preparata una sospensione cellulare.

Una volta preparata la sospensione, a fine test, è stata dispensata 100 µl per pozzetto.

Titolazione del virus

Per lo studio preclinico il virus utilizzato è stato propagato in uova embrionate di pollo e successivamente utilizzato nel test in un livello di contenimento adeguato. Il virus impiegato, infatti, era un virus wild type non inattivato.

Il titolo iniziale del virus è stato valutato mediante la metodica del Tissue culture infective dose (TCID₅₀) su cellule MDCK, che indica la più alta diluizione del virus che provoca effetto citopatico nel 50% delle cellule contenute nel pozzetto ed è indicato come TCID₅₀/ml.

La titolazione del virus è stata eseguita in una piastra a 96 pozzetti a fondo piatto, Sono state eseguite delle diluizioni seriali in base 10 del virus, con un terreno non contenente siero. Ogni pozzetto della piastra viene riempito con 180 µl di terreno eccetto la colonna 11; la colonna 12 di ogni piastra è generalmente usata come controllo cellule per monitorare la crescita del monostrato cellulare in assenza di virus. Sono stati aggiunti 20 µl di virus madre ad ogni primo pozzetto della colonna 1, al fine di raggiungere una diluizione iniziale di 1:10. Nel controllo cellule sono stati aggiunti 100 µl di terreno e altrettanti di cellule.

La lettura della TCID50 è stata osservata dopo 4 giorni per valutare l'effetto citopatico. L'effetto citopatico (CPE) è stata valutato utilizzando un microscopio ottico osservando la più alta diluizione di virus in grado d'indurre un effetto citopatico al monostrato cellulare.

A questo punto il titolo virale è stato calcolato utilizzando la formula di Spearman/Karber

$$TCID50 /100 \mu l = X0-d/2+d(\sum Xi/n)$$

X0: logaritmo positivo della più alta diluizione del virus in cui si ha un effetto citopatico

d: step diluizione in scala logaritmica (base 10)

$\sum Xi$: la somma di tutti i pozzetti che presentano un effetto citopatico ad iniziare da X0

Step operativi per il test di Micro Neutralizzazione

Prima d'iniziare il test i sieri sono stati inattivati al calore (56°C) per 30 minuti. Questi, sono stati testati in duplicato in due differenti micro-piastre da 96 pozzetti a fondo piatto.

Per eseguire il test bisogna conoscere il titolo del virus (che si ottiene come descritto sopra). La soluzione di virus impiegata nel test conteneva 2000 TCID50/ml (103,3). Il fattore di diluizione è stato ottenuto dividendo il titolo del virus madre per il titolo che deve avere la soluzione virale impiegata nel test.

Il test è stato eseguito posizionando la piastra in verticale (Fig. 14) e riempiendo tutti i pozzetti, eccetto le colonne A, G e H, con 50 μ l di terreno non contenente siero, mentre tutti i pozzetti della colonna H di ciascuna piastra, sono stati utilizzati come controllo cellule (CC) (100 μ l di terreno più 100 μ l di cellule). Il controllo è stato usato per monitorare la crescita del tappeto cellulare.

Sono stati aggiunti 10 μ l di siero al primo pozzetto della colonna A, in modo da partire da una diluizione iniziale di 1:10. Sono state eseguite delle diluizioni seriali in base 2.

Alla fine, a tutti i pozzetti, eccetto le colonne G e H, è stata aggiunta la soluzione virale contenente 2000 TCID50/ml.

Le piastre sono state incubate per 1 ora a 37°C e 5% di CO₂. Allo scadere del tempo sono state dispensate 100 μ l di sospensione cellulare, a tutti i pozzetti contenenti virus-siero, in tutta la piastra esclusa la colonna G.

Parallelamente alla prova è stata eseguita una titolazione di riprova del virus, usato come controllo del titolo del virus madre.

Al termine del periodo d'incubazione, ogni piastra è letta mediante un microscopio ottico per valutare la presenza di effetto citopatico (CPE). Quando vengono comparati con il controllo, i

pozzetti che mostrano CPE sono considerati positivi (infetti), mentre i pozzetti che non mostrano CPE sono definiti “negativi” (protetti).

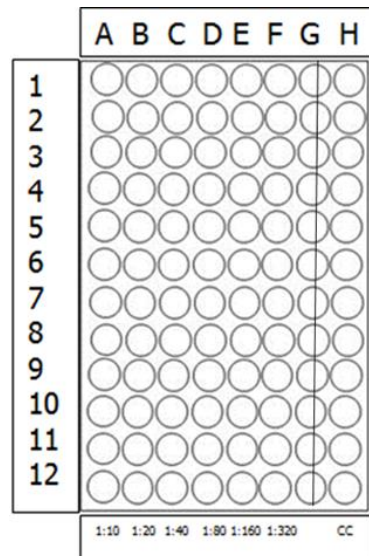


Fig. 14: Profilo schematico di una piastra MN in orientamento verticale.

Calcolo dei risultati

Il titolo di neutralizzazione (Nt), per ogni duplicato del siero, è calcolato secondo la formula di Spearman-Kärber:

$$X = \frac{V}{2} \cdot 2^{\left(\frac{N_{neg}}{8} + 0,5\right)}$$

X = titolo di neutralizzazione

V = diluizione di partenza del siero nel test (diluizione del siero + sospensione virale nel rapporto 1: 1)

Nneg = numero di risultati negativi su una piastra

R= numero di ripetizioni del siero in piastra

L’Nt, nel test, è stato calcolato come la diluizione per mezzo della quale il 50% dei pozzetti sono protetti dall’effetto citopatico. Nel caso in cui nessun pozzetto presentava protezione, quindi tutti i pozzetti presentavano CPE, il titolo di neutralizzazione era determinato come l’esatta metà del titolo che risulterebbe se un unico pozzetto fosse stato protetto.

Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA):

Gli anticorpi inibitori della neuraminidasi (NA), la seconda proteina di superficie più abbondante sui virus influenzali, sono associati alla protezione contro l'influenza e sono correlati con riduzione dei sintomi e della diffusione virale. Questi anticorpi contribuiscono all'immunità inibendo il rilascio e la diffusione di particelle virali di nuova formazione da cellule ospiti infette. Nonostante l'importanza accertata degli anticorpi anti-NA (NI), questi titoli erano raramente misurati, sia negli studi sierologico-epidemiologici che negli studi clinici per rilascio di vaccini influenzali, poiché il tradizionale test dell'acido tiobarbiturico (TBA) precedentemente usato per quantificare questi anticorpi ha una scarsa efficienza e non è applicabile ad una prolungata routine di laboratorio. Questo ha imposto lo sviluppo di metodiche alternative e tra queste un test che sfrutta la capacità della Lectina di riconoscere un prodotto di reazione enzimatica (Couzens L., et al., 2009)

È stato sviluppato, per questo motivo, il test ELLA (Enzyme Linked Lectine Assay), messo a punto negli anni 90' da Lambè e poi ottimizzato da Couzens nel 2014 e da Westgeest nel 2015. Esso si basa sulla capacità della neuraminidasi di scindere i residui di acido sialico dalla fetuina, che viene utilizzata come substrato; restano così scoperti i residui di galattosio che vengono poi riconosciuti dalla lectina marcata con HRP; questo permette di quantificare i titoli di anticorpi neutralizzanti, i quali hanno mostrato la capacità di essere specifici, di legarsi alla NA e di inibirne così l'attività. ELLA è considerato un metodo affidabile e ad alto rendimento per misurare gli anticorpi NI nei sieri umani (Pavlova S., et al., 2017).

Poiché gli anticorpi specifici per HA nei sieri umani possono mascherare la NA, compromettendone l'accesso al substrato, è essenziale che il virus impiegato possieda un sottotipo HA non circolante in uomo, oppure che il virus sia trattato perché l'HA non possa esprimere sue proprietà antigeniche.

La fetuina, che agisce da substrato per la NA, è uno zucchero che viene fissato sulla superficie delle micro-piastre (96 pozzetti) e che viene riconosciuto dall'antigene NA in mancanza di anticorpi inibenti l'attività della neuraminidasi.

La NA esprime la propria attività enzimatica scindendo le frazioni terminali di acido sialico della fetuina, così viene determinato il titolo NA, proporzionale alla quantità di galattosio che viene esposto in posizione terminale a causa del clivaggio dell'acido sialico. Tale quantificazione si ottiene mediante reazione della Lectina (*Peanut agglutinin*, PNA) coniugata con perossidasi (HRPO) che possiede elevata specificità per il galattosio terminale (Fig.15).

In seguito, un substrato per la perossidasi (OPD) mette in evidenza il legame tra PNA-HRPO e Galattosio, mediante una reazione colorimetrica misurabile come densità ottica (OD) a 490 nm e proporzionale all'attività di NA (Westgeest KB., et al., 2015).

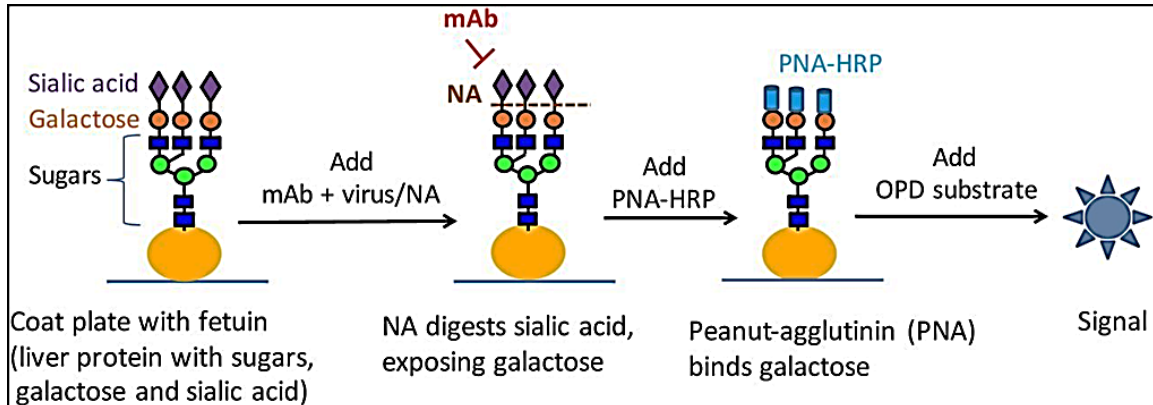


Fig.15: Principio alla base del test ELLA.

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Coating buffer 10 X
- Fetuin
- Tween 20
- Dulbecco's PBS with 0.9 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂
- BSA 30%
- Peanut agglutinin-peroxidase conjugated (PNA-HRPO)
- PBS pH 7.4 with Tween 20
- O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in pasticche
- Soluzione di citrato con sodium perborate
- Acido Solforico (H₂SO₄) 1N
- Triton-X 100
- Neuraminidasi: (virus mismatch/neuraminidasi purificata/virus trattato/pseudotypes)

Preparazione dei reagenti

Coating buffer 10 X

Diluire 10 ml di coating buffer con 90 ml H₂O deionizzata per ottenere 1X coating buffer.

Fetuin stock solution (25mg/ml)

Dissolvere la fetuina nel coating buffer 1X per avere 25 mg/ml di soluzione e conservare le aliquote a -20 °C.

Fetuin working solution (25µg/ml)

Preparare subito prima del coating delle piastre, diluire le aliquote di fetuina (stock solution) 1:1000 in una soluzione di coating buffer 1X fino ad ottenere una soluzione di fetuina 25µg/ml.

Fetuin-coated Plates

Aggiungere in ogni pozzetto 100µl della soluzione di fetuina; coprire con una cover trasparente e conservare queste a 2-8 C° fino al loro uso (devono essere conservate per 24-48 h prima dell'uso e possono essere usate entro 2 mesi).

Sample Diluent

Aggiungere 3.3ml 30% Bovine Serum Albumin (BSA) e 0.5ml Tween 20 ad 96ml Dulbecco's 1X PBS con 0.9mM CaCl₂ e 0.5mM MgCl₂ per ottenere una soluzione finale al 1% BSA e 0.5% Tween 20.

Conjugate Diluent

Aggiungere 3.3ml 30% Bovine Serum Albumin (BSA) a 97 ml Dulbecco's 1X PBS con CaCl₂ e MgCl₂

PNA-HRPO

Lectin from Arachis hypogea (peanut)-Peroxidase; dissolvere 1 mg in 1 ml di conjugate diluent e conservare le aliquote a -20°C in diversi volumi fino all'uso; preparare un'appropriata diluizione di PNA-HRPO (solitamente 1:1000) in conjugate diluent.

Wash buffer Solution

Dissolvere ogni bustina di PBS pH 7.4 con Tween 20 in 1 litro di H₂O per ottenere 0.01M PBS, pH 7.4, 0.05% Tween 20 (PBS-Packet);

O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) Substrate Solution (deve essere preparato ~30 minuti prima della fine delle 2 ore di incubazione nel Day 2)

Preparare prima la soluzione di citrato con sodio perborato dissolvendo 1 capsula in 100 ml di H₂O il giorno del test, dissolvere 1 pasticca di OPD (10 mg) in 20 ml di citrate buffer subito prima dell'uso.

Stop Solution

Aggiungere 27ml stock 98% acido solforico in 973ml di H₂O per ottenere una soluzione finale di 1N Sulfuric acid.

Protocollo dell'ELLA

La prova viene eseguita su piastre a 96 pozzetti (Nunc Maxi Sorp); il test si svolge in due giorni consecutivi.

Giorno 1

Le piastre, precedentemente trattate con la soluzione a base di glicoproteina fetuina (coating solution), sono state lavate per 3 volte con 300 μ l di soluzione di lavaggio per ciascun pozzetto e quindi tamponate su carta assorbente per eliminare i residui.

Il sample diluent è stato distribuito nella piastra (volume 50 μ l) in corrispondenza dei pozzetti della colonna 1 (A-H) e delle colonne da 3 a 11 (A-H).

In corrispondenza della colonna 2 (A-H) sono stati distribuiti 90 μ l di sample diluent e 10 μ l di siero (diluizione 1:10), da cui sono partite le diluizioni seriali nei successivi pozzetti trasferendo 50 μ l, fino alla colonna 11, e scartando quindi i 50 μ l di soluzione in eccesso. Il virus diluito secondo il fattore di diluizione appropriato, è stato aggiunto in quantità standard ad ogni pozzetto della piastra, esclusi i pozzetti dedicati al controllo di background della colonna 12 (A-H) che contenevano esclusivamente 100 μ l di sample diluent. Mentre i pozzetti della colonna 1 sono stati destinati al “controllo virus” del test.

Le piastre ricoperte da cover sigillanti sono state poste in incubatore umidificato a 37°C per 18 ore.

Giorno 2

Le piastre rimosse dall'incubatore, sono state lavate con 300 μ l di soluzione lavaggio per 6 volte utilizzando un lavatore automatico per rimuovere tutti i residui della reazione e la soluzione virale in eccesso. Quindi 100 μ l di soluzione PNA-HRPO sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, per permettere l'eventuale reazione tra Lectina e Galattosio. Per la fotosensibilità dell'HRPO, le piastre sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente al buio.

Il successivo lavaggio con lavatore automatico, di nuovo per 3 volte con wash solution, è stato eseguito per rimuovere la soluzione di PNA-HRPO.

Per mettere in evidenza la reazione sono stati quindi aggiunti 100 μ l di substrato OPD, in grado di reagire con l'HRPO eventualmente presente; questa reazione è stata arrestata dopo 10-15min di incubazione a temperatura ambiente e al buio, con 100 μ l di acido solforico (1N) aggiunti ad ogni pozzetto. La reazione colorimetrica prodotta è stata valutata tramite registrazione della densità ottica fornita da uno spettrofotometro che assorbiva a 490nm.

Calcolo dei risultati

Il calcolo dei risultati è determinato dal titolo del punto finale del 50%.

Viene determinato il valore medio di tutti i risultati OD ottenuti per i pozzetti di controllo dei virus della piastra e il 50% di questa media rappresenta il limite per discriminare la presenza di NI. Il reciproco dell'ultima diluizione che si traduce in almeno il 50% di inibizione del segnale massimo è il titolo NI.

RISULTATI

Lo scopo del primo studio è quello di determinare l'immunogenicità e l'efficacia del vaccino influenzale pandemico diretto contro lo *strain* A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), utilizzando i principali test sierologici per l'analisi immunologica di un vaccino, come il test HAI, MN, SRH e il test ELLA. È stata, inoltre, valutata l'immunità cross protettiva nei confronti di due *strain* influenzali eterologhi: l'A/Turkey/ Turkey/1/2005 (H5N1) e l'A/Anhui/1/2005 (H5N1).

Nei seguenti grafici vengono riportati i risultati ottenuti dalle 4 metodiche utilizzate, sia per lo *strain* omologo, che per i due eterologhi.

Vengono mostrati i dati di sieroconversione per dose di vaccino ricevuta (30 o 15 µg) e per gruppo di età (18-40; 41-60) e i dati di sieroprotezione in tutte le metodiche e per tutti gli *strain* analizzati.

Successivamente, verranno riportati i grafici di correlazione tra i risultati ottenuti in HAI, MN e SRH.

Risultati HAI

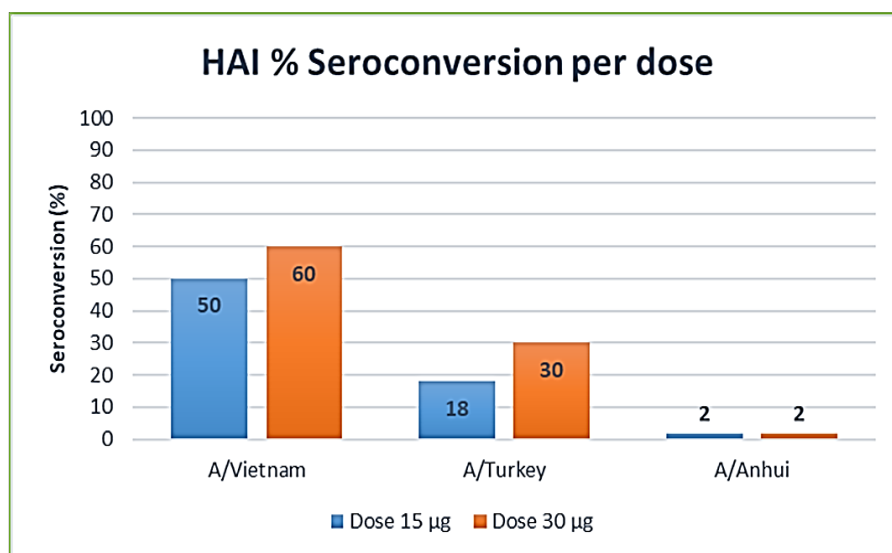


Grafico 1: Tasso di sieroconversione in HAI (≥ 40) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti sono stati vaccinati due volte con 15µg o 30µg di vaccino contro l'A/Vietnam/1194/2004.

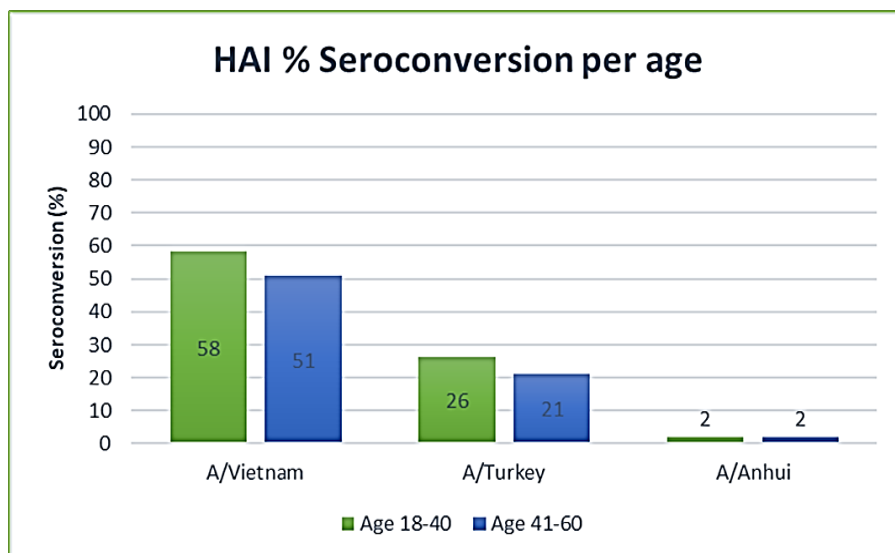


Grafico 2: Tasso di sieroconversione in HAI (≥ 40) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti appartengono a due gruppi di età: 18-40 e 41-60.

Da questi primi due grafici possiamo notare prima di tutto la maggiore risposta nei confronti dello *strain* omologo, rispetto ai due eterologhi; per quanto riguarda la dose di vaccino ricevuta, quella da 30 μg sembra fornire un vantaggio nella risposta per lo *strain* omologo, A/Vietnam, ma anche e soprattutto per quello eterologo A/Turkey/Turkey; l'A/Anhui sembra invece non beneficiare di nessuna delle due dosi. Nel grafico 2 notiamo che non c'è una differenza significativa nella risposta dei due gruppi di età differenti.

Risultati SRH

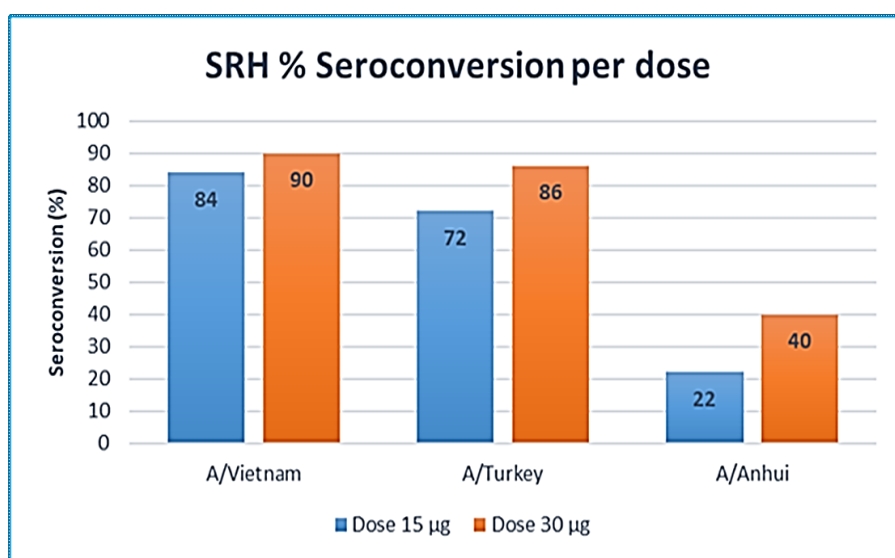


Grafico 3: Tasso di sieroconversione in SRH ($\geq 25\text{mm}^2$) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti sono stati vaccinati due volte con 15 μg o 30 μg di vaccino contro l'A/Vietnam/1194/2004.

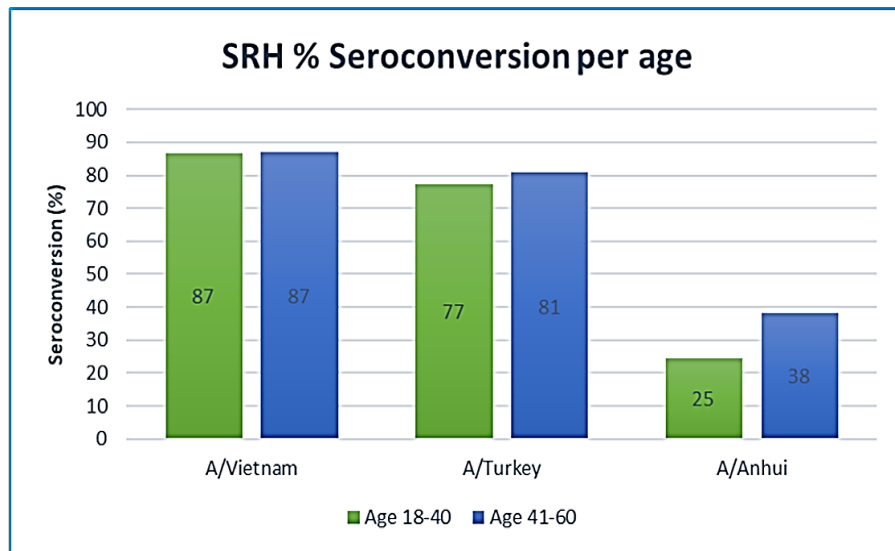


Grafico 4: Tasso di sieroconversione in SRH ($\geq 25\text{mm}^2$) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti appartengono a due gruppi di età: 18-40 e 41-60.

Possiamo notare, come la metodica SRH sia in grado di riconoscere anticorpi in maniera molto sensibile, a discapito, però, della specificità; notiamo, infatti, una forte risposta sia nei confronti dell'A/Vietnam ma anche dell'A/Turkey/Turkey e, sebbene in misura minore, dell'A/Anhui; per quanto riguarda la risposta dose-dipendente (grafico 3), vediamo che quella da 30 μg fornisce un vantaggio nella risposta per tutti e tre gli *strain*, soprattutto per l'A/Anhui; per quanto riguarda, invece, la risposta età-dipendente (grafico 4), l'A/Vietnam non mostra alcuna differenza nella risposta tra i due gruppi di età, lo stesso vale per l'A/Turkey/Turkey, si può notare invece, per l'A/Anhui un leggero aumento nella risposta del gruppo di età 41-60.

Risultati MN

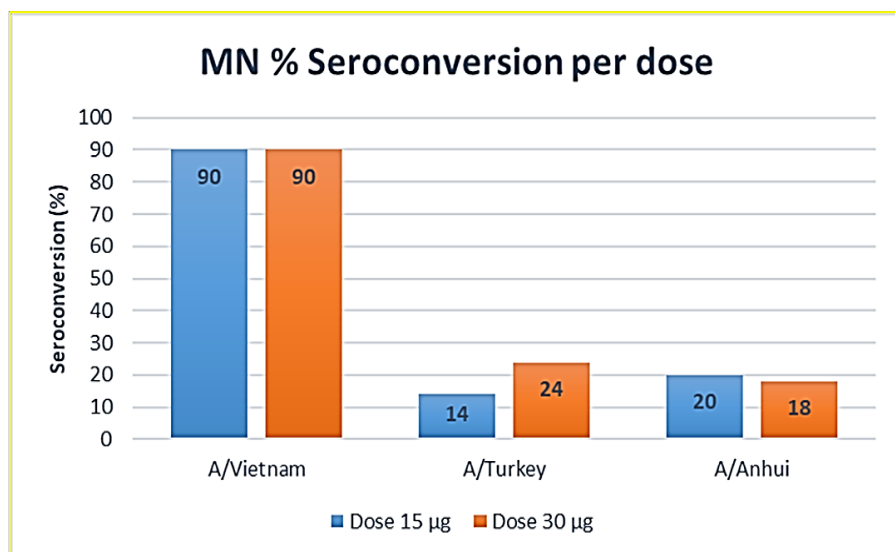


Grafico 5: Tasso di sieroconversione in MN (≥ 20) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti sono stati vaccinati due volte con 15 μ g o 30 μ g di vaccino contro l'A/Vietnam/1194/2004.

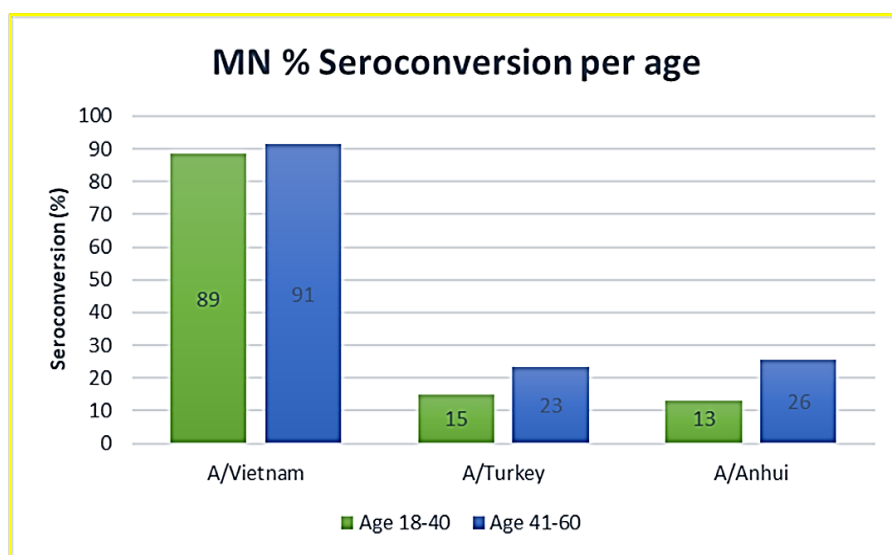


Grafico 6: Tasso di sieroconversione in MN (≥ 20) per A/Vietnam/1194/2004, A/Turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005; i soggetti appartengono a due gruppi di età: 18-40 e 41-60.

Il test MN ha la caratteristica di rilevare anticorpi neutralizzanti anti-HA, in maniera veramente specifica, infatti, entrambi i grafici 5 e 6, evidenziano una forte risposta contro lo *strain* omologo A/Vietnam, mentre per i due eterologhi la risposta è nettamente inferiore; per quanto riguarda la risposta dose-dipendente (grafico 5), vediamo che per l'A/Vietnam non c'è differenza tra le due dosi di vaccino, ma quella da 30 μ g sembra fornire un leggero aumento della risposta contro lo *strain* A/Turkey/Turkey; nel grafico età-dipendente (grafico 6), notiamo che, l'A/Vietnam non mostra differenza nella risposta tra i due gruppi di età, sembra, invece, esserci un incremento di risposta per i due *strain* eterologhi nel gruppo di età 41-60.

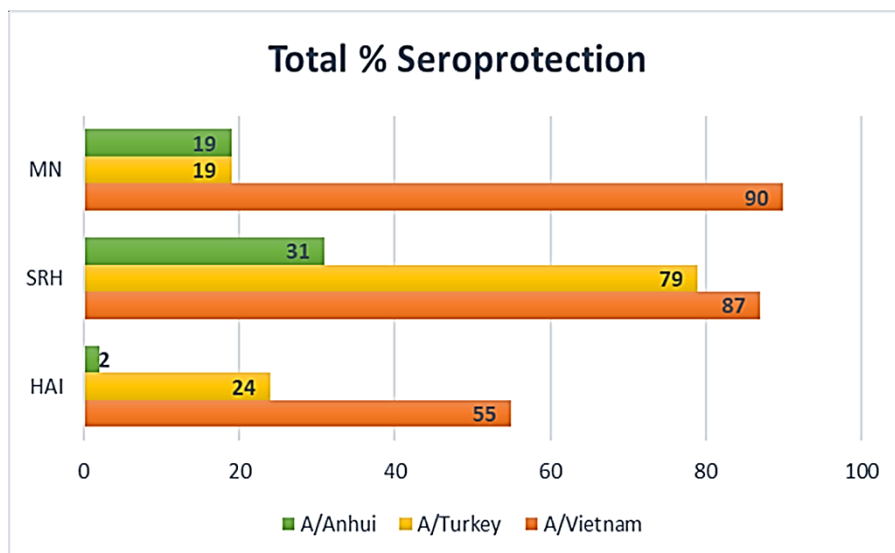


Grafico 7: Tasso di sieroprotezione in HAI (≥ 40), SRH ($\geq 25\text{mm}^2$) e MN (≥ 20) per A/Vietnam/1194/2004, A/turkey/Turkey/1/2005 e A/Anhui/1/2005 per tutti i soggetti analizzati.

Questo grafico ci mostra il totale dei soggetti che hanno mostrato un incremento significativo del titolo anticorpale dopo la somministrazione di due dosi di vaccino e sono quindi da definirsi siero protetti. Possiamo notare la predominanza della risposta contro lo *strain* omologo A/Vietnam in tutte e tre le metodiche utilizzate, anche se i dati ottenuti dagli *strain* eterologhi sono soddisfacenti, soprattutto la risposta contro l'A/Turkey/Turkey.

Risultati ELLA

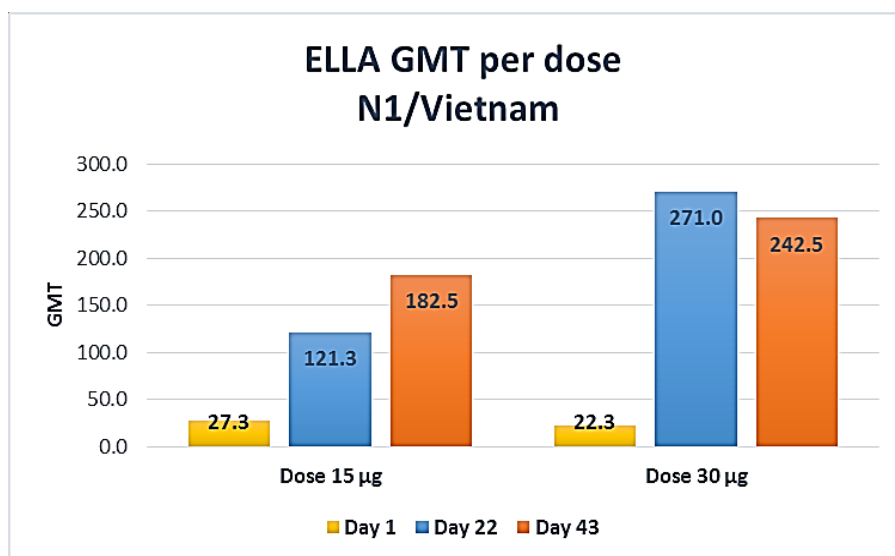


Grafico 8: Titolo della Media Geometrica per A/Vietnam/1194/2004 (N1), i soggetti sono stati vaccinati due volte (al Day 1 e Day 22) con 15µg o 30µg di A/Vietnam/1194/2004.

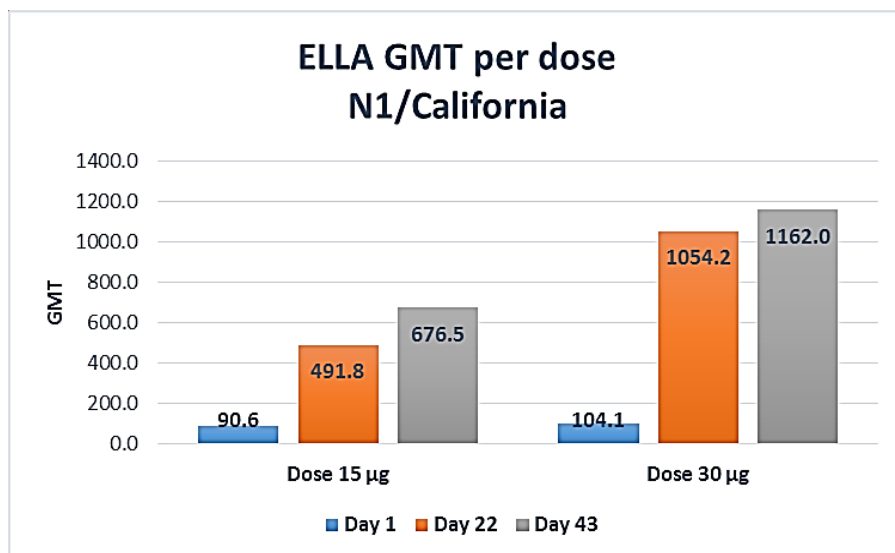


Grafico 9: Titolo della Media Geometrica per A/California/7/2009 (N1), i soggetti sono stati vaccinati due volte (al Day 1 e Day 22) con 15µg o 30µg di A/Vietnam/1194/2004.

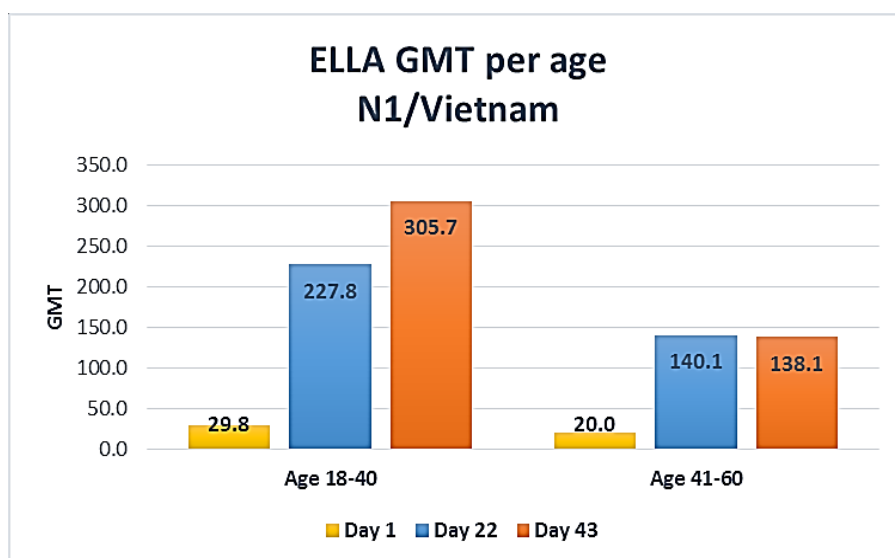


Grafico 10: Titolo della Media Geometrica per A/Vietnam/1194/2004 (N1), i soggetti sono divisi nei due gruppi di età 18-40 e 41-60 e vaccinati due volte (al Day 1 e Day 22) con 15µg o 30µg di A/Vietnam/1194/2004.

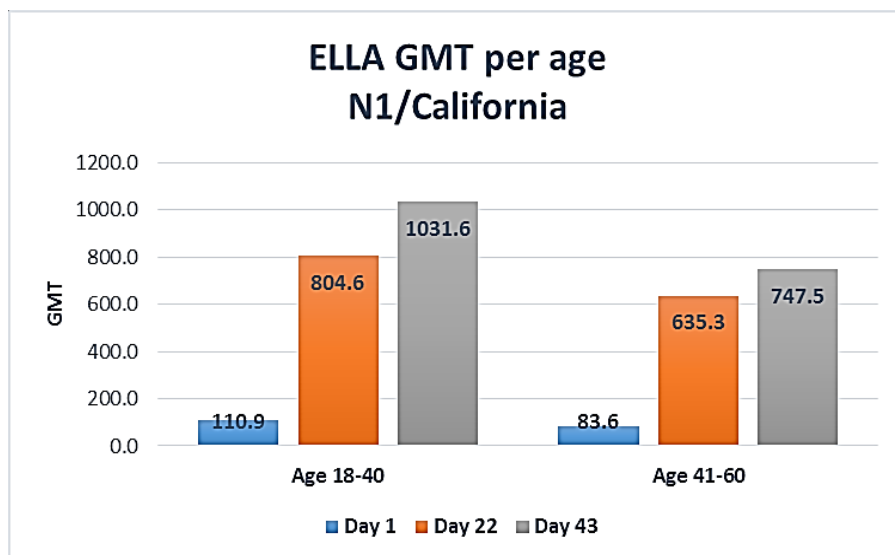


Grafico 11: Titolo della Media Geometrica per A/California/7/2009 (N1), i soggetti sono divisi nei due gruppi di età 18-40 e 41-60 e vaccinati due volte (al Day 1 e Day 22) con 15 μ g o 30 μ g di A/Vietnam/1194/2004.

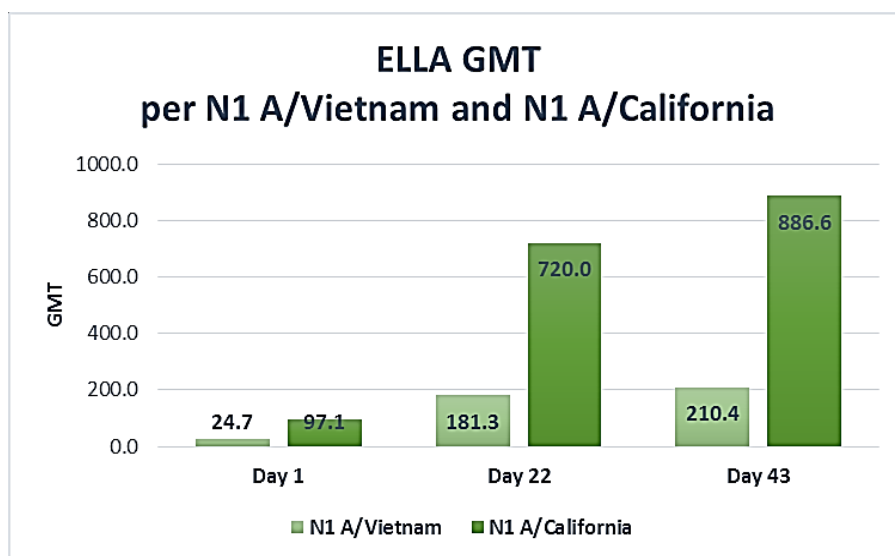


Grafico 12: Media Geometrica cumulativa per A/Vietnam/1194/2004 (N1) e A/California/7/2009 (N1), i soggetti sono stati vaccinati due volte (al Day 1 e Day 22) con 15 μ g o 30 μ g di A/Vietnam/1194/2004.

Da questi grafici possiamo notare che, per quanto riguarda la risposta dose-dipendente (grafici 8-9), la dose da 15 μ g è in grado di innalzare il titolo della media geometrica notevolmente, dopo la prima dose di vaccino e quest'ultima si mantiene abbastanza costante, con un lieve incremento, anche dopo la seconda somministrazione di vaccino; la dose da 30 μ g, sia al Day 22, che al Day 43, ottiene più del doppio dell'incremento della GMT, rispetto a quella da 15 μ g, confermando la sua maggiore efficacia per entrambi gli *strain* A/Vietnam e A/California.

Per quanto riguarda la risposta età-dipendente (grafici 10-11), possiamo notare, come il gruppo di età 18-40 risponda in maniera più efficace alla prima dose di vaccino, con un aumento del titolo anticorpale anche dopo la seconda somministrazione; quello di età 41-60, invece, sembra beneficiare meno della prima somministrazione e non sembra avere incremento nella risposta anticorpale anche dopo la seconda; anche questi dati sono confermati sia per A/Vietnam, che per A/California.

Il grafico 12, infine, ci mostra a confronto le risposte N1/Vietnam e N1/California: è evidente come la risposta per N1/California, superi notevolmente quella per N1/Vietnam; questa differenza è ben visibile già al *Day 1* che mostra un GMT di 24,7 per A/Vietnam contro 97,1 per A/California e approssimativamente questo rapporto 1:4 viene poi mantenuto anche per le altre visite. I dati di sorveglianza ci forniscono, a tal proposito, un supporto interpretativo: nell'ultimo decennio, ha circolato molto tra la popolazione, l'A/California/7/2009, tanto che, questo *strain*, è stato raccomandato per la produzione di vaccini monovalenti A(H1N1) pdm09 somministrati nell'ottobre 2009 e poi per la produzione di vaccini antinfluenzali stagionali trivalenti o quadrivalenti dal 2010 al 2016. Per questo motivo, l'immunità preesistente nella popolazione per l'A/California, sembra agevolare una risposta anticorpale più forte, rispetto all'A/Vietnam.

Correlazione HAI-SRH-MN

I metodi sierologici più comuni sopra citati (HAI, SRH, MN) hanno, come obiettivo principale, la ricerca di anticorpi anti-HA, presenti sulla superficie del virus dell'influenza di tipo A con rapporto 1:5 al massimo, rispetto alla presenza di NA (Moules V., et al., 2010); pertanto, si presentano come contributi diversi per lo stesso target.

Il test ELLA è invece destinato esclusivamente all'identificazione di anticorpi anti-NA, per questo motivo i suoi risultati sono trattati separatamente e non sono stati fatti confronti con gli altri metodi.

Utilizzando il Coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman, siamo riusciti a determinare se e in che misura i saggi HAI, SRH e MN correlassero tra di loro; più precisamente, abbiamo messo in correlazione, i risultati dei Day 22 e dei Day 43 di tutte e tre le metodiche analizzate. Nei *Correlation plot* possiamo notare che, maggiore è l'area del cerchio e più intenso è il tono del colore, maggiore è la correlazione. La direzione della correlazione è indicata dalla scala dei colori: toni blu per correlazioni positive e toni rossi per correlazioni negative.

Tabella 1: Day 22 (V2)

V2							
Spearman's correlation coefficient			p-value				
	MN	SRH	HAI		MN	SRH	HAI
MN	1.0000	0.5463	0.5711	MN	0.0000	0.0000	0.0000
SRH	0.5463	1.0000	0.5918	SRH	0.0000	0.0000	0.0000
HAI	0.5711	0.5918	1.0000	HAI	0.0000	0.0000	0.0000

Tutti i coefficienti di correlazione sono significativi.

Correlation plot Day 22

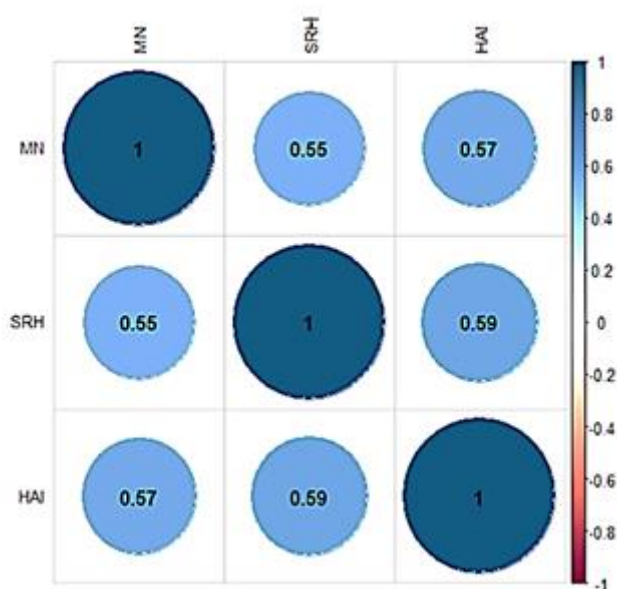
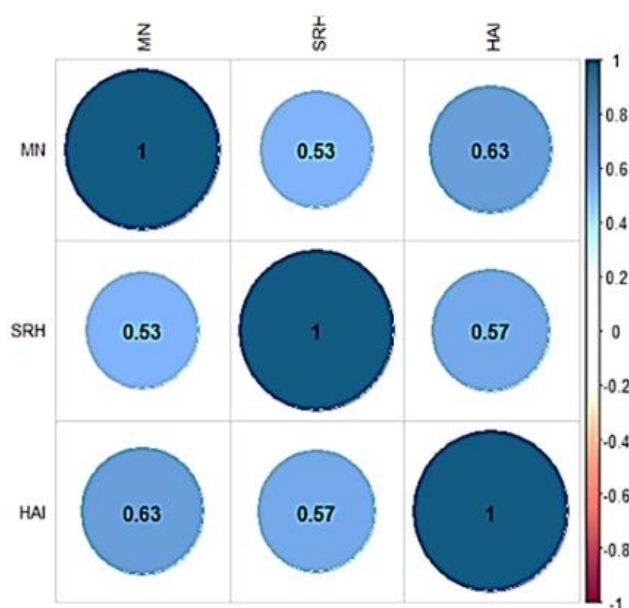


Tabella 2: Day 43 (V3)

V3							
Spearman's correlation coefficient			p-value				
	MN	SRH	HAI		MN	SRH	HAI
MN	1.0000	0.5346	0.6338	MN	0.0000	0.0000	0.0000
SRH	0.5346	1.0000	0.5749	SRH	0.0000	0.0000	0.0000
HAI	0.6338	0.5749	1.0000	HAI	0.0000	0.0000	0.0000

Anche per il Day 43 tutte le correlazioni risultano positive.

Correlation plot Day 43



DISCUSSIONE

Da Dicembre 2003 si sono verificati nel mondo un totale di 668 casi di infezioni nell'uomo causati dal ceppo aviario A/H5N1, con 393 decessi in 16 diversi paesi, con un CFR (case fatality rate) del 59% (http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/AvianInfluenza/en/). I paesi maggiormente colpiti sono quelli del sud-est asiatico, in particolare Cambogia, Vietnam, Indonesia e Cina, dove si sono verificati circa il 50% dei casi di infezioni da virus influenzali A/H5N1 negli animali e nell'uomo.

Un grosso pericolo è che il virus possa andare incontro a mutazioni (shift o drift antigenico) e acquisire la capacità di diffondersi facilmente da uomo a uomo.

Per tutti questi motivi, la World Health Organization (WHO) continua la campagna di sorveglianza annuale al fine di monitorare le tendenze globali nella trasmissione dell'influenza aviaria da H5N1 e sostenere la selezione di ceppi per la produzione di vaccini (WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A/H5N1, 2007).

Non ci sono, tuttora, dati evidenti che dimostrano ad oggi l'effettiva trasmissione uomo-uomo (WHO, Febbraio 2014).

L'ampia circolazione del virus A/H5N1 tra i polli, la sporadica infezione nell'uomo e le continue evoluzioni del virus A/H5N1, enfatizzano l'eventuale rischio di una futura pandemia, che spinge numerose aziende farmaceutiche a investire tempo e denaro nello sviluppo di un vaccino adeguato (Van der Velden M., et al., 2012).

Lo scopo del primo studio è quello di determinare l'immunogenicità e l'efficacia del vaccino influenzale pandemico diretto contro lo *strain* A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) e di valutarne l'immunità cross protettiva nei confronti di due *strain* influenzali eterologhi: l'A/Turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) e l'A/Anhui/1/2005 (H5N1), mediante 4 principali metodiche: HAI, SRH, MN e ELLA.

La metodica HAI, viene considerata il “*gold standard*” tra i saggi immunologici per la diagnosi di infezioni con virus dell'influenza umana; misura la capacità di bloccare il legame del recettore HA del virus, con la cellula ospite, ma questa metodica presenta comunque dei limiti: il rilevamento di anticorpi contro i virus dell'influenza aviaria nelle specie di mammiferi può essere insensibile, anche nei casi in cui l'infezione sperimentale è confermata dall'isolamento del virus (Lu BL., et al., 1982), inoltre, risulta poco sensibile alla *detection* degli anticorpi sviluppati dal virus aviario (Profeta M.L., 1986). Infatti questa tecnica riesce ad identificare alti titoli anticorpali H5 – specifici presenti nel siero (*sieri high positive*) ma non riesce a rilevarne livelli più bassi (*sieri low positive*). Per questo motivo è stato utilizzato anche il test SRH, metodica standard di riferimento dell'EMA per il licenziamento dei vaccini influenzali, che è in grado di rilevare anticorpi contro antigeni omologhi ed eterologhi con elevata sensibilità anche se con minore specificità. Poiché il test SRH utilizza virus intero inattivato, è sensibile a tutti gli anticorpi contro qualsiasi epitopo virale in grado di attivare la fissazione del complemento (IgG e IgM), rilevando non solo le risposte anticorpali contro l'HA, ma anche le risposte anticorpali aspecifiche che probabilmente sono state suscitate contro NA o proteine interne come NP e M (Oxford JS., et al., 1979) (Farrohi K., et al., 1977) (Molesti E., et al., 2014).

Questo ci fa comprendere il perché l'SRH è il metodo più capace di rilevare la risposta eterologa tra i tre utilizzati (HAI, SRH, MN).

Il saggio MN si basa, invece, sull'utilizzo di virus influenzale vivo ed è in grado di misurare gli anticorpi neutralizzanti che bloccano l'ingresso del virus, la fusione alla membrana della cellula ospite e la sua internalizzazione. Oltre a misurare anticorpi in grado di neutralizzare il dominio della testa *strain* specifico e immunodominante, il test MN ha dimostrato anche di rilevare anticorpi diretti verso il gambo conservato dell'HA che potrebbero dare origine a un'ampia protezione contro diversi ceppi di virus A dell'influenza (Sui J., et al., 2009).

Tutti i dati di immunogenicità, anche se provenienti da tre metodi di saggio diversi, confermano la dominanza della risposta omologa anti-A/Vietnam/1194/2004 rispetto ai ceppi eterologhi A/H5. Tuttavia, i dati eterologhi forniscono un quadro molto utile soprattutto per l'interpretazione delle coorti relative alla dose di vaccino e alle fasce d'età.

La risposta dose dipendente è l'informazione più chiara, in quanto la dose di vaccino di 30µg, ottiene i risultati più alti in ogni metodo valutato, se confrontata con la dose di vaccino di 15µg. Questa tendenza è confermata non solo per lo *strain* A/Vietnam/1194/2004, ma, anche se con meno effetto, anche per quelli eterologhi.

La risposta età dipendente sembra invece non avere grande significatività utilizzando le tecniche HAI, SRH e MN, mentre acquisisce una certa rilevanza indagando la risposta anticorpale contro la neuraminidasi, come nel test ELLA, dove notiamo che un'età compresa tra i 18 e i 40 anni sembra essere un fattore predisponente per innescare una risposta più elevata. Anche in questo caso, tendenza confermata per *strain* omologhi ed eterologhi.

Oltre a questo, analizzando i risultati ELLA notiamo anche una differenza nella risposta dose dipendente a favore di quella da 30µg che produce una risposta molto più forte dopo ciascuna delle due somministrazioni di vaccino.

Un dato che ci ha incuriosito, esaminando i risultati ELLA, è la differenza di titoli per le due diverse NA indagate: i titoli rilevati per N1 A/California, *strain* eterologo, superano di gran lunga i titoli NI per N1 A/Vietnam, questo perché il vaccino, agisce come un valido richiamo per l'immunità preesistente contro tale ceppo stagionale.

Oltre all'evidente differenza di titoli tra i due *strain*, che riflette la capacità del test ELLA di discriminare gli anticorpi verso i diversi epitopi, si osserva anche chiaramente che la somministrazione del vaccino (H5N1) A/Vietnam evoca una risposta elevata anche per A/California. Evidenze sperimentali sostengono che, anticorpi diretti verso un virus stagionale H1N1 possono fornire immunità contro l'infezione da H5N1 (Sandbulte MR., et al., 2007), qui è stato osservato che la reazione incrociata è valida anche al contrario, il vaccino H5N1 stimola una risposta per H1N1. Inoltre, gli epitopi conservati su N1 che contribuiscono ad un'ampia protezione contro virus eterologhi, compreso l'H5N1, sono attualmente materia di studio (HWan J., et al., 2013).

CONCLUSIONI

Questo studio mostra l'efficacia del vaccino analizzato con le tecniche sierologiche più utilizzate per la valutazione dei vaccini influenzali. Tutte le metodiche dimostrano risultati ben sovrapponibili e correlati tra loro e tutti confermano l'efficacia di questo vaccino pandemico contro l'A/Vietnam/1194/2004 (H5N1).

Il vaccino è stato progettato per essere somministrato in due dosi, ma i risultati ottenuti mostrano che, già dopo la prima somministrazione, i soggetti sviluppano una risposta

anticorpale tale da conferire una protezione effettiva. Questo implica che, in caso di pandemia, sarebbe plausibile vaccinare la popolazione con una singola dose, al fine di garantire già protezione ed una vaccinazione estesa ad un maggior numero di persone.

STUDIO 2

INTRODUZIONE

I Coronavirus (CoV) sono virus capsulati a RNA a filamento singolo a polarità positiva appartenenti alla famiglia dei Coronaviridae, il virione contiene 4 proteine strutturali principali: la proteina nucleocapside (N), la proteina transmembrana (M), la proteina envelope (E) e la proteina spike (S).

La sottofamiglia Orthocoronavirinae contiene 4 generi (Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus), il SARS-CoV e il SARS-CoV-2 appartengono al genere Betacoronavirus (Schoeman D., et al., 2019).

Prima del dicembre 2019, 6 ceppi di coronavirus (CoV) erano noti per infettare l'uomo e causare malattie respiratorie. L'HCoV-229E, l'HCoV-OC43, l'HCoV-NL63 e l'HKU1 sono coronavirus che normalmente causano lievi malattie delle alte vie respiratorie con rare infezioni gravi che si verificano principalmente in neonati, bambini e anziani (Richman D., et al., 2009). Quelle più pericolose sono la SARS-CoV e la MERS-CoV, che possono infettare le vie respiratorie inferiori e scatenare una grave condizione respiratoria negli esseri umani (Fehr AR., et al., 2015). È ampiamente noto, inoltre, che alcuni CoV colpiscono uccelli, pipistrelli, topi, giraffe, balene e molti altri animali selvatici, ma possono anche infettare il bestiame, causando grandi perdite economiche (Hasoksuz M., et al., 2007). Gli animali domestici possono anche svolgere un ruolo di ospiti intermedi permettendo la trasmissione del virus dagli animali all'uomo (Cui J., et al., 2019) (Zhang X., et al., 2007). Inoltre, questi ultimi, possono loro stessi contrarre malattie trasmesse dai pipistrelli strettamente correlate ai coronavirus (Bat-CoV) (Chan JF., et al., 2013). Nei pipistrelli sono state rilevate sequenze genomiche molto simili al virus della diarrea suina (PEDV). Nel 2016, un'epidemia su larga scala di una malattia nei suini della Cina meridionale che ha ucciso 24.000 suini, è stata causata da un Bat-CoV correlata all'HKU2 e chiamata sindrome della diarrea acuta dei suini CoV (Zhou P., et al., 2018). Questo incidente è stato il primo caso documentato in cui un Bat-CoV ha causato una grave malattia nel bestiame (Simas PVM., et al., 2015).

Ci sono stati due eventi negli ultimi due decenni in cui il crossover di betacoronavirus dagli animali all'uomo ha portato a gravi malattie.

Nella provincia del Guangdong in Cina durante l'inverno 2002-2003 è apparsa una forma insolita e spesso mortale di polmonite, una malattia successivamente etichettata come sindrome respiratoria acuta grave (SARS). Questa malattia si è diffusa a Hong Kong alla fine di febbraio e, in pochi giorni, i viaggi aerei internazionali hanno diffuso il virus su un'area molto vasta, seminando focolai in Vietnam, Singapore, Canada e altrove. Nel luglio 2003, alla fine di questo focolaio, sono stati registrati 8.422 casi, 916 (10,8%) dei quali mortali, in 29 paesi di 6 continenti. L'origine del SARS-CoV, è stato il mercato di animali vivi nel Guangdong, dove sono tenute diverse specie animali, che sono vendute ai ristoranti in risposta alla domanda di cibo esotico (Park Thwaites RS., et al., 2020). È stato dimostrato che, piccoli mammiferi, come i gatti zibetti, venduti in questi mercati, possano ospitare virus strettamente correlati al SARS-CoV, e quindi l'iniziale trasmissione inter-specie all'uomo è probabilmente partita da questi mercati (Menachery VD., et al., 2015) (Song HD., et al., 2005).

Una decina di anni dopo, è stata scoperta la seconda forma grave causata da un Coronavirus, il MERS-CoV è stato isolato, infatti, per la prima volta nel 2012 dal polmone di un paziente di 60 anni che ha sviluppato una polmonite acuta e un'insufficienza renale in Arabia Saudita. Il MERS-CoV vivo, identico al virus trovato nell'uomo, è stato isolato dai tamponi nasali dei cammelli dromedari, indicando che i cammelli fungono da veri e propri serbatoi di MERS-CoV. Al 14 febbraio 2020, oltre 2.500 casi confermati in laboratorio sono stati segnalati, con un alto tasso di mortalità del 34,4%, rendendo MERS-CoV uno dei virus più devastanti conosciuti dall'uomo (Park Thwaites RS., et al., 2020).

Il 26 dicembre 2019, un uomo di 41 anni è stato ricoverato all'Ospedale Centrale di Wuhan, 6 giorni dopo l'insorgenza della malattia. Non aveva precedenti di epatite, tubercolosi o diabete e, al momento dell'ospedalizzazione, ha riferito febbre, tensione toracica, tosse, dolori e debolezza per 1 settimana. Il *Wuhan Centre for Disease Control and Prevention* ha condotto un'indagine epidemiologica e ha scoperto che il paziente lavorava in un mercato locale coperto di frutti di mare dove, oltre a pesci e crostacei, erano disponibili per la vendita una varietà di animali selvatici vivi (tra cui ricci, tassi, serpenti e uccelli) e carcasse di animali. Tuttavia, non erano disponibili in vendita pipistrelli, e il paziente non ricordava alcuna esposizione al pollame vivo, anche se potrebbe essere venuto a contatto con animali selvatici (Wu F., et al., 2020).

Il 31 dicembre 2019, il *China Country Office* dell'OMS è stato informato dell'insorgenza di casi di polmonite ad eziologia sconosciuta nella città di Wuhan, nella provincia cinese di Hubei (Wuhan Municipal Health Commission, 2020). Dal 31 dicembre 2019 al 3 gennaio 2020, un totale di 44 pazienti con polmonite ad eziologia sconosciuta sono stati segnalati all'OMS dalle autorità nazionali cinesi. Durante questo periodo di riferimento non è stato identificato alcun

agente causale. Successivamente, l'11 e il 12 gennaio 2020, l'OMS ha ricevuto ulteriori dettagli dalla Commissione Sanitaria Nazionale in Cina, secondo cui l'epidemia era stata associata a uno dei mercati di prodotti ittici di Wuhan. Il 7 gennaio 2020, i cinesi hanno isolato e identificato un nuovo tipo di coronavirus in modo che altri paesi potessero sviluppare specifici kit diagnostici. Il 12 gennaio 2020, la Cina ha condiviso la sequenza genetica del nuovo coronavirus (Lu R., et al., 2020). Il 13 gennaio 2020, il Ministero della Salute Pubblica della Thailandia ha segnalato il primo caso importato di nuovo coronavirus confermato in laboratorio (2019-nCoV) da Wuhan, provincia di Hubei, Cina. Il 15 gennaio 2020, il Ministero della Salute, del Lavoro e del Welfare del Giappone (MHLW) ha segnalato un caso importato di nuovo coronavirus 2019 (2019-nCoV) confermato in laboratorio dalla stessa località di origine. Il 20 gennaio 2020, il National IHR Focal Point (NFP) per la Repubblica di Corea ha segnalato il primo caso di nuovo coronavirus, sempre da Wuhan, Cina (Park WB., et al., 2020).

Il nuovo SARS-CoV2, in bravissimo tempo, si è diffuso in tutto il mondo e l'11 marzo 2020 è stato dichiarato pandemia dall'OMS (Fig.16). L'impatto globale della pandemia di SARS-CoV-2, con 63.136.866 di casi e 1.469.402 decessi segnalati (al 2 Dicembre 2020), non ha precedenti (Health Emergency Dashboard, 30 Ottobre 2020).

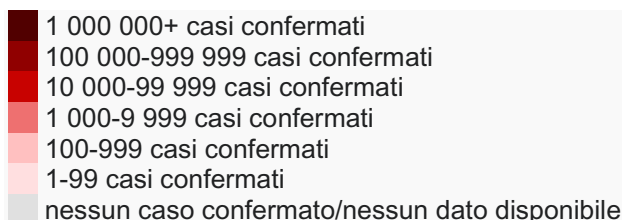
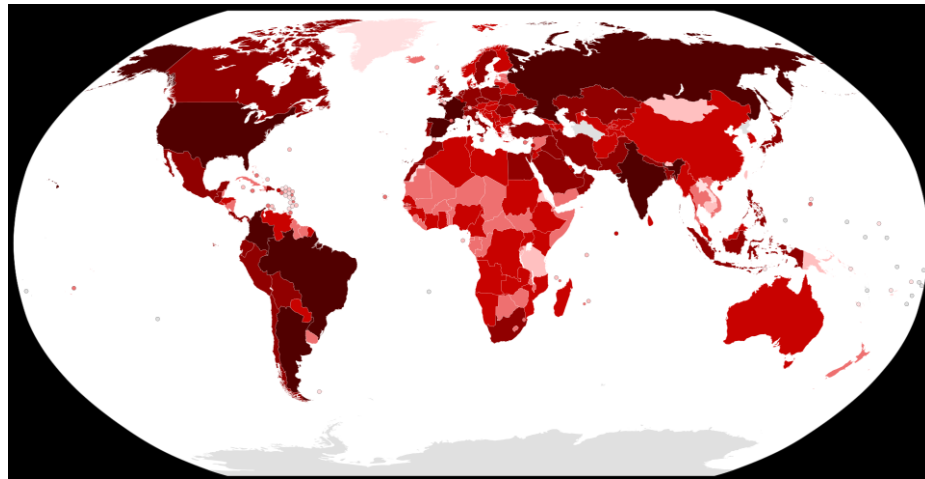


Fig. 16: Paesi colpiti dal SARS-CoV-2.

Struttura e ciclo replicativo del SARS-CoV-2

I Coronavirus appartengono alla grande famiglia Coronaviridae che si divide in due sottofamiglie: Orthocoronavirinae e Torovirinae. Sulla base della relazione genomica e filogenetica, la sottofamiglia Orthocoronavirinae è classificata in quattro generi: alphacoronaviruses, betacoronaviruses, gammacoronaviruses e deltacoronaviruses (Woo PC., et al., 2010). Gli alphacoronavirus e i betacoronavirus tendono ad infettare i mammiferi e a causare infezioni respiratorie e gastrointestinali nell'uomo come il coronavirus della SARS (SARS-CoV), il MERS coronavirus (MERS-CoV) e il SARS-CoV-2; i gammacoronavirus e i deltacoronavirus hanno, invece, la capacità di infettare gli uccelli oltre ai mammiferi (Zhou P., et al., 2020) (Forni D., et al., 2017). I betacoronavirus comprendono il SARS-CoV, il MERS-CoV, i coronavirus umani (HCoV), i coronavirus Bat-SARS-like (SL), e infine il SARS-CoV-2 recentemente identificato. Il SARS-Cov-2 possiede un genoma ad RNA non segmentato, a singolo filamento a senso positivo (+ssRNA) con struttura 5'-cap e 3'-poly-A che è una struttura genomica tipica dei Coronavirus (Ashour HM., et al., 2020). Le analisi del genoma hanno rivelato che la sequenza genomica del SARS-CoV-2 è identica al 96% rispetto a quella del coronavirus dei pipistrelli denominato BatCoV RaTG13, e al 79,5% a quella del SARS-CoV (Zhou P., et al., 2020). Pertanto, il pipistrello potrebbe essere l'ospite naturale del SARS-CoV-2 e la via di trasmissione potrebbe avvenire attraverso ospiti intermedi sconosciuti. Le analisi genetiche dei genomi del SARS-CoV-2 di 103 pazienti cinesi hanno dimostrato che questo virus si è evoluto in due tipi principali: il tipo L (~ 70%) e il tipo S (~ 30%). Il tipo L è più aggressivo e infettivo del tipo S, che è la versione ancestrale (Tang X., et al., 2020).

Il genoma del CoV contiene sei grandi *open reading frames* (ORF) e numerosi geni accessori. Il primo ORFs (ORF1a/b), che comprende i due terzi dell'RNA virale, codifica due grandi proteine di CoVs, la poliproteina 1a (pp1a) e pp1ab. Queste poliproteine sono suddivise in 16 proteine non strutturali (nsps), responsabili della replicazione e della trascrizione dell'RNA virale (Ziebuhr J., et al., 2000) (Baez-Santos YM., et al., 2015). Le rimanenti ORF su un terzo del genoma codificano le proteine strutturali principali, tra cui la proteina *spike* (S), *envelope* (E), membrana (M) e nucleocapside (N), che sono tutte cruciali per l'infettività virale (Fig.17). Il SARS-CoV-2 possiede un rivestimento con doppio strato fosfolipidico con le proteine S, M, e E (Masters PS., 2006) (Hussain S., et al., 2005). La **proteina N** è composta da un dominio amino (N)-terminale (NT) e una coda citoplasmatica acarbosile (C)-terminale (CT) e si trova nel nucleo della particella virale. Entrambi i domini si legano all'RNA virale per formare il nucleocapside elicoidale (Chang C-k., et al., 2006) (Hurst KR., et al., 2009). Inoltre, la proteina

N agisce come antagonista della via dell'interferone regolando la segnalazione e la sintesi dell'interferone di tipo I (IFN), che è una delle risposte più importanti nell'immunità innata all'infezione virale (Lu X., et al., 2011). La **proteina M** è il componente più abbondante dell'involucro virale, contiene un ectodominio NT glicosilato, tre domini transmembrana (TM) e un dominio CT che si lega al nucleocapside. La proteina M dà la forma del virus e promuove la curvatura della membrana e l'assemblaggio del virus interagendo con la proteina S e la ribonucleoproteina (Ujike M., et al., 2015) (Neuman BW., et al., 2011). La **proteina E** è una piccola proteina integrale di membrana, che include un ectodominio NT, un dominio TM e un endodominio CT. La proteina E facilita l'assemblaggio, il germogliamento e la formazione dell'involucro, così come la proteina M (Schoeman D., et al., 2019); inoltre, la proteina E ha un'attività a canale ionico che contribuisce all'attivazione del processo infiammatorio nell'uomo. Studi su animali hanno dimostrato che il blocco dell'attività del canale ionico della proteina E, attraverso la delezione dei geni associati, porta alla riduzione dell'edema e del livello di interleuchine attivate dall'infiammazione, come (IL)-1 β , IL-6 e il fattore di necrosi tumorale (TNF), che giocano un ruolo fondamentale nella progressione della Sindrome da Distress Respiratorio Acuto (ARDS) (Nieto-Torres JL., et al., 2014).

La **glicoproteina S** è quella che determina la specificità del virus per le cellule epiteliali del tratto respiratorio è infatti responsabile dell'attacco del virus alle cellule ospiti, della fusione delle membrane cellulari virus-ospite e dell'internalizzazione del virus (Masters PS., 2006). Il genoma della proteina S del SARS-CoV-2 ha poco meno del 75% di sequenza identica a quella del SARS-CoVs precedentemente nota, ad eccezione del RaTG13, il cui genoma S è identico al 93,1% a quello del SARS-CoV-2 (Zhou P., et al., 2020). La glicoproteina S è composta da due domini: il dominio S1 che include il *Receptor Binding Domain* (RBD), che interagisce con l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) presente sulle cellule dei capillari polmonari, e il dominio S2 che media la fusione delle membrane delle cellule del virus e l'ingresso virale nella cellula ospite (Zhou P., et al., 2020) (Xia S., et al., 2020). Il dominio S2 è composto da tre parti; un grande ectodominio; un singolo dominio TM e un dominio CT (Bosch BJ., et al., 2005). La sequenza dell'RBD tra SARS-CoV e SARS-CoV-2 mostra un'identità del 73,5% (Morse JS., et al., 2020). Un recente studio ha indicato che, la proteina S del SARS-CoV2 lega i recettori ACE2 con una maggiore affinità rispetto a quella del SARS-CoV (Wrapp D., et al., 2020). Dopo l'attacco del SARS-CoV-2 mediante la proteina S ai recettori ACE2 sulle cellule ospiti, la proteina S viene scissa dalle proteasi di queste ultime per rivelare il dominio S2, indispensabile per la fusione della membrana virale con quella della

cellula ospite e l'ingresso virale, accompagnato da una produzione di $\text{TNF-}\alpha$ (Hoffmann M., et al., 2020) (Ou X., et al., 2020).

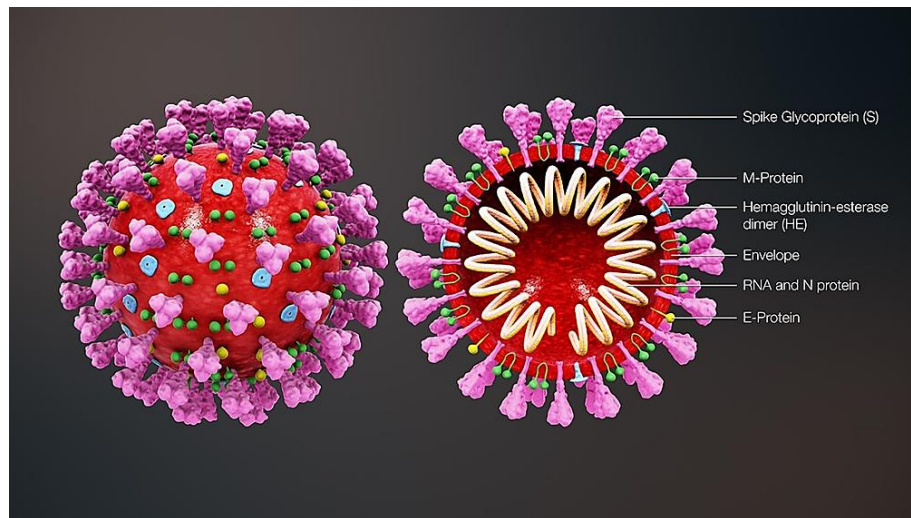


Fig. 17: *Struttura del SARS-CoV-2.*

L'infezione da SARS-CoV-2 inizia quindi, con il riconoscimento, da parte dell'RBD del recettore ACE2 posto sulla superficie della cellula ospite e l'attacco del virus alla membrana di quest'ultima; successivamente, grazie al dominio S2 della proteina S, avviene la fusione delle membrane virus-cellula ospite, che permette il rilascio dell'RNA virale all'interno del citosol della cellula. L'RNA virale viene, successivamente, tradotto in poliproteine, tra cui, la Proteasi Principale, responsabile della formazione dell'RNA polimerasi, essenziale per la replicazione del virus. Vengono quindi sintetizzate sullo stampo dell'intermedio replicativo a polarità negativa, le nuove copie del genoma del virus, che viene poi tradotto nelle principali proteine che costituiscono il virus.

Le proteine strutturali sono quindi accumulate sulle membrane del reticolo endoplasmatico e la proteina N si associa all'RNA virale, aumentandone la stabilità.

Alla fine del ciclo replicativo, grazie alle proteine M ed E avvengono l'assemblaggio del virus, la formazione dell'*envelope* e il germogliamento del nuovo virione dalla cellula ospite (Yuki K., et al., 2020) (Fig.18).

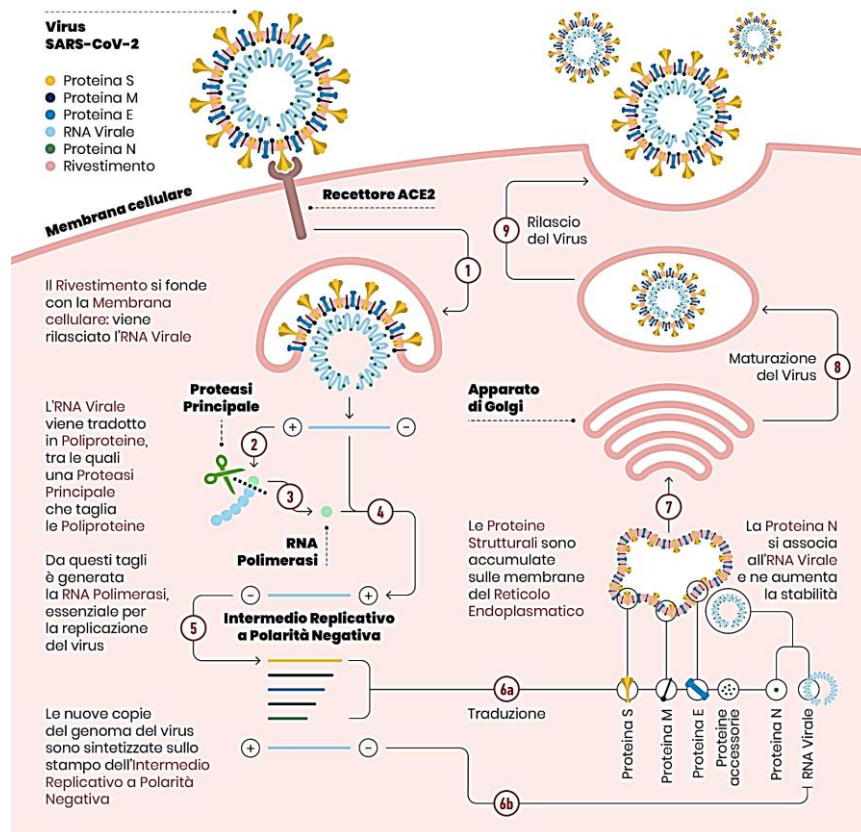


Fig.18: *Ciclo replicativo del SARS-CoV-2*

Epidemiologia e Patogenesi

L'infezione si trasmette attraverso grosse goccioline generate durante la tosse e gli starnuti da pazienti sintomatici, ma può verificarsi anche da persone asintomatiche o prima dell'insorgenza dei sintomi (Rothe C., et al., 2020). Studi hanno dimostrato cariche virali più elevate nella cavità nasale, rispetto alla gola, senza alcuna differenza di carico virale tra persone sintomatiche e asintomatiche (Zou L., et al., 2020). I pazienti possono essere infettivi fino a quando durano i sintomi e anche al momento della guarigione clinica. Alcune persone possono agire come “super diffusori”; un cittadino britannico che ha partecipato a una conferenza a Singapore ha contagiato altre 11 persone durante il soggiorno in un resort sulle Alpi francesi e al ritorno nel Regno Unito (WHO, 2020). Queste goccioline infette possono diffondersi per 1-2 m e depositarsi sulle superfici. Il virus può rimanere vitale sulle superfici per giorni, in condizioni atmosferiche favorevoli, ma viene distrutto in meno di un minuto dai comuni disinfettanti come ipoclorito di sodio, perossido di idrogeno, ecc. (Kampf G., et al., 2020). L'infezione viene acquisita o per inalazione di queste goccioline o toccando le superfici da esse contaminate e poi toccando il naso, la bocca e gli occhi. Il virus è presente anche nelle feci e si ipotizza anche la

contaminazione della fornitura d'acqua e la successiva trasmissione per via feco-orale (WHO, 2020). Secondo le informazioni attuali, la trasmissione transplacentare dalle donne incinte al feto non è stata descritta (Chen H., et al., 2020). Tuttavia, è stata descritta la malattia neonatale dovuta alla trasmissione post-natale (Chen H., et al., 2020). Il periodo di incubazione varia da 2 a 14 giorni [mediana 5 giorni].

Si stima che il tasso di riproduzione o (BCR) vada da 2 a 6,47 (Cheng ZJ., et al., 2019). In confronto, il BCR della SARS è stato di 2 e 1,3 quello dell'influenza pandemica H1N1 2009 (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>).

Sintomi

Le caratteristiche cliniche del COVID-19 sono varie e vanno dallo stato asintomatico alla sindrome da distress respiratorio acuto e alle disfunzioni multiorgano. Le caratteristiche cliniche comuni includono febbre (non sempre), tosse, mal di gola, cefalea, affaticamento, mal di testa, mialgia e mancanza di respiro. È stata osservata anche la congiuntivite. Apparentemente questi sintomi sono indistinguibili da altre infezioni respiratorie. In alcuni pazienti, entro la fine della prima settimana, la malattia può progredire fino alla polmonite, all'insufficienza respiratoria e alla morte. Questa progressione è associata all'enorme aumento delle citochine infiammatorie, tra cui IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF α . Il tempo in media dall'insorgenza dei sintomi alla dispnea è di 5 giorni, il ricovero ospedaliero 7 giorni e la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) 8 giorni. La necessità di un ricovero in terapia intensiva avviene nel 25-30% dei pazienti affetti. Tra le complicanze riscontrate ci sono lesioni polmonari acute, ARDS, shock e lesioni renali acute. Il recupero inizia in genere a partire dalla seconda o terza settimana. La durata media della degenza ospedaliera in coloro che si sono ripresi è stata di 10 giorni. Gli esiti negativi e i decessi sono più comuni negli anziani e in coloro che hanno una comorbilità sottostante (50-75% dei casi mortali). Il tasso di mortalità nei pazienti adulti ospedalizzati variava dal 4 all'11%. Il tasso di mortalità complessivo dei casi è stimato tra il 2 e il 3% (Chen N., et al., 2020).

È interessante notare che la malattia nei pazienti al di fuori della provincia di Hubei è stata segnalata come più lieve di quella di Wuhan (Xu XW., et al., 2020). Analogamente, la gravità e il tasso di mortalità dei casi nei pazienti al di fuori della Cina è stato riportato come più mite (WHO, 2020). Ciò può essere dovuto o a un errore di selezione, in cui i casi segnalati da Wuhan includevano solo i casi gravi o alla maggior predisposizione della popolazione asiatica al virus

dovuta alla maggiore espressione dei recettori ACE2 sulla mucosa respiratoria (Cheng ZJ., et al., 2020).

Anche le malattie nei neonati e nei bambini sono state segnalate come significativamente più miti rispetto alle loro controparti adulte. In una serie di 34 bambini ricoverati in un ospedale di Shenzhen, Cina, tra il 19 gennaio e il 7 febbraio, c'erano 14 maschi e 20 femmine. L'età media era di 8 anni e 11 mesi e in 28 bambini l'infezione era legata a un membro della famiglia e 26 bambini avevano precedenti di viaggi/residenze nella provincia di Hubei in Cina. Tutti i pazienti erano asintomatici (9%) o avevano una malattia lieve. Non sono stati riscontrati casi gravi o critici. I sintomi più comuni erano febbre (50%) e tosse (38%). Tutti i pazienti sono guariti con una terapia sintomatica e non ci sono stati decessi. È stato anche riportato un caso di polmonite grave e di disfunzione multiorgano in un bambino (Chen F., et al., 2020). Analogamente, i casi neonatali che sono stati segnalati sono stati lievi (Zeng LK., et al., 2020).

Diagnosi

Un caso sospetto è definito come un soggetto che presenta febbre, mal di gola, tosse e che ha o una storia di viaggi in Cina o in altre aree di trasmissione locale persistente o ha avuto contatto con pazienti positivi con infezione confermata da COVID-19. Tuttavia, in molti casi, i soggetti possono essere asintomatici o senza febbre. Un caso confermato è un soggetto sospetto con un test molecolare positivo.

Una diagnosi precisa del Coronavirus (COVID-19) è essenziale per identificare prontamente gli individui infetti, per limitare la diffusione del virus e per consentire a coloro che sono stati infettati di essere trattati nelle prime fasi dell'infezione. Ad oggi, la diagnosi è data da specifici test molecolari su campioni respiratori (tampone della gola / tampone nasofaringeo / espettorato / aspirato endotracheale e lavaggio bronco alveolare). La reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR) è il metodo più utilizzato per diagnosticare il COVID-19; tuttavia, l'elevato volume della domanda e la carenza di materiali necessari per il campionamento delle mucose hanno impedito l'esecuzione di test rapidi e su larga scala (Zou L., et al., 2020). Il virus può essere rilevato anche nelle feci e, in casi gravi, nel sangue.

Altre indagini di laboratorio sono di solito non specifiche. La conta dei globuli bianchi è solitamente normale o bassa. Ci può essere linfopenia; un conteggio dei linfociti <1000 è stato associato a una grave malattia. La conta delle piastrine è di solito normale o leggermente bassa. La CRP e la VES sono generalmente elevate, ma i livelli di procalcitonina sono generalmente normali. Un alto livello di procalcitonina può indicare una coinfezione batterica. L'ALT/AST,

il tempo di protrombina, la creatinina, il D-dimero, la CPK e l'LDH possono essere elevati e livelli elevati sono associati a malattie gravi.

La radiografia del torace (CXR) di solito mostra infiltrazioni bilaterali, ma può essere normale nelle malattie precoci. La TAC è più sensibile e specifica. La TAC mostra generalmente infiltrati, opacità a vetro smerigliato e consolidamento sub-segmentale ed è anormale anche in pazienti asintomatici o senza alcuna evidenza clinica di coinvolgimento delle vie respiratorie inferiori. Infatti, le scansioni TAC sono state utilizzate per diagnosticare casi di COVID-19 in soggetti sospetti, ma con diagnosi molecolare negativa; molti di questi pazienti hanno avuto test molecolari positivi su test ripetuti (Huang P., et al., 2020).

Data la necessità di eseguire test rapidi per l'identificazione di soggetti potenzialmente positivi, ultimamente, vengono utilizzati sempre di più saggi sierologici standardizzati in grado di misurare le risposte anticorpali, che possono aiutare a superare questi problemi e supportare un numero significativo di applicazioni rilevanti. Infatti, i saggi sierologici sono la base su cui stabilire il tasso di infezione (grave, lieve e asintomatica) in una determinata area, calcolare la percentuale di popolazione suscettibile al virus e determinare il tasso di mortalità della malattia. È stato dimostrato in un modello di primate non umano (Bao L., et al., 2020) che, una volta stabilita la risposta anticorpale, è improbabile una reinfezione e, di conseguenza, la dispersione virale. Inoltre, i saggi sierologici possono aiutare a identificare i soggetti con una forte risposta anticorpale, che potrebbero servire come donatori per la generazione di anticorpi monoclonali terapeutici (Andreano E., et al., 2020); questi saggi, inoltre, possono essere utilizzati per definire i futuri correlati di protezione per il SARS-CoV-2.

Trattamento e prevenzione

Il trattamento è essenzialmente di supporto e sintomatico.

Il primo passo è quello di garantire un adeguato isolamento per prevenire la trasmissione ad altri contatti, pazienti e operatori sanitari. Le malattie di lieve entità dovrebbero essere gestite a casa con una consulenza sui segnali di pericolo. I principi abituali sono il mantenimento dell'idratazione e della nutrizione e il controllo della febbre e della tosse. L'uso di routine di antibiotici e antivirali come l'oseltamivir dovrebbe essere evitato nei casi confermati. Nei pazienti ipossici è indicato l'apporto di ossigeno attraverso la maschera facciale, la canula nasale ad alto flusso (HFNC) o la ventilazione non invasiva. Può essere necessaria una ventilazione meccanica e anche un supporto di ossigeno a membrana extra-corporea. In alcuni casi può essere necessaria una terapia di sostituzione renale. Antibiotici e antifungini sono necessari in

caso di sospetta o provata co-infezione. Il ruolo dei corticosteroidi non è provato; mentre l'attuale consenso internazionale e l'OMS si oppongono al loro uso, le linee guida cinesi raccomandano una terapia a breve termine con corticosteroidi a basso-moderato dosaggio in caso di ARDS (Russell CD., et al., 2020) (Zhao JP., et al., 2020). Linee guida dettagliate per la gestione delle cure critiche per COVID-19 sono state pubblicate dall'OMS (WHO., 2020). Al momento non esiste un trattamento approvato per COVID-19. Farmaci antivirali come la ribavirina, il lopinavir-ritonavir sono stati utilizzati sulla base dell'esperienza con la SARS e la MERS. In uno studio su pazienti affetti da SARS, i pazienti trattati con lopinavir-ritonavir con ribavirina hanno avuto risultati migliori rispetto a quelli trattati con la sola ribavirina (Chen N., et al., 2020).

Altri farmaci proposti per la terapia sono l'arbidolo (un farmaco antivirale disponibile in Russia e in Cina), immunoglobuline per via endovenosa, gli interferoni, la cloroquina e il plasma di pazienti recuperati da COVID-19 (Jin YH., et al., 2020) (Zhang L., et al., 2020).

Attualmente non esiste un vaccino contro il SARS-CoV-2, anche se molti vaccini sono attualmente in fase 2-3 di sperimentazione.

Poiché in questo momento non esistono trattamenti né vaccinazione, la prevenzione è fondamentale. Diverse proprietà di questo virus rendono difficile la prevenzione, come le caratteristiche non specifiche della malattia, l'infettività anche prima dell'insorgenza dei sintomi nel periodo di incubazione, la trasmissione da persone asintomatiche, il lungo periodo di incubazione, il tropismo per le superfici mucose come la congiuntiva, la durata prolungata della malattia e la trasmissione anche dopo la guarigione clinica.

Si raccomanda l'isolamento dei casi confermati o sospetti di malattia lieve a casa. L'areazione a casa dovrebbe essere buona con la luce del sole per consentire la distruzione del virus. Fondamentale è il mantenimento della distanza di sicurezza tra individui e evitare sovraffollamenti in luoghi chiusi e assembramenti in genere; importantissimo è inoltre l'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale (DPI) e la costante e corretta igiene delle mani.

Il rischio maggiore è la trasmissione agli operatori sanitari. Nell'epidemia di SARS del 2002, il 21% delle persone colpite erano operatori sanitari (Chang D., et al., 2020). È importante proteggere gli operatori sanitari per garantire la continuità delle cure e prevenire la trasmissione dell'infezione ad altri pazienti. Anche se il COVID-19 si trasmette principalmente mediante goccioline prodotte da tosse o starnuti ed è inserito nella categoria B degli agenti infettivi (H5N1 ad alta patogenicità e SARS), dalla *China National Health Commission*, le misure di controllo dell'infezione raccomandate sono quelle per gli agenti di categoria A (colera, peste). I pazienti devono essere collocati in stanze separate o in coabitazione. Le stanze, le superfici e le

attrezzature devono essere sottoposte a regolare decontaminazione, preferibilmente con ipoclorito di sodio. Gli operatori sanitari devono essere muniti di respiratori N95, tute protettive e occhiali protettivi. Le precauzioni per la trasmissione per via aerea devono essere prese durante le procedure di generazione di aerosol, come l'intubazione, l'aspirazione e le tracheotomie. Tutti i contatti, compresi gli operatori sanitari, devono essere monitorati per lo sviluppo dei sintomi da COVID 19. I pazienti possono essere dimessi dall'isolamento una volta che non presentano sintomi per almeno 3 giorni e hanno due test molecolari negativi consecutivi ad un intervallo di campionamento di 1 giorno.

A livello di comunità, si dovrebbe chiedere alle persone di evitare le zone affollate e di rimandare i viaggi non essenziali verso luoghi con trasmissione in corso. Dovrebbe essere chiesto loro di tossire in maniche/ tessuti piuttosto che con le mani e di praticare l'igiene delle mani frequentemente ogni 15-20 min. Ai pazienti con sintomi respiratori deve essere chiesto di utilizzare maschere chirurgiche. La Cina sta anche considerando di introdurre una legislazione che vieti la vendita e il commercio di animali selvatici (Li J., et al., 2020).

SCOPO DELLO STUDIO 2

La rapida diffusione globale del nuovo SARS-CoV-2 rappresenta una grave minaccia per la salute di tutto il mondo. Vi è ora l'urgente necessità di saggi sierologici ben standardizzati in grado di rilevare diverse classi di anticorpi contro il nuovo coronavirus, e che possano essere utilizzati insieme ai classici metodi diagnostici molecolari. La diagnosi di infezione si basa attualmente sulla rilevazione dell'RNA virale in tamponi rinofaringei mediante saggi a base molecolare, come la RT-PCR in tempo reale. I saggi sierologici, volti a rilevare diverse classi di anticorpi, costituiscono la migliore strategia di sorveglianza per raccogliere informazioni sulla risposta immunitaria umorale all'infezione e sulla diffusione del virus nella popolazione, al fine di valutare l'immunogenicità di nuovi vaccini e farmaci futuri per il trattamento e la prevenzione della malattia COVID-19. Questo studio si pone diversi obiettivi, elencati come segue:

1. Set-up e standardizzazione del test ELISA in modo da renderlo il più affidabile possibile e in grado di rilevare diverse classi di immunoglobuline.
2. Validazione della metodica secondo i criteri dettati dall'*International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

3. Comparazione dei risultati ottenuti tra un kit ELISA commerciale, un test ELISA standardizzato *in house* ed il test di Microneutralizzazione nella ricerca di anticorpi specifici contro il SARS-CoV2.
4. Valutazione delle risposte delle sottoclassi IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) in quei soggetti che hanno mostrato sia un alto segnale ELISA, che una comprovata attività di neutralizzazione.
5. Valutazione del reale contributo degli anticorpi IgA sulla potenza neutralizzante dei campioni di siero analizzati.

MATERIALI E METODI

Campioni di siero

Nel marzo/aprile 2020, 181 campioni di siero umano, sono stati raccolti dal laboratorio di Epidemiologia Molecolare dell'Università di Siena, Italia. I campioni sono stati raccolti in forma anonima in conformità con la legge etica italiana.

Tre campioni di siero umano provenienti da casi confermati di COVID-19, sono stati gentilmente forniti dalla Prof. Valentina Bollati dell'Università di Milano.

Sono stati utilizzati come controlli positivi nell'ELISA, l'anticorpo umano IgG1 anti-SARS-CoV-2 Spike (S1) CR3022 (Native Antigen, Oxford, UK), l'anticorpo umano IgM anti-SARS-CoV-2 Spike (S1) CR3022 (Native Antigen, Oxford, UK) e l'anticorpo monoclonale umano anti-Spike RBD (SARS-CoV-2/COVID 19) (eEnzyme, Gaithersburg, USA). Come controllo negativo, sia per l'MN che per l'ELISA, è stato usato siero umano depleto di IgA/IgM/IgG (Cod. S5393, Sigma, St. Louis, USA).

Per verificare la specificità del test ELISA sono stati, inoltre, utilizzati tre campioni di siero umano contenenti anticorpi neutralizzanti eterologhi, forniti dal NIBSC: 1° antisiero Standard Internazionale OMS per la Pertosse (lotto 06/140); 2° Standard Internazionale OMS per gli anticorpi contro il virus H1N1pdm dell'influenza (lotto 10/202); 1° Standard Internazionale OMS per l'antitossina antidifterica (lotto 10/262).

Antigeni purificati del SARS-CoV-2 e virus vivo

Cinque differenti proteine S purificate (S1 e RBD), sono state testate per la loro abilità di detectare specifici anticorpi umani: S1-SARS-CoV-2 (HEK293) Cod. REC31806-500, (Native Antigen, Oxford, UK); S1-SARS-CoV-2 (HEK293) Cod. SCV2-S1-150P (eEnzyme

Gaithersburg, MD, USA); S1-SARS-CoV-2 (HEK293) Cod. S1N-C52H3 (ACROBiosystems, Newark, DE, USA); Spike RBD-SARS-CoV-2 (Baculovirus-Insect cells) Cod. 40592-V08B and (HEK293) Cod. 40592-V08H (Sino Biological, Beijing, China).

Il virus *wild-type* SARS CoV-2 - strain *2019-nCov/Italy-INM11* è stato acquistato dall'*European Virus Archive Global* (EVAg, Istituto Spallanzani, Roma).

“In-house” S1 e RBD Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

L'ELISA è un test quantitativo che impiega un enzima coniugato ad un anticorpo per identificare e quantificare la presenza di anticorpi nel siero del sangue o in altri materiali, in base alla loro affinità per l'antigene rivestito in piastre a 96 pozzetti (Fig.19). In caso di positività, l'enzima induce una variazione di colore più intensa possibile, maggiore è la presenza di anticorpi nel campione. La variazione di colore viene rilevata attraverso uno spettrofotometro ed è espressa con un valore numerico attraverso un'unità di misura chiamata assorbanza (o densità ottica, OD) (Lin C., et al., 2017).

Rispetto agli altri saggi sierologici, l'ELISA può essere implementato per misurare diverse classi di immunoglobuline (IgM, IgA e IgG) e sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3, ecc.) di anticorpi specifici nei campioni di siero e nei lavaggi nasali utilizzando anticorpi secondari coniugati specifici per sottoclasse e isotipo. Questo test è particolarmente adatto per testare grandi pannelli di campioni per diversi motivi. Soprattutto perché richiede meno tempo, è più economico, semplice da eseguire e può essere completamente automatizzato. Non richiede, inoltre, l'utilizzo di virus vivo e quindi di strutture di biosicurezza elevata. Inoltre, i reagenti ELISA possono essere standardizzati con un impatto positivo sulla riproducibilità dei risultati. Il saggio ELISA non fornisce tuttavia informazioni sull'attività inibitoria degli anticorpi e come tale non è considerato un saggio funzionale, come lo è, ad esempio, quello di Microneutralizzazione.

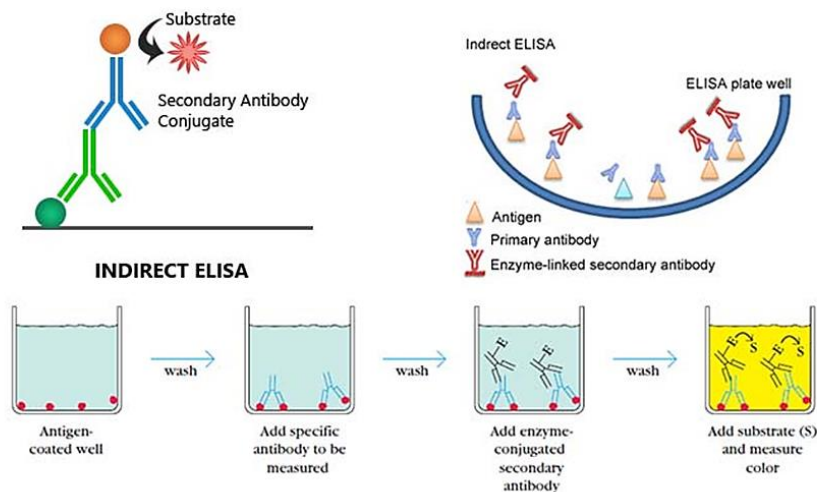


Fig.19: Principio alla base del test ELISA.

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Campioni di siero;
- Antigeni (proteina per il *coating*): proteina spike-S1 e spike-RBD
- Controllo positive e negative;
- Anticorpo secondario coniugato con HRP anti IgA/IgG/IgM HRP;
- *ELISA Coating-Buffer*: Dissolvere il contenuto di una capsula in 100 ml di acqua distillata =0.05M carbonato-bicarbonato;
- *ELISA Wash solution*: TBS-0.05% Tween 20 1X: aggiungere 10 ml di TBS-0.05% Tween 20 (20X) in 190 ml di acqua MilliQ;

In questo test ELISA è possibile usare *Non-Fat-Dry Milk* (NFDM) o Albumina Sierica Bovina (BSA) come *Blocking/Dilution Buffer*: nel nostro test viene utilizzato NFDM

- Non-Fat-Dry Milk;
- *ELISA Block/Dilution Buffer* TBS-5% NFDM: pesare 10g di non-fat dry milk ed aggiungerlo a 200 mL di TBS 1X; agitare bene la bottiglia finchè il contenuto non è completamente disciolto. Preparare la soluzione “fresca” ogni mattina;
- *ELISA Stop Solution* 0.18 M H₂SO₄;
- TMB;

Protocollo dell' ELISA

La prova viene eseguita su piastre a 96 pozzetti (Nunc Maxi Sorp); il test si svolge in due giorni consecutivi. Il seguente metodo si riferisce ad un test effettuato con 10 piastre.

Giorno 1: Coating delle piastre

Diluire l'antigene specifico nel *coating buffer*. La quantità di antigene da aggiungere al *coating buffer* dipende dalla concentrazione finale desiderata. Il seguente calcolo è un esempio per la preparazione di 10 piastre con uno stock di antigene concentrato 1mg/ml per una concentrazione finale in piastra di 1 µg/ml.

1. Preparare 100 ml di *coating buffer* come descritto sopra;
2. Rimuovere 100µl da questa soluzione;
3. Aggiungere 100 µl di antigene specifico;
4. Mescolare l'antigene diluito nel *coating buffer*;
5. Aggiungere 100 µl di questa soluzione in ciascun pozzetto della piastra;
6. Coprire le piastre con una *cover* per piastre e incubare per 1 h a temperatura ambiente o *overnight* a +4°C;

Giorno 2: Test ELISA

1. Lavare le piastre con 300 µl/Well di soluzione di lavaggio ELISA 3 volte;
2. Tamponare la piastra su un tovagliolo di carta;
3. Aggiungere 200 µl di *blocking buffer* in ogni pozzetto;
4. Coprire le piastre e incubare a 37°C da una a tre ore;
5. Scongelerare il controllo positivo e i campioni;

I seguenti step (da 6 a 9) possono essere effettuati durante il periodo di incubazione:

6. In una piastra di diluizione da 2,2 Ml aggiungere 5 µl di campioni nella prima colonna (da A1 a H1) e 495 µl di *Dilution Buffer* per avere una diluizione 1:100; oppure aggiungere 50 µl di campioni nella prima colonna (da A1 a H1) e 450 µl di *Dilution Buffer* per avere una diluizione 1:10; aggiungere 250 µl di *Dilution Buffer* nelle colonne dalla 2 alla 10 (Vedi schema delle piastre di diluizione Fig.20; i volumi indicati sono per due ripetizioni di campioni);
7. Eseguire diluizioni seriali di 2 volte trasferendo 250µl da ogni campione (dalla colonna 1 alla colonna 10 - Vedi schema delle piastre di diluizione Fig.20).

Per il controllo positivo e negativo utilizzare una piastra di diluizione a parte, da 2,2, Ml

8. Aggiungere 2 ml di *Dilution Buffer* nei pozzetti A11-12 e poi rimuovere 2 µl; aggiungere, quindi, 2 µl di controllo positivo per raggiungere la diluizione 1:1000; aggiungere 1 ml di *Dilution Buffer* da B11-12 ai pozzetti D11-12; eseguire una diluizione seriale trasferendo 1 ml dalla fila A alla fila D.
9. Per il controllo negativo Aggiungere 990 µl di *Dilution Buffer* ai pozzetti H11 e H12, quindi aggiungere 10 µl di campione negativo per ottenere una diluizione 1:100;

10. Dopo l'ora di incubazione con il *blocking buffer*, lavare le piastre con 300 μ l / pozzetto di soluzione di lavaggio ELISA 3 volte;
Trasferire 100 μ l da ogni pozzetto della piastra di diluizione da 2,2 MI nel pozzetto corrispondente della piastra ELISA utilizzando una pipetta multicanale (vedi Layout della piastra ELISA Fig.21);
 11. Coprire la piastra e incubare a 37°C per 1h;
 12. Per 10 piastre preparare 100 ml di *Dilution Buffer* e poi aggiungere la quantità richiesta dell'anticorpo secondario coniugato HRP *anti-Human IgA/IgG/IgM* di capra per ottenere la diluizione di lavoro desiderata, rispettivamente 1:75.000, 1:100.000, 1:100.000;
 13. Lavare le piastre con 300 μ l/Well di soluzione di lavaggio ELISA 3 volte;
 14. Aggiungere 100 μ l della soluzione di anticorpo secondario in ogni pozzetto delle piastre ELISA;
 15. Coprire la piastra o le piastre e incubare a 37°C per 1h (o 30 min a seconda del set up);
 16. Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, lavare le piastre con 300 μ l / pozzetto di soluzione di lavaggio ELISA 3 volte;
 17. Aggiungere 100 μ l di substrato TMB a tutti i pozzetti delle piastre ELISA;
 18. Incubare le piastre al buio a R.T. per 20 minuti;
 19. Arrestare la reazione aggiungendo 100 μ l di soluzione di stop ELISA;
 20. Impostare il lettore a 450nm e leggere le piastre;
- Valutare la piastra entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

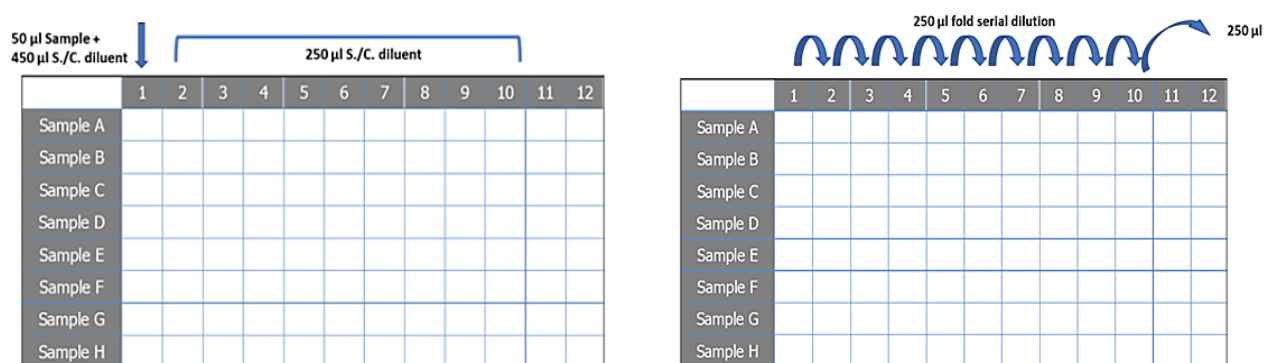


Fig.20: Schema della piastra di diluizione.

		2-fold serial dilutions											
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sample 1												POS	POS
Sample 1												POS	POS
Sample 2												POS	POS
Sample 2												POS	POS
Sample 3												BLAN K	BLAN K
Sample 3												BLAN K	BLAN K
Sample 4												BLAN K	BLAN K
Sample 4												NEG	NEG

Positive control Dilutions starting from 1:1000

Fig.21: Schema della piastra ELISA.

Calcolo dei risultati

Il titolo anticorpale per un dato campione sarà espresso come il reciproco della diluizione più alta che dà un valore di assorbanza maggiore di un valore di *cut-off*.

Il valore del *cut-off* può essere valutato durante un *set up*.

È possibile valutare il *cut-off* attraverso diversi metodi;

1. Utilizzando il metodo "*Limit of Blank*";
2. Utilizzando uno o più campioni negativi;
3. Utilizzando la "*Visita di screening*";

Nel nostro studio, è stato stabilito un valore di *cut-off* pari a 3 volte la media dei valori di OD dei bianchi della piastra.

I campioni con OD inferiori al valore di *cut-off* alla prima diluizione (1:100) sono stati assegnati come negativi.

Controllo di qualità interno del test

Se falliscono i seguenti parametri di controllo interno c'è necessità di ripetere l'analisi dei campioni:

- Il valore del bianco deve avere un OD <0,150;
- Il campione negativo deve avere un valore di OD sotto il *cut-off*;

- Il Coefficiente di Variazione (CV) tra il titolo dei due replicati di un dato campione deve essere $\leq 20\%$;

Kit ELISA commerciale

Sono stati rilevati anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 specifici, per mezzo di un kit ELISA commerciale: Euroimmun.

Le piastre Euroimmun-ELISA sono state rivestite con la proteina strutturale ricombinante S1 del SARS-CoV-2. Per eseguire il test sono state seguite le indicazioni e gli step forniti direttamente dalle istruzioni del kit stesso. Il test fornisce risultati semi-quantitativi calcolando il rapporto della densità ottica (OD) del campione di siero rispetto all'OD del calibratore interno del test. Secondo le istruzioni del produttore, i campioni positivi hanno un $OD \geq 1,1$, i campioni borderline un OD tra 0,8 e 1,1 e i campioni negativi un $OD < 0,8$.

“In-House” RBD Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

È stato eseguito un ELISA indiretto per determinare la concentrazione di anticorpi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 specifici per RBD nei campioni di siero. Le piastre a 96 pozzetti sono state rivestite con $1\mu\text{g/mL}$ di Spike-RBD purificato. I campioni di siero sono stati diluiti da 1:50 a 1:400. Sono stati utilizzati anticorpi secondari *mouse anti-human* IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 Fc-HRP con una diluizione di 1:8000. Il valore di *cut-off* è stato stabilito come riportato sopra.

Generazione di siero depleto di IgA

Le piastre ELISA sono state rivestite con $10\mu\text{g/mL}$ di anticorpi di capra purificati ad alta affinità anti IgA e successivamente bloccate per 1 ora a 37°C . Sono stati poi seminati in piastra $10\mu\text{l}$ di ogni campione di siero positivo per MN e IgA e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C . Dopo il tempo di incubazione i campioni di siero sono stati raccolti e conservati a $+4^\circ\text{C}$; questi sono poi stati analizzati nuovamente utilizzando il saggio MN, per verificare se il trattamento avesse causato dei cambiamenti nei titoli di questi sieri.

MicroNeutralization (MN) in adesione

Il principio alla base di questa metodica è lo stesso del test MN descritto per lo studio 1, ma in questo caso non ci serviamo di una sospensione cellulare preparata il giorno stesso del test; la

sospensione cellulare viene preparata e poi aggiunta 100 µl a pozzetto nelle piastre a 96 pozzetti che poi vengono incubate per 18-24 ore a 37 gradi (*pre-seed*), prima di essere utilizzate il giorno del test; per questo la metodica è definita MN in adesione.

PROTOCOLLO DEL TEST:

Materie prime e reagenti

- Terreno cellulare
- DPBS
- Virus vivo
- Linea cellulare: VERO E6
- Controllo positivo
- Controllo negativo

Preparazione dei reagenti

Terreno cellulare:

Il terreno da utilizzare per il test (*MN medium*) è il *Dulbecco's modification of Eagle medium* (DMEM) con 2% di siero bovino fetale (FBS), 1% di L-glutamina, e 1% di penicillina /streptomicina.

Il terreno utilizzato per la crescita delle cellule (*MN growth medium*) è il *Dulbecco's modification of Eagle medium* (DMEM) con il 10% di FBS, l'1% di L-glutamina, e l'1% di penicillina /streptomicina.

Soluzione virale:

La concentrazione del virus da utilizzare è di solito 2000 *Tissue Culture Infective Dose 50%* (TCID₅₀)/1ml o 200 TCID₅₀/100µl.

Sospensione cellulare:

La sospensione cellulare di Vero E6 deve essere seminata da un operatore, in piastre a 96 pozzetti 18-24 ore prima dell'esperimento ad una concentrazione di $1,5 \times 10^5$ cellule/ml, poi queste vengono incubate a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 5% \pm 1% di CO₂ per 18-24 ore.

Controllo positivo

Un siero contenente anticorpi neutralizzanti specifici per il SARS-CoV-2 rappresenta il controllo positivo.

Controllo negativo

Il controllo negativo è utilizzato per testare la sensibilità del virus; viene utilizzato il siero umano depleto di IgA/ IgM/ IgG (*Human Serum Minus*).

Protocollo dell'MN in adesione

Titolazione del virus

La concentrazione di virus da utilizzare è di 2000 TCID50/1ml.

Il TCID50 è calcolato mediante il test di titolazione del virus come indicato di seguito:

- In una piastra di diluizione aggiungere 180 μ l di MN *Medium* in ogni pozzetto dalla colonna 1 alla 12.
- Nella colonna 1 vengono aggiunti 20 μ l di soluzione madre del virus (vedi Fig.22).
- Eseguire una diluizione seriale "tenfold" (log10) trasferendo 20 μ l dalla colonna 1 fino alla colonna 11.
- La colonna 12 non deve contenere virus e viene utilizzata come controllo cellulare (CC).
- Rimuovere il terreno dalle piastre a 96 pozzetti, contenenti un monostrato di cellule VERO E6 confluenti (*piastre in pre-seed*).
- Trasferire 100 μ l dalla piastra di diluizione alla piastra contenente le cellule.
- Incubare le piastre a 37°C, 5% di CO2 per 3 giorni.
- Dopo l'incubazione, osservare la piastra al microscopio ottico e segnare i pozzetti che mostrano effetto citopatico (CPE) dovuto al SARS-CoV-2 o quelli che invece, mostrano cellule ancora vive e un tappeto cellulare conservato.
- Calcolare il TCID50 con il metodo Reed-Muench.

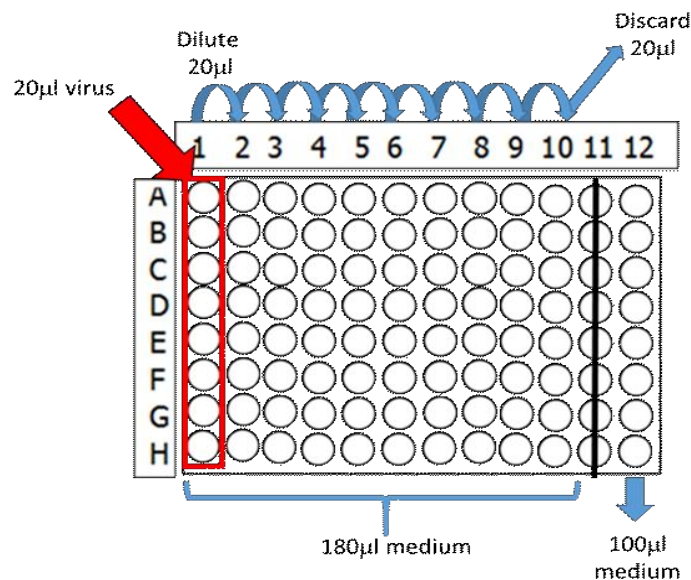


Fig. 22: Schema piastra di titolazione del virus

Valutazione dei risultati tramite la CPE

Tutti i pozzetti che mostrano CPE sono indicati con "+" (pozzetti positivi), altrimenti con il simbolo "-" (pozzetti negativi, assenza di CPE). I risultati CPE sono registrati in un "Foglio di

calcolo” che secondo il metodo Reed-Muench, calcola automaticamente i valori di TCID₅₀ del virus in 100 µl e in 1 ml.

Una volta ottenuto il titolo è possibile calcolare la quantità di virus necessaria (*working virus solution*) per eseguire il test. Questo titolo viene utilizzato per calcolare il fattore di diluizione in modo da avere una soluzione virale di lavoro contenente ad esempio 2000 TCID₅₀/ml ($10^{3,3}$) o 200 TCID₅₀/100µl ($10^{2,3}$).

Test di Microneutralizzazione

Prima di iniziare il test, tutti i campioni e i controlli sono inattivati per 30 minuti ± 10 minuti a 56°C ± 1°C.

I campioni sono testati in duplicato in una sessione in due diverse piastre a 96 pozzetti a fondo piatto. Le quantità di reagenti descritte in questa procedura sono indicative per eseguire una ripetizione per siero per piastra.

Le fasi operative sono elencate di seguito:

1. Tutti i pozzetti della piastra di diluizione, tranne la colonna 1 e la colonna 11, sono riempiti con 60 µl di terreno MN;
2. La colonna 1 è riempita con 108 µl di terreno MN. La colonna 11 di ogni piastra (da A11 a H11) è generalmente utilizzata come controllo cellulare (CC), per controllare e monitorare la crescita del tappeto cellulare standard, ed è riempita con 120 µl di terreno MN; la colonna 12 è invece utilizzata come controllo virus (VC) e riempita con 60 µl di terreno;
3. Vengono aggiunti 12 µl di campione di siero ad ogni pozzetto della colonna 1 per ottenere una diluizione del siero di 1:10;
4. Vengono eseguite diluizioni seriali (1:2) trasferendo 60 µl progressivamente dalla colonna 1 alla 10;
5. Si aggiungono 60 µl di soluzione di virus (2000TCID₅₀/ml) in ogni pozzetto ad eccezione della colonna 11 (controllo cellule); (Fig.24)
6. Le piastre sono incubate 1h a 37 ±1 °C e 5± 1% di CO₂;
7. Al termine del tempo di incubazione, 100 µl di miscela virus-siero vengono trasferiti nella piastra di microtitolazione a 96 pozzetti contenente un tappeto cellulare sano e confluyente, questa poi viene messa in incubazione a 37 ±1 °C e 5± 1% di CO₂ per 3 giorni e letta poi tramite microscopio ottico.

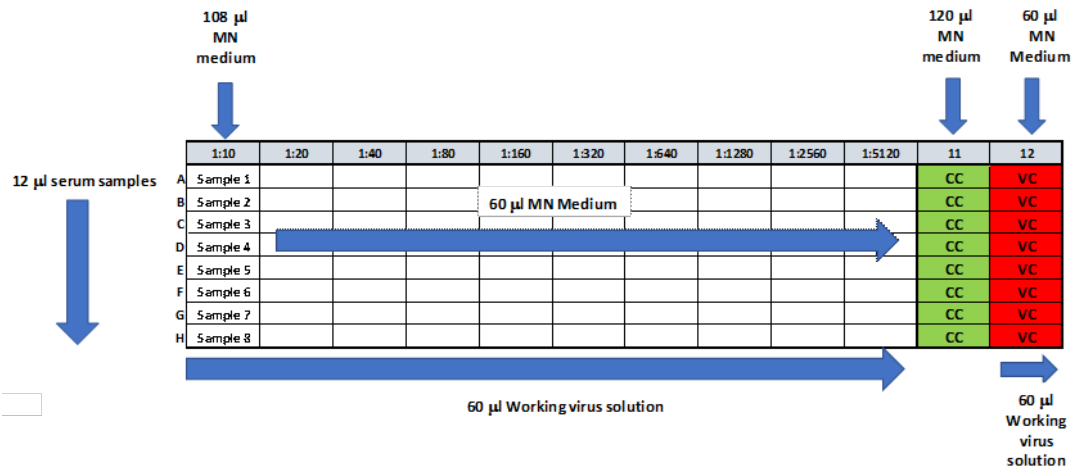


Fig.23: Schema di piastra

Calcolo dei risultati

Il titolo di Microneutralizzazione (MNt) è il reciproco della più alta diluizione del campione che protegge dal CPE almeno il 50% delle cellule.

Se non si osserva alcuna reazione di neutralizzazione, si assume che MNt sia <10, che essendo sotto il limite inferiore di rilevazione (10), deve essere riportato come 5.

Controllo di qualità interno del test

Il test è valido se:

- Il controllo cellule (CC) mostra un monostrato cellulare sano e nessuna evidenza di CPE;
- Il controllo virus (VC) mostra effetto citopatico nel monostrato cellulare;
- Il titolo di neutralizzazione tra un duplicato e l'altro, dello stesso campione, non differisce di più di uno step di diluizione.

RISULTATI

Set-up e standardizzazione del test ELISA “in-house”

Per impostare la metodica, sono stati utilizzati: tre campioni di siero umano derivati da donatori convalescenti, insieme a un pool di sieri negativi. Come controllo del test sono stati utilizzati, l'anticorpo monoclonale umano IgG1 (mAb) anti-SARS-CoV-2 spike (S1) (CR3022 Absolute antibody), l'anticorpo monoclonale umano IgM (mAb) anti-SARS-CoV-2 spike (S1) (CR3022 Absolute antibody) e l'anticorpo monoclonale umano IgG1 anti-Spike RBD (SCV2-RBD eEnzyme). Inoltre, per valutare la specificità del test, nel rilevare solo anticorpi contro la S1 o

la proteina RBD, sono stati utilizzati diversi sieri umani iperimmuni a varie malattie infettive (influenza, difterite e pertosse).

Sono state testate diverse proteine S ricombinanti purificate (dominio S1 e RBD) per la loro capacità di rilevare specifici anticorpi umani: S1-SARS-CoV-2 (HEK293) (Native Antigen); S1-SARS-CoV-2 (HEK293) (eEnzyme); S1-SARS-CoV-2 (HEK293) (ACROBiosystems); Spike RBD-SARS-CoV-2 (Baculovirus-Insect cells) e (HEK293) (Sino Biological).

Ogni proteina è stata valutata utilizzando tre concentrazioni di *coating* (1, 2 e 3 µg/mL) e quattro diverse diluizioni dell'anticorpo secondario HRP coniugato, anti IgG-IgM-IgA.

La decisione finale è stata quella di utilizzare come concentrazione di coating 1µg/mL, che ci consente di avere un buon segnale al momento della lettura e di distinguere chiaramente i campioni positivi da quelli negativi e l'anticorpo secondario diluito 1:100.000, tranne per le IgA che, avendo un segnale di partenza più basso, necessitano di una diluizione inferiore di 1:75.000.

Abbiamo anche valutato l'impatto del tempo di incubazione dell'anticorpo secondario, analizzando due piastre in parallelo e incubandone una per 1 ora e la seconda per 30 minuti. I dati, sia per S1 che per RBD, presentano una leggera variazione tra i due tempi di incubazione, che non è però significativa e quindi entrambe le condizioni possono essere considerate efficaci; per diminuire però i tempi del test, abbiamo optato per l'incubazione di 30 minuti che mostra un segnale leggermente più chiaro, ovvero forte nel caso dei sieri dei pazienti convalescenti e chiaramente basso sia nel caso del siero negativo, che in quello dei sieri eterologhi, confermando anche la specificità del nostro test .

Durante il *set-up* sono state testate diverse *blocking/diluent solutions* contenenti l'1% di BSA, il 2,5% di latte e il 5% di latte. La specificità del test è aumentata significativamente utilizzando la *blocking/diluent solutions* con latte al 5% rispetto alla BSA, che occasionalmente offre risultati non specifici e un background generale più elevato.

Infine, analizzando i risultati delle diverse proteine S e RBD testate, abbiamo dedotto che:

- Spike RBD-His Recombinant Protein (SARS-CoV-2): Cod. 40592-V08H, Sino Biological: questa proteina ha dimostrato essere fortemente riconosciuta dagli anticorpi presenti nei campioni positivi con un segnale sempre molto superiore a quello presentato da qualsiasi piastra rivestita con S1. Questa elevata sensibilità è associata anche, ad un'elevata specificità, dimostrata sia dal basso *background* ottenuto in ogni piastra RBD, anche alle più alte concentrazioni di *coating*, che dal segnale molto basso fornito dai campioni negativi.

Per questi motivi, non sono state analizzate proteine RBD di altri fornitori.

- Spike Glycoprotein S1 (SARS-CoV-2) (HEK293): Cod. REC31806-500, Native Antigen: questa proteina, per prima cosa, non ha fornito nei vari esperimenti risultati riproducibili, inoltre ha dimostrato avere scarsa specificità nel discriminare i campioni positivi da quelli negativi, mostrando segnali troppo bassi sia per i sieri di pazienti convalescenti che per gli anticorpi monoclonali utilizzati come controllo positivo del test e valori di OD troppo elevati nelle prime diluizioni dei sieri negativi, rischiando di fornire risultati “falsi positivi”.
- Spike Glycoprotein S1 (SARS-CoV-2) (HEK293): Cod. S1N-C52H3, Acrobiosystems: da una prima valutazione, questa proteina, ci ha fornito risultati incoraggianti: OD molto elevati per i campioni positivi (sieri convalescenti e anticorpo monoclonale) e solo lievi segnali per i campioni negativi; nonostante questi risultati, però, rispetto alle altre due proteine Spike, questa ha fornito in tutti i test effettuati un *background* generale molto elevato e per questo è stata scartata.
- Spike Glycoprotein S1 (SARS-CoV-2) (HEK293): Cod. SCV2-S1-150P, eEnzyme: per questa proteina sono state inizialmente valutate tre diverse concentrazioni di *coating* (1-2-3µg/mL) ed è stato evidenziato un *background* generale basso a 1-2µg/mL. In confronto alle altre proteine Spike, dei diversi fornitori, questa ha mostrato, con risultati confermati da più esperimenti, valori di OD di *background* ottimali, e un'ottima capacità nel discriminare i campioni negativi da quelli positivi con alta specificità e ripetibilità.

A seguito di queste valutazioni abbiamo concluso che la proteina RBD (della Sino Biologicals) e la S1 (della eEnzyme) sono in grado di fornire i migliori risultati in termini di specificità e sensibilità per il nostro test ELISA e sono state scelte come candidate per i test.

Validazione del test ELISA

La validazione di un metodo analitico consiste nella sua conferma sperimentale e nel fornire prove obiettive che la procedura sottoposta a valutazione sarà in grado di fornire risultati affidabili.

L'ICH (*International Conference of Harmonization*), fu il primo organo a trattare il tema della validazione. In seguito, negli ultimi 30 anni, sono state sviluppate diverse linee guida da parte di agenzie e autorità di regolamentazione internazionali per fornire i parametri e i criteri da valutare per la convalida delle procedure analitiche. Nel 1990 Europa, Stati Uniti e Giappone hanno implementato i requisiti di presentazione per i nuovi prodotti farmaceutici attraverso l'istituzione di un progetto unico, la "Conferenza internazionale sull'armonizzazione" (ICH),

che mirava a sviluppare termini, definizioni e requisiti di base armonizzati per la convalida di metodi analitici. Le agenzie di regolamentazione negli Stati Uniti come la Food and Drug Administration (FDA) hanno anche sviluppato una guida per le procedure analitiche e la convalida dei metodi che completano quelle fornite dalla ICH (FDA, 2015) con raccomandazioni specifiche fornite anche per la validazione dei test bio-analitici (FDA, 2018). I parametri raccomandati dalle linee guida ICH per convalidare i saggi sierologici, sono: Specificità, Precisione (Ripetibilità e Precisione intermedia), Accuratezza, Linearità e Robustezza (ICH, 2015).

- **Specificità:** la specificità è la capacità del test bio-analitico di rilevare unicamente l'analita di interesse senza subire interferenze causate da altre componenti che ci aspettiamo siano presenti nel campione analizzato. La mancanza di specificità in un test analitico può essere compensata da altre procedure analitiche come l'effettuazione di procedure di pre-trattamento del campione. Ciò non aumenta la specificità del metodo analitico in esame ma diminuisce le sostanze che interferiscono con il dosaggio dell'analita. La definizione di specificità ha diverse implicazioni: garantire l'identità dell'analita e garantire che tutte le procedure d'analisi consentano un'accurata dichiarazione di tutte le impurità dell'analita (metalli pesanti, residui di solventi). E' importante inoltre che il test fornisca un risultato esatto, che dia un'informazione precisa sulla concentrazione e sulla potenza dell'analita in un campione. In un ambito eterogeneo e complesso come quello delle reazioni immunologiche nell'organismo umano, la specificità di un test risulta determinante per poter essere in grado di rilevare la reazione immunitaria contro l'antigene di interesse.
- **Accuratezza:** l'accuratezza è la capacità del test analitico di produrre un risultato, riferito all'analita di interesse, che si discosti il meno possibile da un valore che è convenzionalmente ritenuto Vero.
- **Precisione:** la precisione di un procedimento analitico dovrà essere dimostrata ottenendo risultati simili in seguito ad una serie di misurazioni derivate da campionamenti multipli ricavati da uno stesso campione sotto condizioni prestabilite. La precisione di un processo analitico è espressa come varianza, deviazione standard o coefficiente di variazione di una serie di misurazioni. La precisione deve essere considerata in tre livelli: Ripetibilità, Precisione intermedia e Riproducibilità. La **Ripetibilità** esprime la precisione all'interno di una stessa serie analitica, nel corso di un breve periodo di tempo. La **Precisione Intermedia** esprime variazioni tra differenti serie analitiche nello stesso laboratorio ma eseguite da differenti operatori, in giorni

differenti, con differente strumentazione, ecc. La **Riproducibilità** esprime la precisione di differenti serie analitiche svolte da differenti laboratori. La **Linearità** di una procedura analitica è la capacità di ottenere (avendo concentrazioni note) risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita nel campione.

- **Robustezza:** la robustezza di un saggio bio-analitico è la misura della sua capacità di non essere influenzato da piccole ma volute modificazioni nelle condizioni di svolgimento del test, ciò produrrà indicazioni dei limiti della sua attuabilità durante il normale impiego.

Qualora il metodo analitico preso in esame soddisfi tutte queste caratteristiche può essere considerato affidabile ed utilizzato per gli scopi richiesti.

Il nostro test ELISA è stato validato utilizzando sia la proteina S1 che l'RBD.

SPECIFICITA'

Campioni:

HP-HS: *High Positive antibody response* per Sars-Cov-2

NS-HS: *Negative human serum, Minus IgA/IgM/IgG*

HP-HET: *Heterologous serum* (influenza, difterite, pertosse) (ratio 1:1:1)

HP-HS/HP-HET: *Positive antibody response* per il virus omologo mixato con il siero eterologo (ratio 1:1)

HP-HS/NS-HS: *Positive antibody response* per il virus omologo mixato con il siero negativo (ratio 1:1)

mAb: Anticorpo monoclonale anti S1 e anti RBD

Per dimostrare la specificità del metodo nel rilevare le IgG anti-RBD e anti-S1 del SARS-CoV-2, sono stati analizzati campioni positivi per il virus omologo e per virus eterologhi.

In particolare, l'HP-HS è stato miscelato in rapporto 1:1 con un siero eterologo (HP-HET) e il titolo è stato confrontato con l'HP-HS miscelato in rapporto 1:1 con il siero negativo (NS-HS).

Lo schema della piastra in Figura 25 riassume il layout dell'esperimento.

Tutti i campioni indicati sopra sono stati testati in 4 ripetizioni per piastra e in 2 diverse piastre, (8 titoli ELISA per ogni campione) per generare 4 valori per campione e la % della *geometric standard deviation* (GSD) è stata calcolata tra i valori riferibili ($GSD\% = (e^{SD}-1) \times 100$, dove SD è la deviazione standard del ln (logaritmo naturale) dei valori.

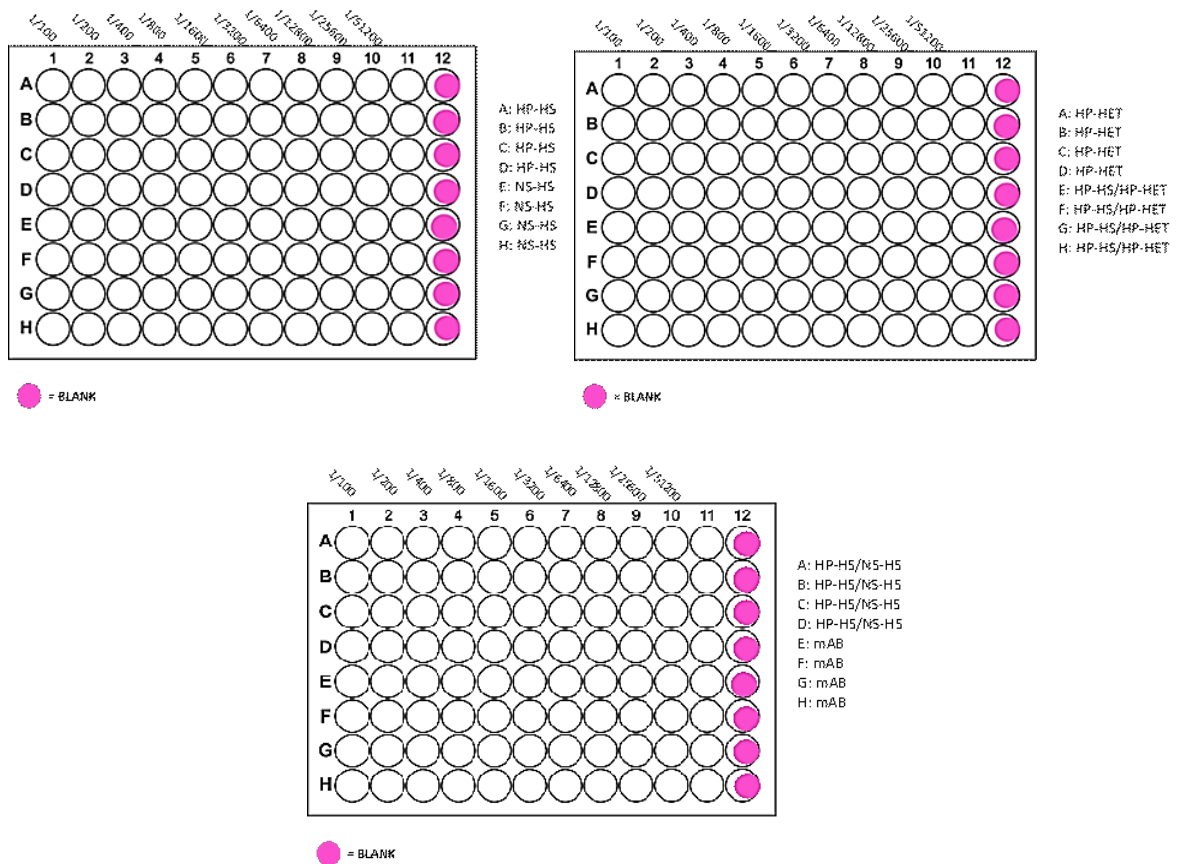


Fig.24: Schema di piastra per la Specificità.

Criteri di accettabilità

NS-HS e HP-HET devono mostrare risultati negativi; la %GSD tra i valori di HP-HS/NS-HS e i valori di HP-HS/HP-HET deve essere $\leq 50,0\%$.

I risultati dell'mAb e di HP-HS devono fornire titoli positivi.

Risultati

Sample	P1_R1	P1_R2	P1_R3	P1_R4	P2_R1	P2_R2	P2_R3	P2_R4
HP-HS	23878.5	31602.8	24602.6	22096.8	23759.7	34377.1	25600.0	22684.3
NS-HS	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
HP-HET	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
HP-HS/HP-HET	15690.3	13191.8	14791.1	11084.1	15526.5	12865.6	14229.4	10974.3
HP-HS/NS-HS	12172.2	12167.8	11990.1	12101.1	12019.8	12076.9	11680.2	11986.1
mAb	93706.5	106267.4	102371.0	78997.3	93637.6	104640.0	100738.0	75428.6

Sample	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4	SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
HP-HS	23819.039	32960.773	25096.344	22388.636	10.1	10.4	10.1	10.0	0.17054	18.6%	POS	PASS
NS-HS	<100	<100	<100	<100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	PASS
HP-HET	<100	<100	<100	<100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	PASS
HP-HS/HP-HET	15608.175	13027.718	14507.558	11029.075	9.7	9.5	9.6	9.3				
HP-HS/NS-HS	12095.721	12122.279	11834.155	12043.501	9.4	9.4	9.4	9.4	0.11534	12.2%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
mAb	93672.028	105450.551	101551.258	77192.303	11.4	11.6	11.5	11.3	0.13903	14.9%	POS	PASS

P: Plate
 R: Replicate
 RV: Reportable Value
 In RV: natural logarithm of Reportable Value
 SD: Standard Deviation
 GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 3: risultati Specificità per S1.

Sample	P1_R1	P1_R2	P1_R3	P1_R4	P2_R1	P2_R2	P2_R3	P2_R4
HP-HS	51200.0	51200.0	51200.0	51200.0	51200.0	51200.0	51200.0	51200.0
NS-HS	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
HP-HET	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
HP-HS/HP-HET	45605.5	48166.8	48541.2	31874.5	44888.7	47712.8	47905.9	31401.9
HP-HS/NS-HS	45221.2	44033.7	41010.4	44081.7	44681.4	43564.5	40537.2	43576.3
mAb	376238.7	366441.9	408436.4	441394.6	373021.4	360727.3	403437.0	436666.7

Sample	RV_1	RV_2	RV_3	RV_4	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4	SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
HP-HS	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	10.8	10.8	10.8	10.8	0.00000	0.0%	POS	PASS
NS-HS	<100	<100	<100	<100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	PASS
HP-HET	<100	<100	<100	<100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	PASS
HP-HS/HP-HET	45245.669	47939.253	48222.483	31637.307	10.7	10.8	10.8	10.4	0.13481	14.4%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS/NS-HS	44950.477	43798.488	40773.083	43828.298	10.7	10.7	10.6	10.7	0.08483	8.9%	POS	PASS
mAb	374626.613	363573.351	405929.004	439024.280	12.8	12.8	12.9	13.0	0.08483	8.9%	POS	PASS

P: Plate

R: Replicate

RV: Reportable Value

ln RV: natural logarithm of Reportable Value

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 4: risultati Specificità per RBD.

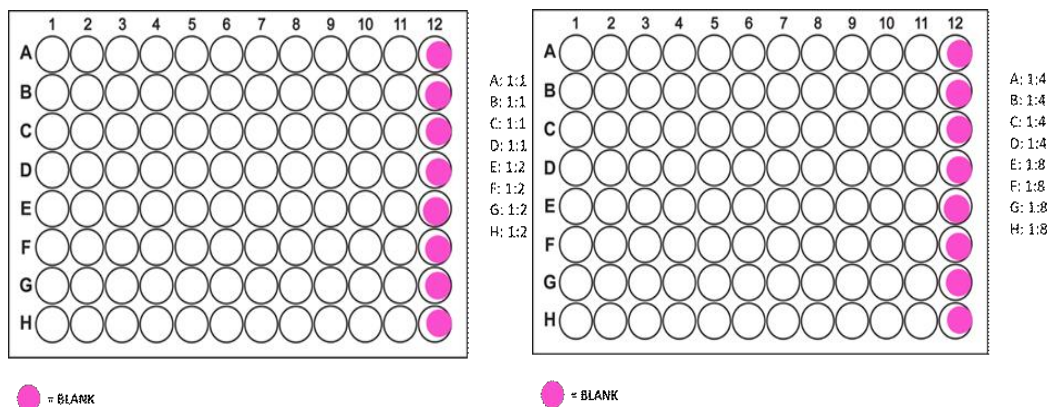
I risultati nelle tabelle 3 e 4 mostrano che il nostro test è specifico, tutti i criteri di accettabilità sono soddisfatti.

PRECISIONE

Campioni

HP-HS: High Positive antibody response per Sars-Cov-2

La precisione del test, è stata valutata testando l'HP-HS puro e pre-diluito 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 nel *dilution buffer*; quindi, considerando che il campione nel primo pozzetto è sempre diluito 1:100, l'effettiva diluizione di partenza dei campioni nel primo pozzetto è 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800. L'HP-HS e tutte le diluizioni sono state testate in 4 ripetizioni per piastra, in due piastre eseguite da un operatore il giorno 1 (8 determinazioni per ogni diluizione) per generare 4 valori riferibili per ogni diluizione del campione; lo stesso test è stato eseguito da un altro operatore il giorno 2 per ottenere un totale di 8 valori per ogni diluizione. Lo schema della piastra in Figura 26 riassume il layout dell'esperimento.



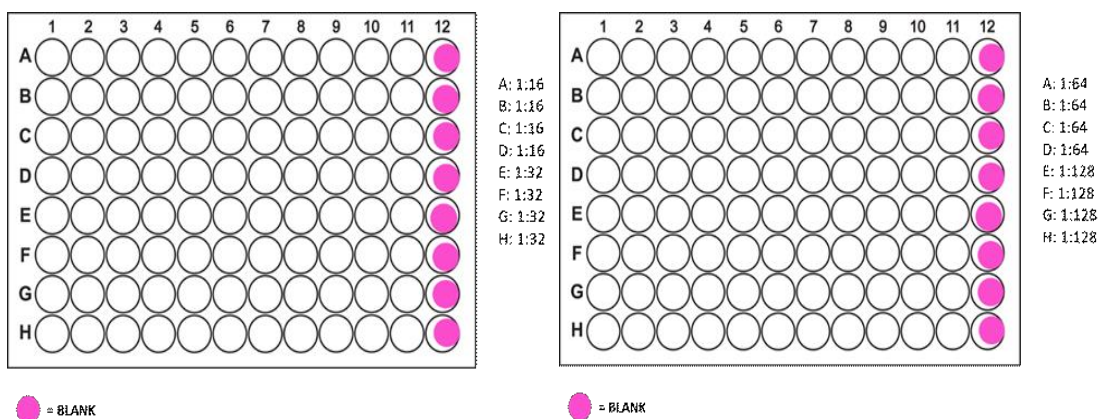


Fig.25: Schema di piastra per la Precisione.

Risultati totali per la precisione

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1)				Operator 1 Day 1 (Plate 2)			
	OP1_D1_P1_Rep 1	OP1_D1_P1_Rep 2	OP1_D1_P1_Rep 3	OP1_D1_P1_Rep 4	OP1_D1_P2_Rep 1	OP1_D1_P2_Rep 2	OP1_D1_P2_Rep 3	OP1_D1_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	37612.756	40280.080	41503.926	38339.048	36925.346	39938.086	41044.131	37816.787
HP-HS 1/2	38115.556	38295.510	44755.658	39349.213	35978.378	37896.480	44164.434	38839.359
HP-HS 1/4	27155.443	34760.784	32955.656	42036.364	25562.899	34968.765	31804.235	38869.110
HP-HS 1/8	34795.565	32452.525	22905.983	28297.318	33783.153	31673.469	22889.083	24100.901
HP-HS 1/16	28369.231	25033.210	24954.303	24762.791	28291.589	24800.000	24698.051	24525.479
HP-HS 1/32	37453.521	35232.417	43932.903	38714.386	36882.124	34198.176	42286.265	40637.249
HP-HS 1/64	22280.713	23034.267	22526.733	22183.126	22405.396	23326.952	22965.073	22078.680
HP-HS 1/128	25462.366	18434.188	15704.738	12800.000	23793.674	18146.835	14780.952	12800.000

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1)				Operator 2 Day 2 (Plate 2)			
	OP2_D2_P1_Rep 1	OP2_D2_P1_Rep 2	OP2_D2_P1_Rep 3	OP2_D2_P1_Rep 4	OP2_D2_P2_Rep 1	OP2_D2_P2_Rep 2	OP2_D2_P2_Rep 3	OP2_D2_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	74068.486	60441.877	51200.000	51048.968	63784.512	61950.178	51200.000	51087.225
HP-HS 1/4	32888.889	32770.516	28014.035	24955.115	33016.822	33025.954	28193.833	25054.028
HP-HS 1/8	32433.466	25728.321	25373.297	35575.348	32600.399	25579.650	25340.541	35748.207
HP-HS 1/16	28062.974	23483.307	21877.449	22817.391	28318.584	24456.357	21860.696	22241.463
HP-HS 1/32	24567.428	23419.558	26084.161	24930.719	24486.107	23265.409	25723.671	24323.988
HP-HS 1/64	21988.968	30254.545	24299.736	23507.851	21916.693	29963.636	24265.241	23318.106
HP-HS 1/128	24601.232	24728.950	30042.009	31772.710	24635.983	24681.481	30089.100	31704.615

OP: Operator D: Day
P: Plate Rep: Replicate

Tabella 5: risultati Precisione per S1 (titoli ponderati).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1)				Operator 1 Day 1 (Plate 2)			
	OP1_D1_P1_Rep 1	OP1_D1_P1_Rep 2	OP1_D1_P1_Rep 3	OP1_D1_P1_Rep 4	OP1_D1_P2_Rep 1	OP1_D1_P2_Rep 2	OP1_D1_P2_Rep 3	OP1_D1_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	77395.349	74304.693	74150.582	57600.000	76326.600	72850.817	73022.398	56027.282
HP-HS 1/4	50237.878	71298.977	71698.981	73494.173	49886.420	70027.767	70549.673	72651.383
HP-HS 1/8	77108.930	62783.937	82909.331	57553.285	75597.032	61236.219	81749.333	56529.968
HP-HS 1/16	52340.312	81994.203	70551.510	63685.532	51143.363	80551.369	67760.767	62284.536
HP-HS 1/32	61528.530	66245.208	73627.165	74086.636	60305.539	66205.329	72357.388	72429.268
HP-HS 1/64	81619.893	70721.664	67527.915	64114.901	80430.880	69299.649	66323.132	62894.964
HP-HS 1/128	68892.147	69604.589	71171.019	76488.029	67760.767	68250.241	69810.239	75078.525

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1)				Operator 2 Day 2 (Plate 2)			
	OP2_D2_P1_Rep 1	OP2_D2_P1_Rep 2	OP2_D2_P1_Rep 3	OP2_D2_P1_Rep 4	OP2_D2_P2_Rep 1	OP2_D2_P2_Rep 2	OP2_D2_P2_Rep 3	OP2_D2_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	100558.738	95760.599	100694.494	79107.296	100554.080	95799.750	100366.027	77950.774
HP-HS 1/4	101975.510	93075.269	88239.137	81464.138	101779.592	93062.508	87272.727	81087.894
HP-HS 1/8	78145.047	85487.434	94375.352	99380.513	77963.636	85230.211	94136.382	99251.249
HP-HS 1/16	90432.140	84274.023	81726.944	75784.463	89001.110	84523.795	81133.542	75644.147
HP-HS 1/32	81464.316	86625.818	91918.417	97818.754	80951.351	86173.402	91666.412	97959.415
HP-HS 1/64	99243.360	89462.955	82652.566	79957.266	98659.683	89325.322	81872.446	79167.398
HP-HS 1/128	77530.301	81449.009	89600.000	91855.465	77142.408	81140.049	88386.023	91477.333

OP: Operator D: Day
P: Plate Rep: Replicate

Tabella 6: risultati Precisione per RBD (titoli ponderati).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)			
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4
HP-HS 1/1	37267.466	40108.719	41273.389	38077.022	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	37031.552	38095.473	44459.063	39093.455	68734.433	61191.381	51200.000	51068.093
HP-HS 1/4	26347.141	34864.619	32374.827	40421.727	32952.794	32897.987	28103.790	25004.523
HP-HS 1/8	34285.623	32060.631	22897.531	26114.955	32516.826	25653.878	25356.913	35661.673
HP-HS 1/16	28330.383	24916.332	24825.846	24643.849	28190.489	23964.894	21869.171	22578.173
HP-HS 1/32	37166.724	34711.445	43101.721	39664.167	24526.734	23342.356	25903.289	24625.485
HP-HS 1/64	22342.968	23180.147	22744.847	22130.841	21952.801	30108.740	24282.482	23412.786
HP-HS 1/128	24613.883	18289.947	15235.845	12800.000	24618.602	24705.205	30065.545	31738.645

RV: Reportable Value

Tabella 7: risultati Precisione per S1 (Valori riferibili dei titoli ponderati ELISA).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)			
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	76859.117	73574.164	73584.328	56808.199	100556.409	95780.172	100530.126	78526.906
HP-HS 1/4	50061.840	70660.513	71122.005	73071.563	101877.504	93068.888	87754.602	81275.798
HP-HS 1/8	76349.239	62005.249	82327.289	57039.332	78054.289	85358.726	94255.791	99315.860
HP-HS 1/16	51738.376	81269.584	69142.060	62981.139	89713.772	84398.816	81429.703	75714.272
HP-HS 1/32	60913.966	66225.265	72989.515	73253.265	81207.428	86399.314	91792.328	97707.021
HP-HS 1/64	81023.206	70007.046	66922.812	63502.003	98951.091	89394.112	82261.581	79561.352
HP-HS 1/128	68324.115	68924.088	70487.345	75780.000	77336.111	81294.382	88990.942	91666.204

RV: Reportable Value

Tabella 8: risultati Precisione per RBD (Valori riferibili dei titoli ponderati ELISA).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1)				Operator 1 Day 1 (Plate 2)			
	OP1_D1_P1_Rep 1	OP1_D1_P1_Rep 2	OP1_D1_P1_Rep 3	OP1_D1_P1_Rep 4	OP1_D1_P2_Rep 1	OP1_D1_P2_Rep 2	OP1_D1_P2_Rep 3	OP1_D1_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	37612.756	40280.080	41503.926	38339.048	36925.346	39938.086	41044.131	37816.787
HP-HS 1/2	19057.778	19147.755	22377.829	19674.607	17989.189	18948.240	22082.217	19419.680
HP-HS 1/4	6788.861	8690.196	8238.914	10509.091	6390.725	8742.191	7951.059	9717.277
HP-HS 1/8	4349.446	4056.566	2863.248	3537.165	4222.894	3959.184	2861.135	3012.613
HP-HS 1/16	1773.077	1564.576	1559.644	1547.674	1768.224	1550.000	1543.628	1532.842
HP-HS 1/32	1170.423	1101.013	1372.903	1209.825	1152.566	1068.693	1321.446	1269.914
HP-HS 1/64	348.136	359.910	351.980	346.611	350.084	364.484	358.829	344.979
HP-HS 1/128	198.925	144.017	122.693	100.000	185.888	141.772	115.476	100.000

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1)				Operator 2 Day 2 (Plate 2)			
	OP2_D2_P1_Rep 1	OP2_D2_P1_Rep 2	OP2_D2_P1_Rep 3	OP2_D2_P1_Rep 4	OP2_D2_P2_Rep 1	OP2_D2_P2_Rep 2	OP2_D2_P2_Rep 3	OP2_D2_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	37034.243	30220.939	51200.000	25524.484	31892.256	30975.089	51200.000	25543.612
HP-HS 1/4	8222.222	8192.629	7003.509	6238.779	8254.206	8256.489	7048.458	6263.507
HP-HS 1/8	4054.183	3216.040	3171.662	4446.918	4075.050	3197.456	3167.568	4468.526
HP-HS 1/16	1753.936	1467.707	1367.341	1426.087	1769.912	1528.522	1366.306	1396.341
HP-HS 1/32	767.732	731.861	815.130	779.085	765.191	727.044	803.865	760.125
HP-HS 1/64	343.578	472.727	379.683	367.310	342.448	468.182	379.144	364.345
HP-HS 1/128	192.197	193.195	234.703	248.224	192.469	192.824	235.071	247.692

OP: Operator D: Day
P: Plate Rep: Replicate

Tabella 9: risultati Precisione per S1 (titoli non ponderati).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1)				Operator 1 Day 1 (Plate 2)			
	OP1_D1_P1_Rep 1	OP1_D1_P1_Rep 2	OP1_D1_P1_Rep 3	OP1_D1_P1_Rep 4	OP1_D1_P2_Rep 1	OP1_D1_P2_Rep 2	OP1_D1_P2_Rep 3	OP1_D1_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	38697.674	37152.347	37075.291	28800.000	38163.300	36425.408	36511.199	28013.641
HP-HS 1/4	12559.469	17824.744	17924.745	18373.543	12471.605	17506.942	17637.418	18162.846
HP-HS 1/8	9638.616	7847.992	10363.666	7194.161	9449.629	7654.527	10218.667	7066.246
HP-HS 1/16	3271.269	5124.638	4409.469	3980.346	3196.460	5034.461	4235.048	3892.784
HP-HS 1/32	1922.767	2070.163	2300.849	2315.207	1884.548	2068.917	2261.168	2263.415
HP-HS 1/64	1275.311	1105.026	1055.124	1001.795	1256.732	1082.807	1036.299	982.734
HP-HS 1/128	538.220	543.786	556.024	597.563	529.381	533.205	545.392	586.551

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1)				Operator 2 Day 2 (Plate 2)			
	OP2_D2_P1_Rep 1	OP2_D2_P1_Rep 2	OP2_D2_P1_Rep 3	OP2_D2_P1_Rep 4	OP2_D2_P2_Rep 1	OP2_D2_P2_Rep 2	OP2_D2_P2_Rep 3	OP2_D2_P2_Rep 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	50279.369	47880.299	50347.247	39553.648	50277.040	47899.875	50183.014	38975.387
HP-HS 1/4	25493.878	23268.817	22059.784	20366.035	25444.898	23265.627	21818.182	20271.973
HP-HS 1/8	9768.131	10685.929	11796.919	12422.564	9745.455	10653.776	11767.048	12406.406
HP-HS 1/16	5652.009	5267.126	5107.934	4736.529	5562.569	5282.737	5070.846	4727.759
HP-HS 1/32	2545.760	2707.057	2872.451	3056.836	2529.730	2692.919	2864.575	3049.857
HP-HS 1/64	1550.678	1397.859	1291.446	1249.332	1541.558	1395.708	1279.257	1236.991
HP-HS 1/128	605.705	636.320	700.000	717.621	602.675	633.907	690.516	714.667

OP: Operator D: Day
P: Plate Rep: Replicate

Tabella 10: risultati Precisione per RBD (titoli non ponderati).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)			
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4
HP-HS 1/1	37267.466	40108.719	41273.389	38077.022	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	18515.776	19047.736	22229.532	19546.728	34367.216	30595.690	51200.000	25534.046
HP-HS 1/4	6586.785	8716.155	8093.707	10105.432	8238.198	8224.497	7025.948	6251.131
HP-HS 1/8	4285.703	4007.579	2862.191	3264.369	4064.603	3206.735	3169.614	4457.709
HP-HS 1/16	1770.649	1557.271	1551.615	1540.241	1761.906	1497.806	1366.823	1411.136
HP-HS 1/32	1161.460	1084.733	1346.929	1239.505	766.460	729.449	809.478	769.546
HP-HS 1/64	349.109	362.190	355.388	345.794	343.013	470.449	379.414	365.825
HP-HS 1/128	192.296	142.890	119.030	100.000	192.333	193.009	234.887	247.958

RV: Reportable Value

Tabella 11: risultati Precisione per S1 (Valori riferibili dei titoli non ponderati ELISA).

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)			
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4
HP-HS 1/1	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000	51200.000
HP-HS 1/2	38429.558	36787.082	36792.164	28404.099	50278.204	47890.086	50265.063	39263.453
HP-HS 1/4	12515.460	17665.128	17780.501	18267.891	25469.376	23267.222	21938.650	20318.950
HP-HS 1/8	9543.655	7750.656	10290.911	7129.916	9756.786	10669.841	11781.974	12414.482
HP-HS 1/16	3233.649	5079.349	4321.379	3936.321	5607.111	5274.926	5089.356	4732.142
HP-HS 1/32	1903.561	2069.540	2280.922	2289.165	2537.732	2699.979	2868.510	3053.344
HP-HS 1/64	1265.988	1093.860	1045.669	992.219	1546.111	1396.783	1285.337	1243.146
HP-HS 1/128	533.782	538.469	550.682	592.031	604.188	635.112	695.242	716.142

Tabella 12: risultati Precisione per RBD (Valori riferibili dei titoli non ponderati ELISA).

PRECISIONE-RIPETIBILITA'

Precisione-Ripetibilità: Intra-assay

La %GSD, tra i 4 valori di ogni operatore nell'esperimento di precisione, è stata calcolata e riportata per ogni diluizione e per ogni operatore.

Criteri di accettabilità:

La %GSD tra i 4 valori dell'HP-HS per ogni operatore deve essere $\leq 50,0\%$.

Risultati

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.526	10.599	10.628	10.547	0.047	4.8%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/2	10.520	10.548	10.702	10.574	0.081	8.4%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/4	10.179	10.459	10.385	10.607	0.178	19.5%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/8	10.442	10.375	10.039	10.170	0.186	20.4%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/16	10.252	10.123	10.120	10.112	0.067	6.9%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/32	10.523	10.455	10.671	10.588	0.092	9.7%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/64	10.014	10.051	10.032	10.005	0.020	2.1%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/128	10.111	9.814	9.631	9.457	0.279	32.2%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.843	10.843	10.843	10.843	0.000	0.0%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/2	11.138	11.022	10.843	10.841	0.145	15.6%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/4	10.403	10.401	10.244	10.127	0.134	14.3%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/8	10.390	10.152	10.141	10.482	0.171	18.7%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/16	10.247	10.084	9.993	10.025	0.113	12.0%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/32	10.108	10.058	10.162	10.112	0.043	4.3%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/64	9.997	10.313	10.098	10.061	0.137	14.7%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS
HP-HS 1/128	10.111	10.115	10.311	10.365	0.132	14.1%	GSD $\leq 50.0\%$	PASS

In RV: natural logarithm of Reportable Value

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 13: risultati Precisione intra-assay Operatore 1 e 2 per S1.

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.843	10.843	10.843	10.843	0.000	0.0%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/2	11.250	11.206	11.206	10.947	0.138	14.8%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/4	10.821	11.166	11.172	11.199	0.180	19.7%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/8	11.243	11.035	11.318	10.951	0.172	18.8%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/16	10.854	11.306	11.144	11.051	0.189	20.7%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/32	11.017	11.101	11.198	11.202	0.088	9.2%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/64	11.302	11.156	11.111	11.059	0.105	11.0%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/128	11.132	11.141	11.163	11.236	0.047	4.8%	GSD ≤50.0%	PASS

Sample	Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.843	10.843	10.843	10.843	0.000	0.0%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/2	11.518	11.470	11.518	11.271	0.118	12.5%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/4	11.532	11.441	11.382	11.306	0.095	10.0%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/8	11.265	11.355	11.454	11.506	0.107	11.3%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/16	11.404	11.343	11.307	11.235	0.071	7.3%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/32	11.305	11.367	11.427	11.490	0.079	8.3%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/64	11.502	11.401	11.318	11.284	0.097	10.2%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/128	11.256	11.306	11.396	11.426	0.079	8.2%	GSD ≤50.0%	PASS

ln RV: natural logarithm of Reportable Value

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 14: risultati Precisione intra-assay Operatore 1 e 2 per RBD.

Tutti i risultati mostrati dalle tabelle rientrano nei parametri di accettabilità.

Precisione-Ripetibilità: Inter-assay

La %GSD, tra gli 8 valori dei due operatori (in 2 giorni) dell'esperimento di precisione, è stata calcolata e riportata per ogni diluizione.

Criteri di accettabilità:

La %GSD tra gli 8 valori riferibili dell'HP-HS per i due operatori deve essere ≤ 50,0%.

Risultati

Sample	Repeatability - inter-assay								SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)							
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.526	10.599	10.628	10.547	10.843	10.843	10.843	10.843	0.147	15.8%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/2	10.520	10.548	10.702	10.574	11.138	11.022	10.843	10.841	0.228	25.6%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/4	10.179	10.459	10.385	10.607	10.403	10.401	10.244	10.127	0.158	17.1%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/8	10.442	10.375	10.039	10.170	10.390	10.152	10.141	10.482	0.166	18.1%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/16	10.252	10.123	10.120	10.112	10.247	10.084	9.993	10.025	0.093	9.7%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/32	10.523	10.455	10.671	10.588	10.108	10.058	10.162	10.112	0.249	28.3%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/64	10.014	10.051	10.032	10.005	9.997	10.313	10.098	10.061	0.103	10.8%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/128	10.111	9.814	9.631	9.457	10.111	10.115	10.311	10.365	0.323	38.2%	GSD ≤50.0%	PASS

ln RV: natural logarithm of Reportable Value

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 15: risultati Precisione inter-assay per S1.

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4	ln RV1	ln RV2	ln RV3	ln RV4				
HP-HS 1/1	10.843	10.843	10.843	10.843	10.843	10.843	10.843	10.843	0.000	0.0%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/2	11.250	11.206	11.206	10.947	11.518	11.470	11.518	11.271	0.196	21.7%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/4	10.821	11.166	11.172	11.199	11.532	11.441	11.382	11.306	0.219	24.5%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/8	11.243	11.035	11.318	10.951	11.265	11.355	11.454	11.506	0.191	21.1%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/16	10.854	11.306	11.144	11.051	11.404	11.343	11.307	11.235	0.182	19.9%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/32	11.017	11.101	11.198	11.202	11.305	11.367	11.427	11.490	0.163	17.7%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/64	11.302	11.156	11.111	11.059	11.502	11.401	11.318	11.284	0.150	16.2%	GSD ≤50.0%	PASS
HP-HS 1/128	11.132	11.141	11.163	11.236	11.256	11.306	11.396	11.426	0.113	11.9%	GSD ≤50.0%	PASS

ln RV: natural logarithm of Reportable Value

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 16: risultati Precisione inter-assay per RBD.

Tutti i risultati mostrati dalle tabelle rientrano nei parametri di accettabilità.

PRECISIONE-LINEARITA'

La linearità è stata valutata eseguendo un'analisi di regressione lineare della diluizione sierica LOG₂ rispetto alla LOG₂ del GMT degli 8 valori riferibili utilizzando il metodo dei minimi quadrati.

Gli 8 valori sono stati calcolati come media geometrica di ogni determinazione in duplicato (16 determinazioni), considerando i titoli non ponderati. I titoli non ponderati sono i titoli ELISA calcolati utilizzando le diluizioni standard del campione (1:100, 1:200, 1:400, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:64000, 1:12800, 25600, 1:51200) senza la correzione del fattore di pre-diluizione.

Ad esempio, per l'HP-HS pre-diluito 1:8, considerando il fattore di pre-diluizione, le rispettive diluizioni sarebbero 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200, 1:102400, 1:204800 e 1:409600). L'uso di titoli non ponderati è giustificato dalla necessità di dimostrare una correlazione tra i titoli e i fattori di diluizione applicati.

Il coefficiente di determinazione, l'intercetta y e la pendenza della linea di regressione sono stati calcolati e riportati nel Grafico 13 e 14.

Criteri di accettabilità:

Il saggio è stato considerato lineare nell'intervallo di diluizione risultante in un coefficiente di determinazione $\geq 0,95$ e una pendenza che mostra un valore assoluto compreso tra 0,7 e 1,3.

Risultati

Linearity							
Sample	Fold Dilution	log ₂ FD	log ₂ GMT		Value	Acceptability criteria	Result
HP-HS 1/1	1	0	15.5	R ²	0.9944	R ² ≥ 0.95	PASS
HP-HS 1/2	2	-1	14.7	Slope	1.16	0.7 ≤ Slope ≤ 1.3	PASS
HP-HS 1/4	4	-2	12.9				
HP-HS 1/8	8	-3	11.8				
HP-HS 1/16	16	-4	10.6				
HP-HS 1/32	32	-5	9.9				
HP-HS 1/64	64	-6	8.5				
HP-HS 1/128	128	-7	7.4				

Tabella 17: risultati Precisione-Linearità per S1.

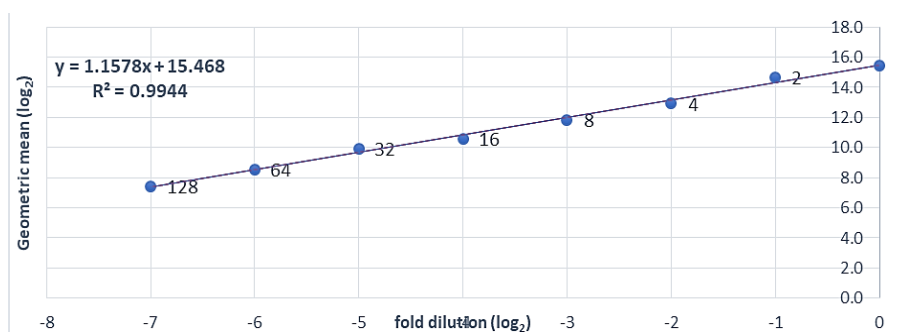


Grafico 13: grafico della Linearità per S1.

Linearity							
Sample	Fold Dilution	log ₂ FD	log ₂ GMT		Value	Acceptability criteria	Result
HP-HS 1/1	1	0	15.6	R ²	0.9940	R ² ≥ 0.95	PASS
HP-HS 1/2	2	-1	15.3	Slope	0.95	0.7 ≤ Slope ≤ 1.3	PASS
HP-HS 1/4	4	-2	14.2				
HP-HS 1/8	8	-3	13.3				
HP-HS 1/16	16	-4	12.2				
HP-HS 1/32	32	-5	11.2				
HP-HS 1/64	64	-6	10.3				
HP-HS 1/128	128	-7	9.2				

Tabella 18: risultati Precisione-Linearità per RBD.

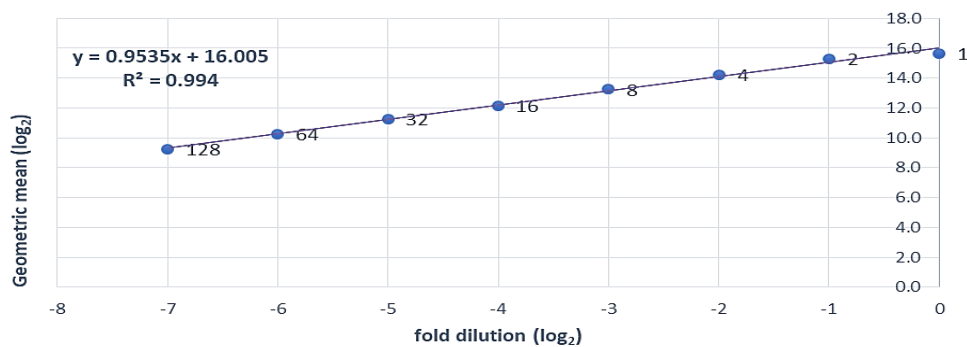


Grafico 14: grafico della Linearità per RBD.

Tutti i valori di linearità rientrano nei parametri di accettabilità sia per S1 che per RBD.

PRECISIONE-PRECISIONE INTERMEDIA

La %GSD tra il GMT dei 4 valori riferibili da ogni operatore dell'esperimento di precisione, è stata calcolata e riportata per ogni diluizione.

Criteri di accettabilità:

Precisione intermedia: la %GSD tra i valori GMT dei valori riportati di ogni operatore per ogni diluizione deve essere ≤ 50,0%.

Risultati

Sample	Intermediate precision										SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)				GMT_OP1	GMT_OP2				
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4						
HP-HS 1/1	37267	40109	41273	38077	51200	51200	51200	51200	39149.43	51200.00	0.18975	20.9%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/2	37032	38095	44459	39093	68734	61191	51200	51068	39571.04	57586.55	0.26530	30.4%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/4	26347	34865	32375	40422	32953	32898	28104	25005	33111.98	29543.45	0.08063	8.4%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/8	34286	32061	22898	26115	32517	25654	25357	35862	28473.48	29470.66	0.02434	2.5%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/16	28330	24916	24826	24644	28190	23965	21869	22578	25635.23	24032.55	0.04565	4.7%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/32	37167	34711	43102	39664	24527	23342	25903	24625	38537.18	24582.78	0.31790	37.4%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/64	22343	23180	22745	22131	21953	30109	24282	23413	22596.15	24758.95	0.06463	6.7%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/128	24614	18290	15236	12800	24619	24705	30066	31739	17213.42	27601.16	0.33387	39.6%	GSD ≤ 50.0%	PASS

RV: Reportable Value

GMT: Geometric Mean Titre

OP: Operator

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 19: risultati Precisione Intermedia per S1.

Sample	Operator 1 Day 1 (Plate 1-2)				Operator 2 Day 2 (Plate 1-2)				GMT_OP1	GMT_OP2	SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4	RV 1	RV 2	RV 3	RV 4						
HP-HS 1/1	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200.00	51200.00	0.00000	0.0%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/2	76859	73574	73584	56808	100556	95780	100530	78527	69727.53	93379.17	0.20653	22.9%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/4	50062	70661	71122	73072	101878	93069	87755	81276	65480.05	90683.55	0.23026	25.9%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/8	76349	62005	82327	57039	78054	85359	94256	99316	68665.38	88867.47	0.18236	20.0%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/16	51738	81270	69142	62981	89714	84399	81430	75714	65414.41	82658.79	0.16545	18.0%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/32	60914	66225	72990	73253	81207	86399	91792	97707	68148.61	89065.51	0.18928	20.8%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/64	81023	70007	66923	63502	98951	89394	82262	79561	70069.37	87228.25	0.15489	16.8%	GSD ≤ 50.0%	PASS
HP-HS 1/128	68324	68924	70487	75780	77336	81294	88991	91666	70819.47	84625.16	0.12593	13.4%	GSD ≤ 50.0%	PASS

RV: Reportable Value

GMT: Geometric Mean Titre

OP: Operator

SD: Standard Deviation

GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 20: risultati Precisione Intermedia per RBD.

Tutti i valori rientrano nei parametri di accettabilità sia per S1 che per RBD.

ACCURATEZZA

L'accuratezza del test è stata valutata utilizzando i valori ottenuti per la valutazione della Precisione. Secondo le linee guida ICH Q2, l'accuratezza può essere testata utilizzando un valore reale convenzionale. Il valore vero è stato calcolato dal risultato della linearità come GMT tra gli 8 valori dell'HP-HS: il GMT dei valori del campione non diluito è stato diviso per il rispettivo fattore di diluizione da esaminare e confrontato con il valore osservato durante il test (come GMT tra i valori riferibili ottenuti). L'accuratezza relativa è stata valutata calcolando la percentuale di recupero sul GMT dei valori riportati e il titolo (vero) atteso ottenuto utilizzando questa formula:

$$100 * (\text{GMT osservato} / \text{GMT atteso})$$

Criteri di accettabilità:

Il recupero calcolato per ogni diluizione del campione deve essere $\geq 50\%$ e $\leq 200\%$ rispetto al valore atteso (reale).

Risultati

Accuracy					
Sample	Observed GM	Expected GM	Recovery %	Acceptability	Result
HP-HS 1/1	44771	44771	100.00%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/2	26028	22386	116.27%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/4	7819	11193	69.86%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/8	3621	5596	64.70%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/16	1551	2798	55.44%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/32	962	1399	68.75%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/64	370	700	52.83%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/128	170	350	48.69%	[50% - 200.0%]	FAIL

Tabella 21: risultati Accuratezza per S1.

Accuracy					
Sample	Observed GM	Expected GM	Recovery %	Acceptability criteria	Result
HP-HS 1/1	51200	51200	100.00%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/2	40346	25600	157.60%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/4	19265	12800	150.50%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/8	9765	6400	152.57%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/16	4596	3200	143.62%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/32	2435	1600	152.16%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/64	1222	800	152.69%	[50% - 200.0%]	PASS
HP-HS 1/128	605	400	151.20%	[50% - 200.0%]	PASS

Tabella 22: risultati Accuratezza per RBD.

Tutti i risultati di accuratezza rientrano nei parametri di accettabilità, tranne per S1 la diluizione 1:128; il parametro risulta comunque superato e accettabile in quanto la variabilità ad alte diluizioni sieriche è notevolmente maggiore.

ROBUSTEZZA

Campioni

HP-HS: *High Positive antibody response* per Sars-Cov-2

NS-HS: *Negative human serum, Minus IgA/IgM/IgG*

La robustezza del test è stata valutata con la serie di esperimenti descritti di seguito. La %GSD è stata calcolata tra i valori ottenuti da due diverse condizioni (4 valori da ogni condizione testata). Il punto critico valutato è stato il tempo di incubazione con l'anticorpo secondario.

Le piastre sono state incubate per 30min (condizione standard) con l'anticorpo secondario per rilevare specificamente le IgG; per valutare l'influenza del tempo di incubazione, le piastre sono state incubate anche con due tempi diversi: 20 min e 40 min.

I campioni sopra indicati sono stati testati in 4 ripetizioni, in due piastre per ogni condizione per ottenere 4 valori.

Criteri di accettabilità:

L'NS-HS deve mostrare risultati negativi; la %GSD dei risultati per l'HP-HS deve essere $\leq 50,0\%$ tra i valori riportati per le condizioni di 20 min, 30 min e 40 min.

Lo schema della piastra in Figura 27 riassume il layout dell'esperimento.

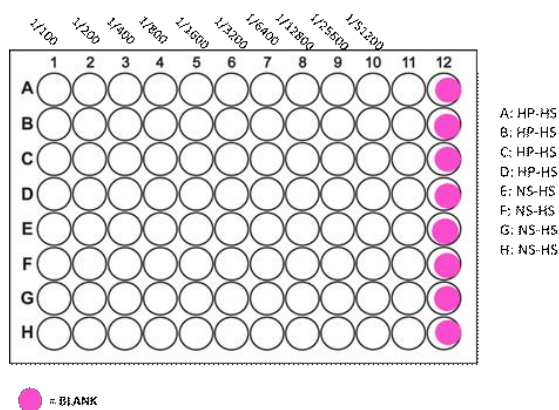


Fig. 26: Schema di piastra per la Robustezza.

Risultati

Sample	Standard 30 min								20 min								40 min							
	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2
HP-HS	38839	33879	41369	44926	39121	33429	41383	42667	37036	36038	33937	29059	36913	35916	33605	29146	38469	42015	34833	51200	38681	41866	34939	51200
NS-HS	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Sample	ELISA Titer											
	Standard 30 min				20 min				40 min			
	RV1	RV2	RV3	RV4	RV1	RV2	RV3	RV4	RV1	RV2	RV3	RV4
HP-HS	38980	33653	41376	43782	36974	35977	33770	29103	38575	41940	34886	51200
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

R: Replicate
P: Plate
RV: Reportable Value

Incubation time of detection antibody (30 min and 20 min)

Sample	Standard 30 min				20 min				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4				
HP-HS	10.6	10.4	10.6	10.7	10.5	10.5	10.4	10.3	0.1	13.83%	GSD ≤50.0%	PASS
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.0	0.00%	NS-HS = NEG	PASS

Incubation time of detection antibody (30 min and 40 min)

Sample	Standard 30 min				40 min				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4				
HP-HS	10.6	10.4	10.6	10.7	10.6	10.6	10.5	10.8	0.1	14.16%	GSD ≤50.0%	PASS
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.0	0.00%	NS-HS = NEG	PASS

In: natural logarithm
SD: Standard Deviation
GSD: Geometric Standard Deviation

Tabella 23: risultati Robustezza per S1.

Sample	Standard 30 min								20 min								40 min							
	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2	R1-P1	R2-P1	R3-P1	R4-P1	R1-P2	R2-P2	R3-P2	R4-P2
HP-HS	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200
NS-HS	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Sample	ELISA Titer											
	Standard 30 min				20 min				40 min			
	RV1	RV2	RV3	RV4	RV1	RV2	RV3	RV4	RV1	RV2	RV3	RV4
HP-HS	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200	51200
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

R: Replicate
P: Plate
RV: Reportable Value

Incubation time of detection antibody (30 min and 20 min)												
Sample	Standard 30 min				20 min				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4				
HP-HS	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	0.0	0.00%	GSD ≤50.0%	PASS
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.0	0.00%	NS-HS = NEG	PASS

Incubation time of detection antibody (30 min and 40 min)												
Sample	Standard 30 min				40 min				SD	GSD%	Acceptability criteria	Result
	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4	In RV1	In RV2	In RV3	In RV4				
HP-HS	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	0.0	0.00%	GSD ≤50.0%	PASS
NS-HS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.0	0.00%	NS-HS = NEG	PASS

Tabella 24: risultati Robustezza per RBD.

Tutti i valori rientrano nei parametri di accettabilità sia per S1 che per RBD.

Visti i risultati ottenuti in tutte le analisi dei parametri valutati, il processo di validazione del test ELISA, applicato per entrambe le proteine S1 e RBD, soddisfa tutti i criteri di accettabilità stabiliti. Il test è quindi risultato: Specifico, Ripetibile, Preciso, Lineare, Accurato e Robusto.

Correlazione tra ELISA commerciale, ELISA in house e Microneutralizzazione

La diffusione globale del recente SARS-CoV-2, richiede il rapido sviluppo di test sierologici ben standardizzati, che possono essere utilizzati insieme ai classici metodi diagnostici su base molecolare (RT-PCT).

Il test di Microneutralizzazione (MN) è considerato il *gold standard* per le analisi sierologiche, ma richiede l'utilizzo di virus vivo e quindi di strutture di contenimento adeguate.

I test ELISA possono rappresentare un'ottima alternativa al test MN in termini di sensibilità, sicurezza e rendimento.

Per questo motivo tutti i risultati ottenuti in ELISA sono stati comparati a quelli dell'MN.

Ogni campione di siero è stato testato mediante il nostro test ELISA S1 e RBD specifico per IgG, IgM e IgA (VM_IgG_S1, VM_IgG_RBD, VM_IgM_S1, VM_IgM_RBD, VM_IgA_RBD) e mediante il kit ELISA commerciale Euroimmun S1 insieme al test funzionale MN. Per quanto riguarda l'ELISA S1, abbiamo effettuato due diversi test: uno con un kit commerciale (Euroimmun) e l'altro con il test ELISA interno. Secondo il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman e la significatività statistica (Tabelle 25 e 26), abbiamo registrato il più alto accordo tra l'ELISA VM_IgG_RBD e il test MN e tra il VM_IgA_RBD sempre con il test MN, con coefficienti di 0,83 e 0,85, rispettivamente. Le correlazioni più basse sono state trovate per ELISA Euroimmun vs MN, e per VM_IgG_S1 vs MN, con coefficienti di 0,49 e 0,45, rispettivamente. Tutti i risultati sono comunque risultati significativi. Come si può vedere dal grafico di correlazione (Grafico 15), la risposta IgA è strettamente legata ad una

risposta in MN positiva. Inoltre, analizzando tutti i risultati per ogni campione di siero (dati non mostrati), abbiamo notato che, nei soggetti in cui abbiamo registrato un elevato titolo neutralizzante, abbiamo sempre osservato un segnale IgA positivo.

È interessante notare che, in 9 campioni MN positivi, abbiamo trovato una completa assenza di segnale S1 utilizzando sia il kit ELISA Euroimmun, che il nostro ELISA S1 IgG e IgM, ma, d'altra parte, segnali specifici IgG e IgM RBD elevati e rilevabili.

	MNT	EUROIMMUN	VM_IgG_S1	VM_IgG_RBD	VM_IgM_S1	VM_IgM_RBD	VM_IgA_RBD
MNT	1.00	0.49	0.45	0.83	0.52	0.73	0.85
EUROIMMUN	0.49	1.00	0.77	0.59	0.50	0.54	0.51
VM_IgG_S1	0.45	0.77	1.00	0.59	0.43	0.44	0.53
VM_IgG_RBD	0.83	0.59	0.59	1.00	0.49	0.73	0.84
VM_IgM_S1	0.52	0.50	0.43	0.49	1.00	0.50	0.45
VM_IgM_RBD	0.73	0.54	0.44	0.73	0.50	1.00	0.69
VM_IgA_RBD	0.85	0.51	0.53	0.84	0.45	0.69	1.00

Tabella 25: Coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman.

	MNT	EUROIMMUN	VM_IgG_S1	VM_IgG_RBD	VM_IgM_S1	VM_IgM_RBD	VM_IgA_RBD
MNT	0.0E+00	3.8E-07	3.3E-10	8.1E-47	3.5E-14	1.5E-31	7.0E-53
EUROIMMUN	3.8E-07	0.0E+00	2.8E-20	1.9E-10	1.8E-07	1.5E-08	1.3E-07
VM_IgG_S1	3.3E-10	2.8E-20	0.0E+00	3.4E-18	2.1E-09	5.8E-10	2.1E-14
VM_IgG_RBD	8.1E-47	1.9E-10	3.4E-18	0.0E+00	1.5E-12	3.1E-31	2.5E-50
VM_IgM_S1	3.5E-14	1.8E-07	2.1E-09	1.5E-12	0.0E+00	5.5E-13	3.1E-10
VM_IgM_RBD	1.5E-31	1.5E-08	5.8E-10	3.1E-31	5.5E-13	0.0E+00	2.9E-27
VM_IgA_RBD	7.0E-53	1.3E-07	2.1E-14	2.5E-50	3.1E-10	2.9E-27	0.0E+00

Tabella 26: Significatività statistica del Coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman.

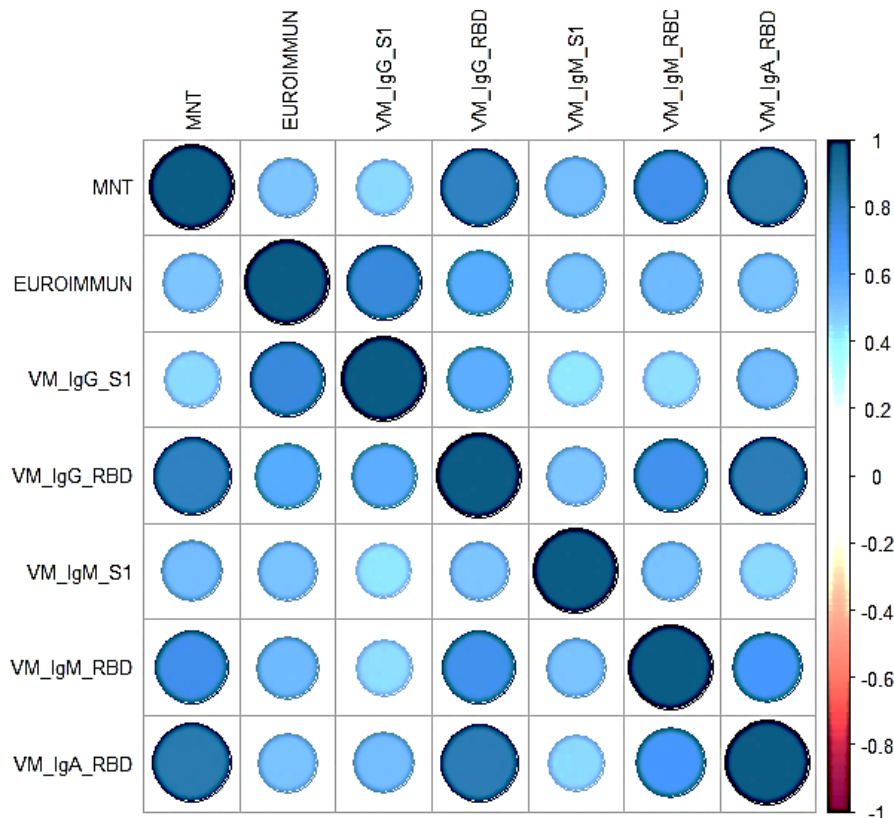


Grafico 15: Grafico di correlazione associato ai coefficienti misurati della correlazione per ranghi di Spearman. La grandezza dei coefficienti è rappresentata da cerchi e da una sfumatura di colore: più grande è l'area del cerchio e più intensa è la tonalità del colore, maggiore è la correlazione. La direzione della correlazione è indicata dalla scala dei colori: toni blu per le correlazioni positive e toni rossi per le correlazioni negative.

Sottotipizzazione delle IgG nei campioni di siero

Pochi dati documentano le differenze nelle immunoglobuline sistemiche G (IgG) e le loro sottoclassi, IgM e IgA, in termini di risposte contro il SARS-CoV-2, in particolare i dati che confrontano queste risposte con la risposta neutralizzante. È noto che i livelli di IgG sono fondamentali per la protezione dalle malattie virali (Murin C.D., et al., 2019). Negli esseri umani, le quattro sottoclassi di IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) differiscono per la loro funzione (Schroeder H.W., et al., 2020). È importante sottolineare che le IgG1 e IgG3 svolgono un ruolo chiave in molte funzioni immunologiche fondamentali, tra cui la neutralizzazione del virus, l'opsonizzazione e la fissazione del complemento (Frasca D., et al., 2013).

Per questo motivo, abbiamo valutato la risposta ELISA delle sottoclassi IgG in un piccolo sottogruppo (14) di campioni MN-positivi. Le piastre ELISA sono state rivestite con l'antigene purificato RBD. I nostri risultati, sebbene derivati da un piccolo gruppo di soggetti, sono in

linea con i precedenti risultati di Amanat e colleghi (Amanat F., et al., 2020). E' stata riscontrata una forte reattività per IgG1 e IgG3 in quasi tutti i campioni, con la sottoclasse IgG3 che mostra la più alta percentuale di rilevamento. Al contrario è stata trovata una bassa reattività sia per IgG4 che per IgG2 (Figura 28).

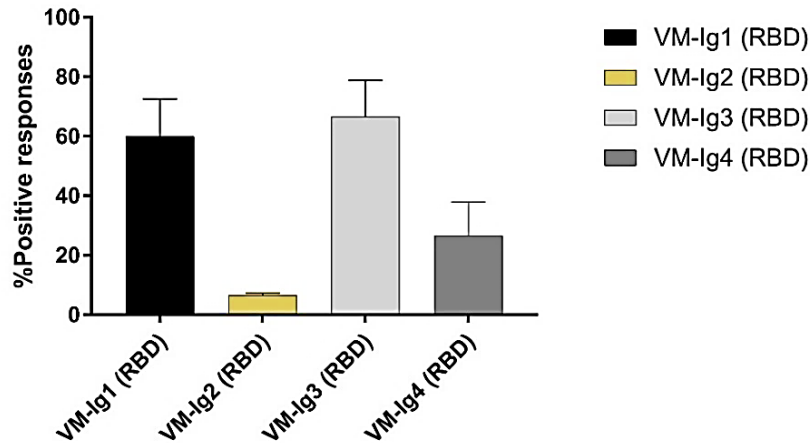


Fig. 27: Percentuale di rilevamento di IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 in tutti i 14 campioni umani positivi al test di Micro-neutralizzazione.

Contributo delle IgA sulla potenza neutralizzante dei campioni di siero analizzati

A causa dell'elevata correlazione osservata tra i risultati dell'ELISA IgA e i risultati MN, abbiamo cercato di valutare il reale contributo degli anticorpi IgA sulla potenza neutralizzante dei campioni di siero. Come si può osservare nella figura 29, dopo il trattamento del campione, abbiamo registrato una significativa diminuzione dei titoli neutralizzanti. Interessante è il fatto che la diminuzione si registra solo in quei sieri che hanno mostrato alti titoli neutralizzanti iniziali. I campioni con titoli MN medio/bassi non hanno mostrato alcuna diminuzione.

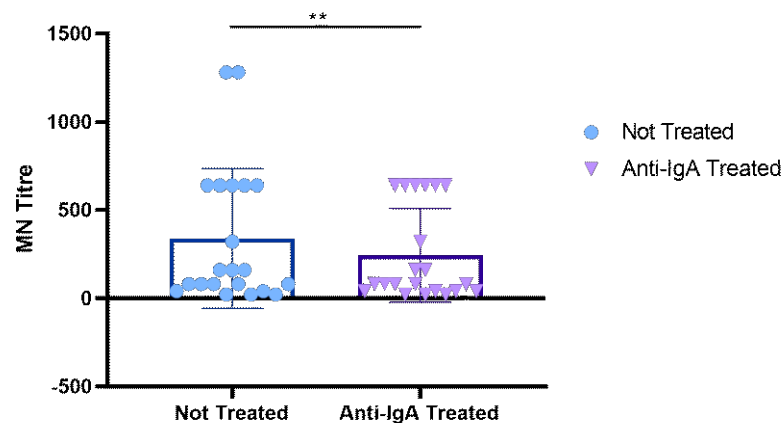


Fig.28: *Titoli MN prima e dopo il trattamento con gli anticorpi anti IgA umane; i risultati mostrano una significativa diminuzione dei titoli MN per quei campioni con alti titoli neutralizzanti.*

DISCUSSIONE

Come la maggior parte delle malattie infettive emergenti che colpiscono l'uomo, anche questo nuovo HCoV ha avuto origine dagli animali (WHO, 2020) (Andersen K. G., et al., 2020). A causa del rapido aumento di alcune pratiche umane, come la deforestazione, l'urbanizzazione e l'allevamento di specie animali selvatiche, nel corso degli anni la comparsa di nuovi agenti patogeni è diventata un problema estremamente grave. La rapida diffusione globale del nuovo SARS-CoV-2 rappresenta una grave minaccia per la salute del mondo intero. Vi è ora l'urgente necessità di saggi sierologici ben standardizzati in grado di rilevare diverse classi di anticorpi contro il nuovo coronavirus, e che possano essere utilizzati insieme ai classici metodi diagnostici molecolari (RT-PCT). Infatti, a causa dell'enorme richiesta degli ultimi mesi, la disponibilità dei reagenti e delle attrezzature necessarie per effettuare tempestivamente le analisi è ancora inadeguata. Inoltre, se la raccolta e la conservazione dei campioni sono effettuate in modo improprio, i test molecolari possono dare risultati falsi negativi nei soggetti portatori del virus (Liu W., et al., 2020). Studi precedenti sul SARS-CoV-1, hanno dimostrato che i livelli di IgG (e IgM) specifici del virus possono essere un valido surrogato per la diagnosi sierologica (Guan M., et al., 2004) (Hsueh P. R., et al., 2004).

Infatti, il presente studio, ha tra i suoi obiettivi principali: standardizzare, validare e rendere il più possibile affidabili gli ELISA in grado di rilevare diverse classi di immunoglobuline e ampliare i dati sulle informazioni dei confronti tra i risultati di diversi test sierologici, che potrebbero essere preziose per le future valutazioni delle diagnosi sierologiche e delle valutazioni sui futuri vaccini (Madore D.V., et al., 2010). In particolare, in questo studio, i risultati dell'ELISA sono stati confrontati con quelli del test funzionale MN, che è comunemente assunto come riferimento e come *gold standard*. Fin dal suo primo isolamento e caratterizzazione, questo nuovo ceppo di HCoV è stato classificato, secondo le linee guida dell'OMS, come patogeno di livello 3 (BSL3) di biosicurezza. Ciò ha posto alcuni limiti all'implementazione dei test di neutralizzazione, in quanto relativamente pochi laboratori dispongono di strutture di biocontenimento di livello 3. Gli ELISA sono un buon surrogato per il saggio MN in termini di sensibilità, sicurezza e produttività (Dessy F.J. et al., 2008) (Gonda M. G., et al., 2012). Tuttavia, è molto importante valutare il miglior antigene da utilizzare in

queste piattaforme per ottenere una risposta affidabile e simile a quella del test di neutralizzazione, che indica la risposta funzionale. Per questo motivo abbiamo confrontato tutti i nostri risultati con quelli del test di microneutralizzazione. Come nel caso dell'emoagglutinina influenzale (Clements M. L., et al., 1986), abbiamo notato, dai risultati del nostro studio, che gli anticorpi specifici del dominio RBD della proteina S sono la chiave della neutralizzazione virale. In questo lavoro, insieme alle analisi IgG, IgM e IgA, abbiamo anche valutato le risposte delle sottoclassi IgG in quei soggetti che hanno mostrato sia un segnale ELISA RBD elevato sia una comprovata attività di neutralizzazione. I nostri risultati sono in linea con i risultati precedenti (Amanat F., et al., 2020) e confermano le IgG1 e IgG3 come i sottotipi con la reattività più forte in tutti i campioni, mentre solo in un piccolo numero di soggetti abbiamo trovato risposte IgG2 e IgG4. Le IgG1 e IgG3 sono coinvolte in funzioni immunologiche critiche, come la neutralizzazione, l'opsonizzazione, la fissazione del complemento e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC). D'altra parte, le IgG2 svolgono un ruolo importante nella protezione contro le infezioni da microrganismi incapsulati (Ferrante A., et al., 1990) e le IgG4 sono generalmente una componente minore della risposta immunoglobulinica totale e sono indotte in risposta alla stimolazione antigenica continua (Alberse R. C., et al., 1983).

Per quanto riguarda l'ELISA, i principali risultati possono essere riassunti come segue: a) il test è risultato, dopo la validazione, specifico, preciso, accurato e robusto, in quanto tutti i parametri risultano superati; b) tutte le analisi statistiche proposte hanno indicato una stretta relazione tra i risultati di MN e gli ELISA interni basati su RBD, vale a dire VM-IgG-RBD, VM-IgM-RBD e VM-IgA-RBD; c) vista la specificità del test, nelle operazioni di screening su larga scala, è molto importante avere un test altamente specifico, in quanto questo protegge dal rischio di errata classificazione dei campioni negativi con un ampio margine di certezza. Un test altamente specifico è particolarmente utile per confermare una diagnosi già effettuata con altri metodi dove un risultato falso positivo avrebbe un grande impatto. Infatti, un test altamente specifico è di grande aiuto in clinica quando fornisce e conferma un risultato positivo.

Una panoramica di tutti i risultati ottenuti con ELISA e MN (dati non mostrati), insieme a quelli ottenuti trattando il campione con IgA anti-umane, rivela che la massima attività di neutralizzazione contro il SARS-CoV-2, si ottiene quando vengono rilevate tutte e tre le immunoglobuline insieme, IgG, IgM e IgA, come ad indicare la presenza di un effetto sinergico o additivo tra diverse classi di anticorpi. Questa osservazione può essere spiegata dal fatto che la popolazione umana è completamente *naïve* per il SARS-CoV-2 e che le IgG o le IgM da sole non sono in grado di provocare una risposta immunitaria neutralizzante ideale. Infatti, una delle

caratteristiche più importanti dell'immunità adattiva è la generazione di memoria immunologica e la capacità del sistema immunitario di imparare dalle sue esperienze di incontro con lo stesso agente patogeno, diventando così più efficace nel tempo (Bonilla F. A., et al., 2010).

È interessante notare che, in nove campioni analizzati, né l'ELISA interno né quello commerciale, hanno rilevato alcun segnale IgG e IgM per la proteina S1, mentre è stato rilevato un forte segnale IgG, IgM e IgA per RBD. Tutti i nove campioni hanno mostrato esattamente la stessa tendenza e questi risultati potrebbero essere dovuti al ripiegamento della struttura tridimensionale della proteina S1 dopo la sua produzione in cellule HEK293, che potrebbe mascherare alcuni epitopi riconosciuti dagli anticorpi espressi in questi nove soggetti. Al contrario, questi epitopi potrebbero essere ben esposti nella proteina RBD ed essere riconosciuti e legati dagli anticorpi, questo spiegherebbe, quindi, le differenze nei due segnali.

Per concludere, i nostri risultati confermano ciò che è già stato riportato (Robbiani D. F., et al., 2020), cioè che la risposta immunitaria al SARS-CoV-2 è molto variabile, ma che gli anticorpi che mirano al dominio dell'RBD hanno la più alta probabilità di essere neutralizzanti, e in alcuni casi fortemente neutralizzanti.

CONCLUSIONI

Il presente studio costituisce una ricerca preliminare per lo sviluppo di un test ELISA in grado di semi quantificare gli anticorpi umani anti-SARS-CoV-2 in modo specifico e ripetibile.

Dai risultati ottenuti, possiamo concludere che, il test ELISA basato sull' RBD, può essere utilizzato come valido sostituto al test di neutralizzazione in laboratori che non dispongono di strutture di biosicurezza 3 e può fungere da supporto agli attuali test su base molecolare per la ricerca di anticorpi specifici contro il SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFIA

Abdelwhab E. M. & Hafez H.M., 2011. An overview of the epidemic of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Egypt: epidemiology and control challenges. *Epidemiology and Infection*. 139(5), 647-57.

Alberini I., Del Tordello E., Fasolo A., Temperton N.J., Galli G., Gentile C., Montomoli E., Hilbert A.K., Banzhoff A., Del Giudice G., Donnelly J.J., Rappuoli R., Capecchi B., 2009. Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses. *Vaccine*. 43, 5998-6003.

Alberse R. C., Dieges P. H., Knul-Bretlova V., Vooren P., Aalbers M., van Leeuwen J., 1983. IgG4 as a blocking antibody. *Clin. Rev. Allergy*. 1, 289–302.

Amanat F., et al., 2020. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med*. 1–4.

Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F., 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med*. 26, 4.

Ashour HM., Elkhatib WF., Rahman MM., Elshabrawy HA., 2020. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens*. 9.

Ayona-Talavera G., Shelton H., Scull M.A. et al., 2009. Mutations in H5N1 influenza virus hemagglutinin that confer binding to human tracheal airway epithelium. *Plos One*. 4(11), 1-11.

Baez-Santos YM., St John SE., Mesecar AD., 2015. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Research*. 115, 21–38.

Bao L., Wei D., Hong G., Chong X., et al., 2020. Lack of Reinfection in Rhesus Macaques Infected with SARS-CoV-2. *Microbiology*. preprint.

Barik S., 2012. New treatments for influenza. *BMC Medicine*. 13, 10-104.

Beare AS., Webster RG., 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Archives of Virology*. 119, 37–42.

Belshe R., 2005. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. *N Engl J Med*. 353, 2209-2211.

- Belshe R., Ambrose C.S., Yi T., 2008. Safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in children 2-7 years of age. *Vaccine*.
- Berenice C., Jae-Mun C., Bornholdt Z.A., Sankaran B., Rice AP., Prasada BVV., 2014. The Influenza A Virus Protein NS1 Displays Structural Polymorphism. *Journal of Virology*. 88(8), 4113–4122.
- Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Kuhl A., Pohlmann S., 2010. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus haemagglutinin. *Reviews in medical virology*. 20(5), 298-310.
- Bonilla F. A., Oettgen H. C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40.
- Borradale D., 2013. Hopeful results in latest HIV vaccine trial, but many hurdles to overcome yet.
- Bosch BJ., de Haan CA., Smits SL., Rottier PJ., 2005. Spike protein assembly into the coronavirus: exploring the limits of its sequence requirements. *Virology*. 334, 306–318.
- Bouvier NM., Palese P., 2008. The biology of Influenza viruses. *Vaccine*. 26, 49-53.
- Brankston G., Gitterman L., Hirji Z., Lemieux C., Gardam M., 2007. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis*. 7, 257-65.
- Brown I.H., Alexander J.D., Chakraverty P., Harris P.A., Manvell R.J., 1994. Isolation of an Influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Veterinary Microbiology*. 39(1-2), 125-34.
- Chan JF., To KK., Tse H., Jin DY., Yuen KY., 2013. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. 21, 544–555.
- Chan Y.C., Tan H.C., Tan S.H., Balachandran K., 1985. The use of the single radial haemolysis technique in the serological diagnosis of dengue and Japanese encephalitis virus infections. *Bull World Health Organ*.
- Chang C-k., Sue SC., Yu Th., Hsieh CM., Tsai CK., 2006. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of Biomedical Science*. 13, 59–72.
- Chang D., Xu H., Rebaza A., Sharma L., Dela Cruz CS., 2020. Protecting health-care workers from subclinical coronavirus infection. *Lancet Respir Med*.

- Chen F., Liu ZS., Zhang FR., 2020. First case of severe childhood novel coronavirus pneumonia in China. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 58, E005.
- Chen H., Guo J., Wang C., 2020. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet.*
- Chen N., Zhou M., Dong X., 2020. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 395, 507–13.
- Cheng ZJ., Shan J., 2020. 2019 novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection.* 1–9.
- Clements M. L., Betts R. F., Tierney E. L., Murphy B. R., 1986. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *J. Clin. Microbiol.* 24, 157–160.
- Coronavirus Outbreak. Available at: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
- Couceiro JNSS., Paulson JC., Baum LG., 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research.* 29, 155–165.
- Couzens L., Gao J., Westgeest K., Sandbulte M., Lugovtsev V., Fouchier R., Eichelberger M., 2009. An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera. *J. Virol. Methods.* 210, 7-14.
- Cros JF., Palese P., 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Research.* 95(1–2), 3–12.
- Crosby A.W., 1989. America's forgotten pandemic. The influenza of 1918. Edited by: Cambridge University.
- Cui J., Li F., Shi ZL., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology.* 17, 181–192.
- Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Shay D.K., Po-Yung Cheng, Don Bandaranayake, Breiman R.F., 2012. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study.

De Jong JC., Rimmelzwaan GF., Fouchier RA., Osterhaus AD., 2000. Influenza virus: A master of metamorphosis. *Journal of Infectious Disease*. 40, 218–228.

Dessy F.J. et al., 2008. Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and Pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine. *Hum. Vaccin*. 4, 425–434.

E. Andreano et al., 2020. Identification of neutralizing human monoclonal antibodies from Italian Covid-19 convalescent patients. *Immunology*. preprint.

Ehrlich HJ., Muller M., Oh HM., Tambyah PA., Joukhadar C., Montomoli E., 2008. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *The New England Journal of Medicine*. 358(24), 2573–84.

EMA, 2013. Pandemic Influenza Vaccine H5N1 Baxter AG whole virion influenza virus, propagated in vero cells (continuous cell line of mammalian origin), inactivated, containing antigen of pandemic strain.

Farrohi K., Farrohi FK., Noble GR., Kaye HS., Kendal AP., 1977. Evaluation of the single radial hemolysis test for measuring hemagglutinin- and neuraminidase-specific antibodies to H3N2 influenza strains and antibodies to influenza B. *Journal of Clinical Microbiology*. 5(3),353–360.

FDA, 2015. Guide for analytical procedures and method validation.

FDA, 2018. Bioanalytical Method Validation Guidance. Food Drug Adm.

Fehr AR., Perlman S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 1282, 1–23.

Ferrante A., Beard L. J., Feldman R. G., 1990. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 9, S16-24.

Fiore AE., Shay DK., Broder K., Iskander JK., Uyeki TM., Mootrey G., Bresee JS., Cox NS., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Recommendations and report: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and report/Center for Disease Control*, 57,1-6.

- Forni D., Cagliani R., Clerici M., Sironi M., 2017. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*. 25, 35–48.
- Fouchier RA., Munster VJ., Keawcharoen J., Osterhaus ADME., Kuiken T., 2007. Virology of avian influenza in relation to wild birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 43(3), S7-14.
- Fouchier RA., Munster VJ., Wallensten A., Bestebroer TM., Herfst S., Smith DJ., Rimmelzwaan GF., Olsen B., Osterhaus DME., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. 79, 2814-22.
- Frasca D., Diaz A., Romero M., Mendez N.V., Landin A.M., Blomberg B.B., 2013. Effects of age on H1N1-specific serum IgG1 and IgG3 levels evaluated during the 2011-2012 influenza vaccine season. *Immun. Ageing A*. 10, 14.
- Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Pazynina G.V. et al., 2008. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Virology Journal*. 5, 85.
- Gamblin SJ., Skehel JJ., 2010. Influenza Haemagglutinin and Neuroaminidase Membrane Glycoproteins. *The journal of biological Chemistry*. 285(37), 28403-28409.
- Gao Y., Zhang Y., Shinya K. et al., 2009. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLOS Pathogens*. 5(12), 1-11.
- Geeraedts F., Saluja V., ter Veer W Amorij JP., Frijlink HW., Wilschut J., Hinrichs WL., Huckriede A., 2010. Preservation of the immunogenicity of dry-powder influenza H5N1 whole inactivated virus vaccine at elevated storage temperatures. *The AAPS Journal*. 12(2), 215-222.
- Geiger DA., King PG., Geiger MR., 2006. Influenza vaccine: Review of effectiveness of the U.S. immunization program, and policy considerations. *Journal of American Physicians and Surgeons*. 11, 69-74.
- Ghendon Y., 1991. Influenza surveillance. *Bulletin of the World Health Organization*. 61, 509-515.
- Girard M.P., Tam J.S., Assossou O.M., Kieny M.P., 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review.

- Gonda M. G., Fang X., Perry G. A., Maltecca C., 2012. Measuring bovine viral diarrhoea virus vaccine response: Using a commercially available ELISA as a surrogate for serum neutralization assays. *Vaccine*. 30, 6559–6563.
- Goodeve, A.C., Jennings R. & Potter, C.W., 1983. The use of the single radial haemolysis test for assessing antibody response and protective antibody levels in an influenza B vaccine study. *J Biol Stand*. 11, 289-96.
- Guan M., Chen H.Y., Foo S.Y., Tan Y.J., Goh P.Y., Wee S. H., 2004. Recombinant Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Tests for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus in SARS Patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 11, 287–291.
- Guideline, I. C. H. H. T. 2015 Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- Hannoun C., Megas F. & Piercy J., 2004. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res*. 103, 133-138.
- Hasoksuz M., Alekseev K., Vlasova A., Zhang X., Spiro D., 2007. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *Journal of Virology*. 81, 4981–4990.
- Hilleman M.R., 2002. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 20, 3068-87.
- Hilleman MR., 2002. Overview of the needs and realities for developing new and improved vaccines in the 21st century. *Intervirology*. 45(4-6), 199-211.
- Hinshaw V.S., Webster R.G., Easterday B.C., Bean W.J. Jr, 1981. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun*. 34, 354–361.
- Hinshaw VS., Webster RG., Naeve CW., Murphy BR., 1983. Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses. *Virology*. 128, 260–263.
- Hirst G.K., 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. 94(2427), 22-3.

- Hobson D., Curry R.L., Beare A. S. & Ward- Gardner A., 1972. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)*. 70,767-777.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 10.
- Holsinger L.J., Lamb R.A., 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*. 183(1), 32–43.
- Hsueh P. R., et al., 2004. SARS Antibody Test for Serosurveillance. *Emerg. Infect. Dis*. 10, 1558–1562.
- Huang P., Liu T., Huang L., et al. 2020. Use of chest CT in combination with negative RT-PCR assay for the 2019 novel coronavirus but high clinical suspicion. *Radiology*.
- Huang Q., Sivaramakrishna R.P., Ludwig K., Korte T., Bottcher C., Herrmann A., 2003. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim Biophys Acta*. 1614(1), 3–13.
- Hurst K.R., Koetzner C.A., Masters P.S., 2009. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*. 83,7221–7234.
- Hussain S., Pan J., Chen Y., Yang Y., Xu J., 2005. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*. 79, 5288–5295.
- Hwan J., Gao K., Xu H., Chen L.K., Couzens K.H., Rivers J.D., Easterbrook K., Yang L., Zhong M., Rajabi J., Ye I., Sultana X.F., Wan X., Liu D.R., Perez J.K., Taubenberger M.C., Eichelberger. 2013. Molecular Basis for Broad Neuraminidase Immunity: Conserved Epitopes in Seasonal and Pandemic H1N1 as Well as H5N1 Influenza Viruses. *J Virol*. 87(16), 9290–9300.
- Ito T., Nelson S.S., Couceiro Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y., 1998. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *Virology*. 72, 7367–7373.
- Jennings R., Potter C.W., Massey P.M., Duerden B.I., Martin J., Bevan A.M., 1981. Responses of volunteers to inactivated influenza virus vaccines. *Journal of Hygiene*. 86(1), 1-16.

- Jin Y.H., Cai L., Cheng Z.S., et al., 2020. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus [2019-nCoV] infected pneumonia. *Mil Med.* 7, 4.
- Jordan E., 1927. *Epidemic Influenza: a survey*. Chicago: American Medical Associations.
- Kampf G., Todt D., Pfaender S., Steinmann E., 2020. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* S0195–6701(20)30046–3.
- Kamps BS., Hoffmann C., Preiser W., 2006. *Influenza report 2006*. Flying Publisher. 1, 27-28.
- Kilbourne E.D., 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases.* 12(1), 9-14.
- Kimble B., Nieto G.R., Perez D.R., 2010. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. *Virology Journal.* 7, 365.
- Klimov A., Simonsen L., Fukuda K., Cox N., 1999. Surveillance and impact of influenza in the United States. *Vaccine.* 17(1), S42-6.
- Kreijtz JH., Fouchier RA., Rimmelzwaan GF., 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 162(1-2), 19-30.
- Kuszewski K., Brydak L., 2000. The epidemiology and history of influenza. *Biomed & Pharmacother.* 54, 188-95.
- Lamb RA., Krug RM., 2001. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. *Fields Virology fourth edition*, Knipe DM, Howley PM eds, Lippincott, Philadelphia. 1487-1531.
- Last J.M., 2001. *International Epidemiological Association: A dictionary of epidemiology*.
- Lee YT., Kim KH., Ko EJ., Lee YN., Kim MC., Kwon YM., Tang Y., Cho MK., Lee YJ., Kang SM., 2014. New vaccines against influenza virus. *Clinical and experimental vaccine research.* 3(1), 12-28.
- Lei F. & Shi W., 2011. Prospective of Genomics in revealing transmission, reassortment and evolution of Wildlife-Borne Avian Influenza A (H5N1) viruses. *Current Genomics.* 12(7), 466-74.
- Li J., Li J., Xie X., et al., 2020. Game consumption and the 2019 novel coronavirus. *Lancet Infect Dis.*

- Li K.S., Guan Y., et al., 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 Influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 430(6996), 209-13.
- Li X., Palese P., 1994. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of Virology*. 68(2), 1245–9.
- Lin C., Guo Y., Zhao M., Sun M., Luo F., Guo L., Qiu B., Lin Z., Chen G., 2017. Highly sensitive colorimetric immunosensor for influenza virus H5N1 based on enzyme-encapsulated liposome. *Anal Chim Acta*. 963, 112-118.
- Liu W., et al., 2020. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* 58, 6-26.
- Loeffelholz M.J., 2011. Avian Influenza (H5N1) Update: Role of the clinical Microbiology Laboratory. *Labmedicine*. 42(5), 291-98.
- Lofgren E., Fefferman N.H., Naumov Y.N., Gorski J., Naumova N., 2007. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. *Journal of Virology*. 81(11), 5429-36.
- Lu BL., Webster RG., Hinshaw VS., 1982. Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions. *Infection and Immunity*. 38(2),530–535.
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., 2020. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 395, 565–574.
- Lu X., Pan J., Tao J., Guo D., 2011. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes*. 42, 37–45.
- Madore D.V., Meade B.D., Rubin F., Deal C., Lynn F., 2010. Utilization of Serologic Assays to Support Efficacy of Vaccines in Nonclinical and Clinical Trials: Meeting at the Crossroads. *Vaccine*. 28, 4539–4547.
- Mänz B., Matrosovich M., Bovin N., Schwemmle M., 2010. A polymorphism in the hemagglutinin of the human isolate of a highly pathogenic H5N1 influenza virus determines organ tropism in mice. *Journal of virology*. 84(16), 8316-21.

- Masters PS., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*. 66, 193–292.
- Medina R.A. & Garcia-Sastre A., 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews. Microbiology*. 9(8), 590-603.
- Menachery VD., Yount Jr BL., Debbink K., Agnihothram S., Gralinski LE., Plante JA., 2015. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature medicine*. 21, 1508–1508.
- Mirosławska-Kempinska B. & Kosek - Wozniak A., 2013. The influenza epidemic of 1889-90 in selected European cities-- a picture based on the reports of two Poznan daily newspapers from the second half of the nineteenth century. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 19, 1131-41.
- Molesti E., Ferrara F., Lapini G., Montomoli E., and Temperton N., 2014. Discordant Correlation between Serological Assays Observed When Measuring Heterosubtypic Responses against Avian Influenza H5 and H7 Viruses in Unexposed Individuals. *Biomed Res Int*. 2014, 231365.
- Monto AS., Ohmit SE., Petrie JG., Johnson E., Truscon R., Teich E., Rotthoff J., Boulton M., Victor JC., 2009. Comparative Efficacy of Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *The new england journal of medicine*. 361(13), 1260-1270.
- Morse JS., Lalonde T., Xu S., Liu WR., 2020. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology*. 21, 730–738.
- Moules V., Ferraris O., Terrier O., Giudice E., Yver M., Rolland J. P., 2010. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA-viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology*. 404, 215–224.
- Murin C.D., Wilson I.A., Ward A.B., 2019. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat. Microbiol*. 4, 734–747.
- Neuman BW., Kiss G., Kunding AH., Bhella D., Baksh MF., 2011. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*. 174, 11–22.
- Nichol KL. and Treanor JJ., 2006. Vaccines for seasonal and pandemic Influenza. *The Journal of Infectious Disease*. 194, 111-116.

- Nicholls J.M., Chan M.C.W., Chan W.Y. et al., 2007. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nature Medicine*. 13, 147-49.
- Nicholson G., Colegate E.A., Podda A., Stephenson I., Wood J., Ypma E., Zambon M.C., 2001. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza.
- Nieto-Torres JL., DeDiego ML., Verdiá-Báguena C., Jimenez-Guardeño JM., Regla-Nava JA., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathogens*. 10.
- O'Hagan DT., Ott GS., De Gregorio E., Seubert A., 2012. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 30(29), 4341-4348.
- Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*. 11, 1620–1620.
- Oxford JS., Schild GC., Potter CW., Jennings R., 1979. The specificity of the anti-haemagglutinin antibody response induced in man by inactivated influenza vaccines and by natural infection. *Journal of Hygiene*. 82(1), 51–61.
- Palese P., Shaw ML., 2007. Orthomixoviridae: the viruses and their replication. Knipe DM., Howley PM., editors. *Fields Virology*. Williams & Wilkins; Philadelphia, Lippincott. 1647-1690.
- Park Thwaites RS., Openshaw PJM., 2020. Lessons from SARS and MERS. *European Journal of Immunology*. 19, 308–316.
- Park WB., Kwon NJ., Choi SJ., Kang CK., Choe PG., 2020. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *Journal of Korean Medical Science*. 35.
- Pavlova S., D'Alessio F., Houard S., Remarque EJ., Stockhofe N., Engelhardt O.G., 2017. Workshop report: immunoassay standardisation for “universal” influenza vaccines. *Influenza Other Respir Viruses*. 11,194–201.
- Pinto LH., Holsinger LJ., Lamb RA., 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 69(3), 517–528.

Pinto LH., Lamb RA., 2006. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem.* 281(14), 8997–9000.

Pneumonia of unknown cause & #8211 China 2020.

Potter C.W., 2001. A history of influenza. *Journal of applied Microbiology.* 9(14), 572-9.

Profeta ML., Palladino G., 1986. Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. Brief report. *Archives of Virology.* 90(3-4), 355–360.

Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V., Taubenberger J.K., 1999. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96(4), 1651-6.

Richman D., Whitley R., Hayden F., 2009. Coronaviruses. *Clinical Virology.* 1155–1171.

Robbiani D. F., et al., 2020. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.*

Robertson JS., Schubert M., Lazzarini RA., 1981. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *Journal of Virology.* 38(1), 157–63.

Rogers GN., Pritchett TJ., Lane JL., Paulson JC., 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology.* 131, 394–408.

Rothe C., Schunk M., Sothmann P., 2020. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med.*

Ruben FL., 1987. Prevention and control of Influenza. Role of vaccine. *The American journal of medicine.* 82(6a), 31-34.

Russell CD., Millar JE., Baillie JK., 2020. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet.* 395, 473–5.

Salomon R., Webster RG., 2009. The Influenza Virus Enigma. *Cell.* 136(3), 402-10.

Samji T., 2009. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 82, 153-159.

- Sandbulte MR., Jimenez GS., Boon AC., Smith LR., Treanor JJ., Webby RJ., 2007. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med.* 4, e59.
- Santiago F.W., Emo K.L., Fitzgerald T., Treanor J.J., Topham D.J., 2012. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hemagglutinin proteins from H1N1 A/Brisbane/59/07 and B/Florida/04/06 when produced in various protein expression systems. *Vaccine.* 30(31), 4606-16.
- Schild G.C., Pereira M.S., Chakraverty P., 1975. Single-radial-hemolysis: A new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza. *Bull World Health Organ.* 52, 43–50.
- Schmitt AP., Lamb RA., 2005. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Advances of Virus research.* 64, 383–416.
- Schoeman D., Fielding BC., 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal.* 16, 69–69.
- Scholtisrek C., Hinshaw VS., Olsen CW., 1998. Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: Nicholson K. G., Webster R. G., Hay A. J., eds. *The textbook of influenza.* Oxford: Blackwell. 137-44.
- Scholtissek C., Burger H., Kistner O., Shortridge KF., 1985. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology.* 147, 287–294.
- Schroeder H.W. and Cavacini L., 2020. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-52.
- Schulman J.L. & Kilbourne E.D., 1969. Independent variation in nature of hemagglutinin and neuraminidase antigens of influenza virus: distinctiveness of hemagglutinin antigen of Hong Kong-68 virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 63(2), 326-33.
- Seubert A., Monaci E., Pizza M., O'Hagan DT., Wack A., 2008. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of Immunology.* 180, 5402-5412.

- Shope R.E., 1958. Influenza: history epidemiology, and speculation. *Public health reports*. 73(2), 165-78.
- Shu Yu Liao, Fritzsche KJ., Mei Hong, 2013. Conformational analysis of the full length M2 protein of the influenza A virus using solid-state NMR. *Protein science*. 22(11), 1623-38.
- Simas PVM., Barnabé ACS., Durães-Carvalho R., 2015. Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 21, 729–731.
- Simonsen L., Viboud C., Taylor R.J., Miller M.A., 2011. The epidemiology of influenza and its control. In *Influenza Vaccines for the Future*, 2nd, 27-54. Edited by Rappuoli R. & Del Giudice G. Springer.
- Skehel JJ., Wiley DC., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 69, 531–569.
- Song HD., Tu Tu CC., Zhang GW., Wang SY., Zheng K., 2005. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102, 2430–2435.
- Steinhauer DA., 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 258(1), 1-20.
- Stephenson I., 2006. H5N1 vaccines: how prepared are we for a pandemic? *Lancet*. 965-66.
- Stöhr K., 2002. Influenza -WHO cares. *The Lancet infectious diseases*. 2(9), 517.
- Suarez D. L. & Schultz- Cherry S., 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology*. 24(2-3), 269-83.
- Subbarao K., Murphy BR., Fauci AS., 2006. Development of Effective Vaccines against Pandemic Influenza. *Immunity*. 24, 5-9.
- Sui J., Hwang WC., Perez S., Wei G., Aird D., Chen LM., et al., 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol*. 16(3), 265–73.
- Suksatu A., Sangsawad W., Thitithanyanont A. et al., 2009. Characteristics of stork feces-derived H5N1 viruses that are preferentially transmitted to primary human airway epithelial cells. *Microbiology and Immunology*. 53(12), 675-84.

- Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., 2020. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 10.
- Taubenberger J.K. & Morens D.M., 2006. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*. 12(1), 15-22.
- Taubenberger J.K., Reid A.H., Janczeswki T.A., Fanning T.G., 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 356(1416), 1829-39.
- Taubenberger JK., Kash JC., 2010. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe*. 7 (6), 440-451.
- Temperton N.J., Hoschler K., Major D., Nicolson C., Manvell R., Hien V.M., Ha D.Q., De Jong M., Zambon M., Takeuchi Y., Weiss R.A., 2007. A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies. *Influenza Other Respi Viruses*. 3,105-12.
- Thomas PG., 2006. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis*. 12(1), 48-54.
- Treanor J., 2004. Influenza Vaccine — Outmaneuvering Antigenic Shift and Drift. *The New England Journal of Medicine*. 350, 218-220.
- Trombetta CM., Perini D., Mather S., Temperton N., Montomoli E., 2014. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines*. 2(4), 707-734.
- Ujike M., Taguchi F., 2015. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*. 7, 1700–1725.
- Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F., Kitphati R. et al., 2005. Probable person to person transmission of avian influenza A (H5N1). *The New England Journal of Medicine*. 352(4), 333-40.
- Van der Velden M., Aichinger G., Pollabauer E.M., Low-Baselli A., 2012. Cell culture (Vero cell) derived whole-virus non- adjuvanted H5N1 influenza vaccine induces long-lasting cross-reactive memory immune response: Homologous or heterologous booster response following two dose or single dose priming. *Vaccine*. 30, 6127-35.

Van Riel D., Munster VJ., de Wit E., Rimmelzwaan GF., Fouchier RA., Osterhaus AD., Kuiken T., 2006. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science*. 312(5772)-399.

Wang T.T., Palese P., 2009. *Untraveling the mystery of swine influenza virus*. Elsevier.

Watanabe Y., Ibrahim M.S., Suzuki Y., Ikuta K., 2012. The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends in Microbiology*. 20(1), 11-20.

Webby R.J. & Webster R.G., 2003. Are we ready for pandemic influenza? *Science*. 302, 1519-22.

Webster R.G. & Laver W.G., 1972. The origin of pandemic influenza. *Bulletin of the World Health Organization*. 47, 449-52.

Webster R.G., 2004. Wet-markets-a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet*. 363, 234-236

Webster R.G., Bean WJ., Gorman OT., Chambers TM., Kawaoka Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology Reviews*. 56, 152-79.

Westgeest KB., Bestebroer TM., Spronken MI., Gao J., Couzens L., Osterhaus AD., Eichelberger M., Fouchier RA., de Graaf M., 2015. Optimization of an enzyme-linked lectin assay suitable for rapid antigenic characterization of the neuraminidase of human influenza A(H3N2) viruses. *J Virol Methods*. 217, 55-63.

WHO World Health Organization, 2020. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*.

WHO World Health Organization, February 2020. *Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus [nCoV] infection is suspected*.

WHO World Health Organization, February 2014. *Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season*.

WHO World Health Organization, 2007. *WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1)*. WHO/CDS/EPR/GIP/2006.4r1.

WHO World Health Organization, February 2013. *Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season*.

WHO World Health Organization, May 2013. *Serological detection of avian influenza A(H7N9) infections by microneutralization assay*.

WHO World Health Organization, 2020 Situation reports. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>.

WHO World Health Organization, October 2020. Health Emergency Dashboard.

Wilschut JC., McElhaney JE., Palache AM., 2006. Rapid reference to influenza. Elsevier. 2, 27-45.

Woo PC., Huang Y., Lau SK., Yuen KY., 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2, 1804–1820.

Wood J.M., Melzack D., Newman R.W., Major D.L., Zambon M., Nicholson K.G., Podda A., 2001. A single radial haemolysis assay for antibody to H5 haemagglutinin.

Wood JM., Lewandowski RA., 2003. The Influenza vaccine licensing process. *Vaccine*. 21, 1786-1788.

Wrapp D., Wang N., Corbett KS., Goldsmith JA., Hsieh CL., 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 367, 1260–1263.

Wright PF., Neumann G., Kawaoka Y., 2007. Orthomixoviruses. Knipe DM., Howley PM., editors. *Fields Virology*. Williams & Wilkins, Philadelphia, Lippincott. 1691-1740.

Wu F., Zhao S., Yu B., Chen YM., Wang W., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 579, 265–269.

Wuhan Municipal Health Commission on the current situation of pneumonia in our city Release organization 2020.

Xia S., Zhu Y., Liu M., Lan Q., Xu W., 2020. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cellular & Molecular Immunology*. 10.

Xu XW., Wu XX., Jiang XG., 2020. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ*. 368, m606.

Yin J., Liu S., Zhu Y., 2013. An overview of the highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Virologica Sinica*. 28(1), 003-15.

Yuki K., Fujiogi M., Koutsogiannaki S., 2020. COVID-19 Pathophysiology: A Review. *Clin.Immunol*. 1, 215.

- Zeng LK., Tao XW., Yuan WH., Wang J., Liu X., Liu ZS., 2020. First case of neonate infected with novel coronavirus pneumonia in China. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 58, E009.
- Zhang L., Liu Y., 2020. Potential interventions for novel coronavirus in China: a systemic review. *J Med Virol.*
- Zhang X., Spiro D., Halpin R., Wang S., 2007. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology.* 363, 1–10.
- Zhao JP., Hu Y., Du RH., et al., 2020. Expert consensus on the use of corticosteroid in patients with 2019-nCoV pneumonia. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 43, E007.
- Zhou P., Fan H., Lan T., Yang XL., Shi WF., 2018. Fatal swine acute diarrhea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature.* 556, 255–258.
- Zhou P., Yang XL., Wang XG., Hu B., Zhang L., 2020. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv.* 914952.
- Ziebuhr J., Snijder EJ., Gorbalenya AE., 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of General Virology.* 81, 853–879.
- Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., et al., 2020. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N. Engl. J. Med.* 382, 1177–1179.