



Istituto Superiore di Sanità

Rapporto ISS COVID-19 • n. 48/2020

Strategie immunologiche *ad interim* per la terapia e prevenzione della COVID-19

Gruppo di Lavoro ISS Immunologia COVID-19

Versione del 4 giugno 2020

Strategie immunologiche *ad interim* per la terapia e prevenzione della COVID-19

Versione del 4 giugno 2020

Gruppo di Lavoro ISS Immunologia COVID-19

Carlo PINI (*Coordinatore*) *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Luigi BERTINATO *Segreteria Scientifica Presidenza, ISS*

Autori del presente documento:

Alessandra MALLANO *Centro Nazionale Salute Globale, ISS*
Alessandro ASCIONE *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Carla RAGGI *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Donatella NEGRI *Dipartimento Malattie Infettive, ISS*
Francesca LUCIANI *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Mariasosaria MARINARO *Dipartimento Malattie Infettive, ISS*
Marilena Paola ETNA *Dipartimento Malattie Infettive, ISS*
Michela FLEGO *Centro Nazionale Salute Globale, ISS*
Monica BOIRIVANT *Centro Nazionale per la Ricerca preclinica e clinica dei Farmaci, ISS*
Nunzia SANARICO *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Raffaella TINGHINO *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Roberto DELOGU *Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS*
Roberto NISINI *Dipartimento Malattie Infettive, ISS*
Silvia VENDETTI *Dipartimento Malattie Infettive, ISS*

Istituto Superiore di Sanità

Strategie immunologiche ad interim per la terapia e prevenzione della COVID-19. Versione del 4 giugno 2020.

Gruppo di Lavoro ISS Immunologia COVID-19
2020, 24 p. Rapporto ISS COVID-19 n. 48/2020

Nel corso di dicembre 2019 nella città di Wuhan nella Provincia di Hubei, le autorità sanitarie cinesi hanno identificato un cluster di casi di polmonite ad eziologia sconosciuta. Le indagini intraprese hanno portato all'identificazione di un nuovo coronavirus SARS-CoV-2, della stessa famiglia di quelli responsabili della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) e della sindrome respiratoria mediorientale (MERS-CoV). Il nuovo virus causa la malattia denominata COVID-19 (*Coronavirus disease*). La risposta immunitaria al virus si è rivelata di fondamentale importanza nel determinare il decorso e la prognosi della malattia. In questo rapporto sono sintetizzate le attuali conoscenze sulla risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2 e le loro implicazioni nella prevenzione dell'infezione e nella terapia di COVID-19.

Istituto Superiore di Sanità

Interim immunological strategies for COVID-19 therapy and prevention. Version of June 4, 2020.

ISS Working Group of Immunology COVID-19
2020, 24 p. Rapporto ISS COVID-19 n. 48/2020 (in Italian)

During December 2019 in the city of Wuhan in the Hubei Province, Chinese health authorities identified a cluster of cases of pneumonia with unknown aetiology. Investigations have led to the identification of a new coronavirus (SARS-CoV-2), belonging to the same family as those responsible for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV) and Middle Eastern Respiratory Syndrome (MERS-CoV). The new virus causes a disease called COVID-19 (Coronavirus disease). The immune- response to the virus proved to be of paramount importance in determining the course and prognosis of the disease. Current knowledge about the immune response to SARS-CoV-2 infection, their possible implications in infection prevention and COVID-19 therapy, are summarized in this report.

Si ringrazia per la cura editoriale Francesca Girolamo (Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS).

Per informazioni su questo documento scrivere a: carlo.pini@iss.it

Citare questo documento come segue:

Gruppo di Lavoro Immunologia COVID-19. *Strategie immunologiche ad interim per la terapia e prevenzione della COVID-19. Versione del 4 giugno 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 48/2020).

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Redazione e grafica a cura del Servizio Comunicazione Scientifica (Sandra Salinetti e Paola De Castro)

© Istituto Superiore di Sanità 2020
viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma



Indice

| | |
|---|----|
| 1. Risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2..... | 1 |
| 1.1. Infezione virale | 1 |
| 1.1.1. Il virus..... | 1 |
| 1.1.2. Diffusione dell'infezione | 1 |
| 1.1.3. Caratteristiche cliniche dell'infezione | 2 |
| 1.2. Risposta immunitaria all'infezione | 2 |
| 1.2.1. Immunità innata..... | 2 |
| 1.2.2. Immunità adattativa e <i>clearance</i> virale..... | 4 |
| 1.2.3. Iperattivazione immunitaria (<i>cytokine storm</i> , tempesta di citochine) | 5 |
| 2. Stimolazione del sistema immunitario per prevenire l'infezione..... | 7 |
| 2.1. Sviluppo di vaccini..... | 7 |
| 2.2. Considerazioni generali riguardo allo sviluppo dei vaccini: tempistica, tossicità ed efficacia | 9 |
| 3. Approcci Immunologici al trattamento dell'infezione | 10 |
| 3.1. Immunomodulazione | 10 |
| 3.1.1. anti-IL-1..... | 10 |
| 3.1.2. anti-IL-6..... | 11 |
| 3.1.3. Altri approcci immunoterapici | 13 |
| Inibitori di janus kinase (JAK) 1-2..... | 13 |
| 3.2. Sieri e anticorpi neutralizzanti..... | 13 |
| 3.2.1. Sieri immuni e immunoglobuline iperimmuni..... | 13 |
| 3.2.2. Anticorpi monoclonali neutralizzanti..... | 15 |
| Anticorpi monoclonali prodotti contro SARS-CoV e cross-reagenti con SARS-CoV-2..... | 16 |
| Anticorpi monoclonali specifici per SARS-CoV-2..... | 16 |
| Conclusioni | 18 |
| Bibliografia | 19 |

1. Risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2

1.1. Infezione virale

A dicembre 2019, nella città di Wuhan capoluogo della Provincia di Hubei, le autorità sanitarie cinesi hanno identificato un cluster di casi di polmonite ad eziologia sconosciuta (1). Le indagini intraprese hanno portato all'identificazione di un nuovo coronavirus SARS-CoV-2, della stessa famiglia di quelli responsabili della Sindrome Respiratoria Acuta Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS-CoV) e della Sindrome Respiratoria Mediorientale (*Middle Eastern Respiratory Syndrome*, MERS-CoV). Il nuovo virus che causa la malattia denominata COVID-19 (*Coronavirus disease*) si è rapidamente diffuso in tutto il mondo e l'11 marzo 2020 il Comitato di Emergenza dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato lo stato di pandemia.

1.1.1. Il virus

I coronavirus, descritti per la prima volta nel 1966 da Tyrell e Bynoe (2), sono una famiglia di virus a RNA a singolo filamento che infettano l'uomo, ma anche una vasta gamma di animali. Esistono quattro sottofamiglie di coronavirus: alfa e beta (apparentemente provenienti dai mammiferi, in particolare dai pipistrelli), gamma e delta (provenienti da suini e uccelli). Tra i sottotipi di coronavirus che possono infettare l'uomo, i beta-coronavirus, a cui appartiene il SARS-CoV-2, possono causare gravi malattie e decessi, mentre gli alfa-coronavirus causano infezioni lievemente sintomatiche o asintomatiche (3, 4). Sebbene il SARS-CoV-2 abbia avuto origine dai pipistrelli (5), l'animale intermedio attraverso il quale è passato agli umani è incerto. Pangolini e serpenti sono gli attuali sospettati.

I principali quattro geni di SARS-CoV-2 codificano per le proteine strutturali: la proteina del nucleocapside (N), la proteina *spike* (S), la proteina dell'*envelope* (E) e la proteina di membrana (M) (6). La regione della proteina S che interagisce con il recettore sulla cellula ospite è detta *Receptor Binding Domain*, (RBD) ed è localizzata a livello del dominio S1b; attraverso il suo legame con il recettore cellulare dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 umana (ACE2), abbondantemente espressa nelle cellule epiteliali polmonari e nell'intestino tenue, consente al virus l'attacco, la fusione e l'ingresso nelle cellule dell'ospite. L'RNA virale viene quindi rilasciato nel citoplasma, replicato e tradotto per la formazione di nuove particelle virali.

1.1.2. Diffusione dell'infezione

L'infezione da SARS-CoV-2 interessa principalmente il tratto respiratorio inferiore. La trasmissione attraverso la via aerea da uomo a uomo è senza dubbio la principale fonte di contagio, che si verifica principalmente attraverso goccioline di muco di dimensioni relativamente grandi prodotte quando un soggetto portatore del virus starnutisce o tossisce.

Si continua a discutere sulla possibilità di trasmissione per aerosol, che si associa alla conversazione e al canto; di fatto questa modalità sembra possibile e applicabile soprattutto alle procedure mediche che si associano alla produzione di grandi quantità di aerosol quali l'intubazione. Le superfici contaminate costituiscono un'altra modalità di contagio. In questo caso, il virus contenuto nelle goccioline, depositatosi sulle superfici e rimasto attivo si trasmette ad un altro individuo attraverso le mani contaminate che vengono a contatto con la mucosa orale, nasale o congiuntivale. Le particelle di virus, che sono presenti nelle secrezioni del sistema respiratorio di una persona infetta, infettano gli altri attraverso il contatto diretto con le mucose (7) con un periodo di incubazione medio compreso tra 2 e 12 giorni (8). Nei pazienti COVID-19

è stata riscontrata anche la presenza di virus attivo nelle feci. Questi risultati dimostrano che, oltre al contatto ravvicinato e al contatto con le secrezioni respiratorie dei pazienti, il virus può anche essere trasmesso attraverso la potenziale via oro-fecale (9). Ciò significa che i campioni di feci possono contaminare mani, cibo, acqua, ecc. e possono causare infezioni invadendo la cavità orale, la mucosa respiratoria, la congiuntiva, ecc. Secondo le informazioni attuali, non si registrano casi di trasmissione transplacentare da donne in gravidanza al loro feto, mentre sono stati descritti casi di malattia neonatale dovuta a trasmissione postnatale (10). Per trasmettersi da un individuo all'altro questo virus ha molti mezzi a sua disposizione che possono parzialmente spiegare la forza e velocità di contagio.

1.1.3. Caratteristiche cliniche dell'infezione

Le caratteristiche cliniche della infezione da SARS-CoV-2 sono varie e vanno da uno stato asintomatico alla sindrome da distress respiratorio acuto e disfunzione multiorgano. Le caratteristiche cliniche comuni includono febbre, tosse, mal di gola, mal di testa, affaticamento, dolori muscolari e difficoltà a respirare (dispnea), può essere presente anche congiuntivite. Questa infezione, pertanto, è indistinguibile sulla base dei sintomi, da numerose altre infezioni respiratorie come quelle da virus influenzali e parainfluenzali, l'infezione da virus sinciziale respiratorio (*Respiratory Syncytial Virus*, RSV) e quelle da adenovirus. Il decorso della malattia è variabile da individuo a individuo. Come per molte altre infezioni virali, i pazienti possono essere asintomatici, presentare sintomi lievi, moderati o gravi, in presenza o meno di polmonite di gravità variabile. Nella malattia con decorso benigno si assiste alla progressiva scomparsa dei sintomi in 7-10 giorni cui fa seguito un periodo di convalescenza. Verosimilmente in rapporto alla carica virale in un sottogruppo di pazienti, al termine della prima settimana, la malattia progredisce in un quadro clinico più grave con presenza di polmonite grave, sindrome da difficoltà respiratoria acuta con necessità di ventilazione meccanica non invasiva o invasiva e ricovero in terapia intensiva. In una parte di questi casi particolarmente gravi si sviluppa una sindrome iper-infiammatoria associata ad eccessivo aumento di citochine infiammatorie, tra cui IL-6, IL-1, IFN- γ e TNF α , disturbi della coagulazione con microtrombosi polmonare e deficit multiorgano con caratteristiche simili alla sindrome da attivazione macrofagica (11, 12). L'infezione grave da SARS-CoV-2 si manifesta di solito nel contesto di alcune comorbidità come: obesità, diabete mellito, ipertensione, età avanzata (13) ed è gravata da una alta mortalità.

1.2. Risposta immunitaria all'infezione

Le possibilità che il sistema immunitario intervenga a difesa dell'organismo contro il virus sono molteplici e coinvolgono sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa, entrambe con le loro componenti umorali e cellulari.

1.2.1. Immunità innata

SARS-CoV-2 è un coronavirus umano nuovo, quindi antigenicamente differente da altri virus e specificamente da altri coronavirus umani. Questo implica che nessun essere umano sia mai stato infettato con questo virus precedentemente alla sua diffusione nel novembre-dicembre 2019. Inoltre, il fatto che SARS-CoV-2 sia antigenicamente differente da altri virus, significa che nessun essere umano poteva disporre, prima dell'eventuale infezione, di anticorpi o cellule del sistema immunitario reattive contro questo virus, a parte possibili cross-reattività con altri virus simili. In teoria, a novembre-dicembre 2019 l'intera umanità poteva essere considerata suscettibile all'infezione con SARS-CoV-2.

Tuttavia, il fatto di non avere anticorpi specifici per un dato agente patogeno non significa che un individuo sia del tutto privo di qualsiasi difesa. Il sistema immunitario, infatti, è in grado di proteggerci non solo grazie agli anticorpi o alle cellule che riconoscono selettivamente singoli agenti infettivi, ma anche

grazie all'intervento di una serie di fattori e cellule che, identificando come potenzialmente dannosi certi microrganismi, tentano di limitare la loro virulenza in maniera non selettiva. L'insieme di questi fattori e cellule viene denominato "sistema immunitario innato", ad indicare che è presente e funzionante anche prima che si abbiano quelle esperienze infettive che inducono la produzione di anticorpi e cellule specifiche per determinati microrganismi. Anticorpi e cellule specifiche fanno parte del "sistema immunitario adattativo" e, dopo una malattia infettiva, rimangono per molto tempo come memoria immunologica dell'infezione in grado di impedire che un successivo contatto con lo stesso agente infettivo provochi nuovamente la stessa malattia.

Il sistema immunitario innato è certamente in grado di limitare l'aggressività di SARS-CoV-2. La maggior parte dei soggetti che si è infettata con questo virus, infatti, manifesta una malattia lieve, a volte inapparente o identificata da febbre e altri sintomi simil-influenzali limitati alle vie aeree superiori. In questi casi, prescindendo da possibili cross-reattività non ancora dimostrate, si deve presumere che la persona infettata sia stata protetta dal sistema immunitario innato attraverso i vari meccanismi che lo caratterizzano.

Il sistema immunitario innato ha diversi meccanismi di protezione dagli agenti infettivi che sono strategicamente disposti nei siti anatomici dove c'è il maggior rischio di contatto con i patogeni. Nel caso di COVID-19, il contagio avviene prevalentemente per inalazione di *droplet*, goccioline di Flügge o aerosol contenenti SARS-CoV-2 espirate con la tosse, gli starnuti o la conversazione con soggetti contagiosi. Sono quindi particolarmente importanti i sistemi di difesa delle vie aeree superiori. L'anatomia stessa del naso favorisce il contatto dell'aria inspirata con le pareti delle mucose nasali e retrofaringee, dove il muco trattiene le particelle e le cellule e i fattori del sistema immunitario innato possono interagire col virus.

Uno dei principali meccanismi di protezione dai virus del sistema immunitario innato è la produzione, da parte delle cellule infettate, di interferoni (IFN). I virus, per potersi replicare e infettare poi altri individui, devono entrare nelle cellule dell'ospite e monopolizzare il loro sistema di sintesi proteica. Gli IFN di tipo I sono fattori (citochine), prodotti dalle cellule infettate e da alcune cellule del sistema immunitario, in grado di ridurre la replicazione virale in altre cellule con vari meccanismi che includono la limitazione della sintesi proteica. In aggiunta agli IFN, le cellule del sistema immunitario innato potrebbero essere responsabili della protezione dal virus, attraverso l'uccisione delle cellule infettate. Alcune di queste cellule immunitarie, come le cellule NK o i linfociti T γ/δ o le cellule MAIT, potrebbero identificare le cellule infettate attraverso il riconoscimento della variazione dell'espressione in membrana di alcune molecole, variazione indotta dall'infezione virale indipendentemente dal tipo specifico di virus, e di conseguenza uccidere la cellula infettata prima che il virus riesca a replicarsi estesamente.

I dati della letteratura però non sono concordi nell'individuare in questi fattori umorali o cellulari del sistema immunitario innato i principali elementi responsabili della protezione da SARS-CoV-2. A differenza di altri coronavirus come SARS-CoV e MERS, questo nuovo virus non sembra in grado di stimolare il rilascio di elevate quantità di IFN di tipo I (14, 15) e le evidenze del ruolo delle cellule del sistema immunitario innato sono scarse (16).

Altri fattori potenzialmente protettivi del sistema immunitario innato nelle mucose che potrebbero contribuire alla difesa da SARS-CoV-2 sono le immunoglobuline (Ig) naturali di classe IgM, IgA e IgG. Le immunoglobuline naturali sono presenti già alla nascita e vengono prodotte da una sottopopolazione di linfociti B, probabilmente a seguito della stimolazione non-selettiva da parte di antigeni propri (self). Un classico esempio sono le immunoglobuline capaci di riconoscere le glicoproteine antigeniche specifiche dei gruppi sanguigni. I soggetti di gruppo 0 possiedono anticorpi naturali capaci di riconoscere le emazie che esprimono antigeni glicoproteici di gruppo A e B, pur in assenza di precedenti contatti con tali emazie, mentre i soggetti di gruppo AB non hanno tali anticorpi. Particolarmente interessanti nel caso di SARS-CoV-2 sono gli anticorpi naturali che riconoscono N-glicani espressi a bassa frequenza sulle cellule self. Siccome i virus si replicano nelle cellule umane, possono acquisire gli stessi N-glicani della cellula ospite, ma tali glicani possono disporsi in maniera molto ravvicinata sulle proteine virali, favorendo il legame delle Ig

naturali. La proteina S di SARS-CoV-2 ha numerosi siti esposti N-glicani che potrebbero essere riconosciuti da Ig naturali e alcuni di questi siti glicosilati si trovano molto vicino al sito della proteina S che lega il recettore ACE2 (17). In tal modo le Ig naturali potrebbero impedire il legame del virus al suo recettore sulla cellula ospite e di conseguenza avere un ruolo neutralizzante. Particolarmente interessante è l'osservazione che le IgM naturali si riducono notevolmente con l'età e dopo i 55-60 anni i livelli sono molto bassi. Questa osservazione potrebbe spiegare la maggiore suscettibilità alle forme più severe di COVID-19 negli anziani. Particolarmente interessante è inoltre il possibile ruolo della lectina legante il mannosio (MBL).

Anche la concentrazione di questo fattore del sistema immunitario innato decresce significativamente con l'età e il suo intervento potrebbe essere particolarmente importante nella protezione dall'infezione da SARS-CoV-2 (18). Infatti, sono stati descritti glicani ricchi in mannosio sulla proteina S che potrebbero legare MBL (19) e in tal modo inibire il legame della proteina virale di superficie al suo recettore sulla cellula umana. Il sistema del complemento è un altro fattore dell'immunità innata che può favorire l'infiammazione e la protezione dall'infezione da SARS-CoV-2. Di particolare rilievo in questo caso è la terza modalità di attivazione del sistema del complemento, la via delle lectine, che viene innescata proprio dall'MBL. L'attivazione del sistema del complemento a seguito del legame con MBL può quindi essere considerato un ulteriore meccanismo di protezione del sistema immunitario innato, grazie al reclutamento di cellule infiammatorie e alla liberazione di citochine a livello dei siti d'infezione. Studi specifici saranno necessari per stabilire quali, fra i meccanismi accennati o anche altri ad oggi non presi in considerazione, siano effettivamente operanti nella difesa innata da SARS-CoV-2.

1.2.2. Immunità adattativa e clearance virale

Le cellule epiteliali respiratorie infettate da SARS-CoV-2 producono le proteine del virus a partire dall'RNA virale. Queste proteine vengono processate all'interno della cellula e i frammenti peptidici derivati sono presentati attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I ai linfociti T citotossici CD8⁺ (19). I linfociti T CD8⁺ attivati si moltiplicano con sviluppo di linfociti T della memoria ed effettori citotossici specifici contro il virus che sono in grado di lisare le cellule del tessuto infettate dal virus. Contemporaneamente, per un breve periodo, il virus intero o suoi frammenti sono riconosciuti dalle cellule professionali presentanti l'antigene. Queste cellule sono principalmente cellule dendritiche e macrofagi che presentano peptidi virali a cellule T CD4⁺ attraverso MHC di Classe II (19). Le cellule B possono riconoscere direttamente il virus e attivarsi e/o interagire con le cellule T CD4⁺ con produzione di anticorpi.

Nel corso di infezione da SARS-CoV-2 con decorso clinico lieve-moderato è stato osservato un aumento dei linfociti B, dei linfociti T *helper* follicolari e delle cellule T CD8⁺ e CD4⁺ attivate al momento della clearance virale con aumento ulteriore nei giorni successivi. La risposta anticorpale primaria, rappresentata dalla comparsa di anticorpi antiviral IgM si osserva in genere entro la prima settimana dalla comparsa dei sintomi e prima della loro scomparsa (20, 21). La comparsa di anticorpi IgG segue e in parte si sovrappone alla risposta precoce IgM. Gli anticorpi riconoscono principalmente epitopi della proteina S, N e in misura minore M. Alcuni anticorpi antiviral IgG, detti anticorpi neutralizzanti, sono funzionalmente protettivi, in grado cioè di bloccare l'entrata del virus nella cellula, rendendo il soggetto immune all'infezione virale. Non si hanno ancora dati relativi alla durata di questi anticorpi o al livello minimo necessario per risultare protettivi.

Nei casi più gravi di COVID-19 si osserva la presenza di linfopenia, tanto da essere considerata un biomarcatore di gravità. Infatti, negli studi che si sono concentrati sui casi gravi di COVID-19 si è osservata una caratteristica riduzione dei linfociti T memoria e delle cellule T CD8⁺ citotossiche. L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie effettuata mediante immunofluorescenza su sangue periferico, ha evidenziato un aumento della percentuale di cellule T CD4⁺ naive (CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁺) e una diminuzione delle cellule T helper di memoria (CD3⁺ CD4⁺ CD45RO⁺). Nei casi più gravi si è osservata anche una ridotta percentuale di linfociti T citotossici CD8⁺ e di cellule T regolatorie (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low})

(22). Inoltre è stato osservato un aumento delle cellule T-helper producenti IL-17 e un'aumentata attività citotossica dei linfociti CD8+ che potrebbe spiegare il grave danno anatomico polmonare (23). La riduzione dei linfociti si accompagna spesso a riduzione degli eosinofili, basofili e monociti con aumento dei neutrofili con conseguente alto rapporto neutrofili/linfociti (24). Come conseguenza di queste osservazioni, la percentuale di linfociti è stata considerata un biomarcatore predittivo di decorso (25). In particolare, i pazienti con percentuale di linfociti maggiore del 20 % dopo 10-12 giorni dall'insorgenza dei sintomi sono stati classificati come casi lievi-moderati e hanno mostrato un rapido recupero alla seconda osservazione effettuata a 17-19 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. I pazienti con percentuale di linfociti tra il 5-20 % alla prima osservazione sono stati considerati come affetti da malattia grave e hanno mostrato una prognosi a rischio alla seconda osservazione. Infine, i pazienti con percentuale di linfociti <5% alla prima osservazione sono stati classificati come affetti da malattia grave con un elevato tasso di mortalità alla seconda osservazione.

1.2.3. Iperattivazione immunitaria (cytokine storm, tempesta di citochine)

Una percentuale consistente di soggetti infettati con SARS-CoV-2 può andare incontro ad una malattia più severa, con interessamento delle vie aeree inferiori e polmonite che richiedono cure e supporto appropriato. Inoltre, un numero più limitato di soggetti può manifestare complicazioni respiratorie e coinvolgimento di altri organi e apparati che rendono la COVID-19 una malattia molto severa e ad esito fatale, soprattutto in soggetti d'età avanzata e con altre malattie concomitanti (comorbidità). In tali soggetti è stato osservato un livello particolarmente elevato di citochine nel siero (26-28). Questo dato è per alcuni versi in contrasto con l'osservazione che SARS-CoV-2, a differenza di SARS-CoV, sia meno capace di stimolare la secrezione di citochine infiammatorie nelle cellule polmonari (29). D'altra parte, l'osservazione che l'aggravamento della malattia e la rilevazione di alti dosaggi di citochine nel siero dei pazienti con malattia più grave si verifica abbastanza costantemente intorno al 10°-14° giorno dalla comparsa dei primi sintomi di malattia, in correlazione con la comparsa delle prime immunoglobuline specifiche contro SARS-CoV-2 nel sangue (18), induce a considerare che la risposta immunitaria adattativa con produzione di anticorpi ed espansione di linfociti T specifici per il virus possa essere corresponsabile della sintomatologia osservata. Nel corso di molte malattie infettive, inclusa l'influenza (30), e nella sepsi (31) un eccesso di risposta immunitaria associata ad uno stimolo diretto degli agenti patogeni può causare la secrezione di molte citochine infiammatorie che interferiscono con la normale evoluzione della risposta infiammatoria causando di conseguenza danno locale e sistemico. In tali casi si osservano cambiamenti patologici più gravi, come, nel caso dell'influenza, danno alveolare diffuso, formazione di membrane ialine, essudati di fibrina e guarigione con esiti fibrotici. Si possono aggiungere segni di gravi danni capillari, lesioni immunopatologiche e disfunzione d'organo.

Inoltre, le citochine/chemochine infiammatorie dal sito iniziale possono essere riversate nel sistema circolatorio e provocare tempeste di citochine sistemiche che sono responsabili della disfunzione di molti organi. In corso di COVID-19, l'eccesso di risposta infiammatoria potrebbe essere causato da una risposta immunitaria particolarmente vigorosa secondaria ad un'intensa replicazione virale, con liberazione di elevate quantità di antigeni virali. Questo potrebbe accadere a causa di un mancato controllo iniziale della replicazione virale da parte del sistema immunitario innato e di una rapida colonizzazione degli alveoli polmonari (18). Gli alveoli, infatti, sono siti anatomicamente predisposti allo scambio gassoso e molto meno alla difesa immunitaria naturale contro i virus. Sono infatti presenti molecole di surfattante capaci di opsonizzare e legare LPS (32) e i macrofagi alveolari possono fagocitare batteri opsonizzati, ma non sono presenti sufficienti difese antivirali. Le immunoglobuline che si possono trovare sono prevalentemente quelle della memoria che trasudano dal sistema circolatorio a seguito di infiammazione, ma non è stata descritta la presenza di immunoglobuline naturali. Un eccesso di cellule specifiche potrebbe quindi condizionare una maggiore produzione di citochine infiammatorie e l'eccesso quantitativo di anticorpi potrebbe favorire la formazione e deposizione di immunocomplessi che, attivando il sistema del complemento per via classica,

contribuiscono alla tempesta citochinica. Sebbene le cause sono ipotizzate, ma ancora da dimostrare con specifici studi, la conoscenza del fenomeno della tempesta di citochine è importante per poter mettere in atto degli approcci terapeutici volti a mitigarne le conseguenze.

2. Stimolazione del sistema immunitario per prevenire l'infezione

2.1. Sviluppo di vaccini

Lo scopo dei vaccini è quello di indurre una efficace e persistente memoria immunitaria. Lo sviluppo di un vaccino efficace e sicuro, in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva senza effetti collaterali, è un processo piuttosto lungo ed elaborato che parte dalla conoscenza dell'agente patogeno responsabile della malattia che si intende prevenire, seguono quindi le fasi di sperimentazione preclinica e clinica e si conclude con l'autorizzazione all'immissione in commercio.

In particolare ci sono diversi aspetti da considerare per la scelta della migliore strategia vaccinale relativa allo specifico patogeno in studio:

- **Antigene:** la componente del patogeno contro cui si vuole indurre una risposta immunologica efficace. Nel caso di SARS-CoV-2 l'entrata del virus nella cellula target avviene tramite il legame della proteina *spike* con il recettore ACE2 umano, (33, 34). Per cui, anticorpi diretti contro la proteina *spike*, in particolare contro la regione che lega il recettore (RBD), possono essere anticorpi neutralizzanti e quindi protettivi.

Un vaccino protettivo, in grado di bloccare l'infezione di SARS-CoV-2 deve necessariamente utilizzare la proteina *spike* come antigene di elezione. Altri antigeni, quali le proteine N e M, possono comunque essere inclusi allo scopo di indurre una risposta anticorpale più ampia e che comprenda inoltre una risposta cellulare specifica e funzionale, in grado di uccidere le cellule infette.

- **Sistema di veicolazione dell'antigene:** l'antigene può essere introdotto nel nostro organismo in forma libera o trasportato da particelle fisico/chimiche come liposomi o sali minerali, in modo da proteggere l'antigene stesso dalla degradazione o tramite vettori virali o batterici per favorire un'alta e duratura espressione dell'antigene nelle cellule dell'ospite e indirizzare il tipo di risposta immunitaria.
- **Adjuvanti:** molecole che aiutano a migliorare in modo quantitativo e qualitativo la risposta indotta dal vaccino. Consentono di ridurre la dose degli antigeni e la frequenza delle immunizzazioni per la loro capacità di attivare le cellule che riconoscono l'antigene (cellule presentanti) e di accelerare la risposta immunitaria. Consentono di migliorare l'efficacia delle vaccinazioni nei neonati, negli anziani o nei soggetti immuno-compromessi, che spesso non rispondono o rispondono poco ai vaccini. Quindi grazie alla presenza degli adjuvanti la protezione indotta dai vaccini è resa possibile anche nei soggetti che sono più sensibili ed esposti alle malattie.
- **Via di somministrazione:** può essere sistemica o mucosale. I vaccini in uso nell'uomo sono generalmente somministrati per via intramuscolare, anche se alcuni sono inoculati per via sottocutanea e intradermica. La via di somministrazione mucosale è meno utilizzata per ragioni di sicurezza, ma ha il vantaggio di indurre una risposta protettiva proprio nel sito di entrata del patogeno. Nel caso di SARS-CoV-2, la somministrazione intranasale del vaccino sarebbe la più appropriata, in quanto stimolerebbe una forte immunità mucosale specifica.
- **Numero di dosi (richiami):** una risposta immunitaria potente e duratura richiede anche più somministrazioni del vaccino a tempi prestabiliti.

La tipologia di vaccino determina il tipo, la forza e la durata della risposta immunitaria indotta. Si possono distinguere diversi tipi di vaccino che possono essere utilizzati per prevenire l'infezione da SARS-CoV-2 e che sono attualmente in studio (35):

- **Vaccino vivo attenuato.** Basato sull'attenuazione dell'agente patogeno che viene modificato in modo da non causare la malattia, ma è ancora in grado di replicarsi e quindi di stimolare in maniera ottimale il sistema immunitario e di indurre una più efficace e duratura memoria immunitaria, rispetto ad altri tipi di vaccini.
- **Vaccino inattivato.** Per poter produrre un vaccino inattivato si deve procedere alla crescita del virus in colture cellulari (*in vitro*) e in seguito inattivarlo con metodi chimici o fisici. Tale trattamento può modificare le caratteristiche immunogeniche delle componenti del patogeno e quindi ridurre la capacità di indurre una forte risposta immunitaria.

Per questo motivo spesso si ricorre ai richiami vaccinali, successivi alla prima dose di vaccino. Il vaccino inattivato possiede generalmente un elevato grado di sicurezza, essendo privo delle capacità di replicazione.

- **Vaccino a subunità.** La disponibilità di tecniche sofisticate di biologia molecolare che consentono la manipolazione del DNA (tecnica del DNA ricombinante) e la sintesi *in vitro* di molecole specifiche di un determinato microrganismo, ha portato negli anni a produrre vaccini sempre più sicuri e con minori effetti collaterali. A differenza dei vaccini inattivati e attenuati, il vaccino a subunità è costituito da parti del virus, purificate partendo dal microrganismo intero o sintetizzate *in vitro* mediante tecniche di biologia molecolare. Queste tecniche avanzate permettono anche di generare particelle virali del tutto simili al virus originale (*Virus-Like Particle*, VLP), prive del materiale genetico del virus, quindi sicure, ma in grado di indurre risposta immunitaria. In generale i vaccini a subunità inducono una moderata risposta anticorpale che necessita sia della presenza di adiuvanti, per aumentarne l'immunogenicità sia di richiami per mantenere livelli anticorpali protettivi. I vaccini a subunità sono generalmente sicuri e ben tollerati.
- **Vaccini genetici.** Sono basati sull'inoculo di materiale genetico codificante per l'antigene del virus. In seguito alla somministrazione del vaccino genetico, l'antigene di interesse viene quindi espresso dalle cellule dell'ospite. Il materiale genetico può essere somministrato come DNA plasmidico, come RNA messaggero (mRNA) oppure può essere veicolato da vettori ricombinanti replicanti o non replicanti e basati su virus quali adenovirus, poxvirus e alphavirus o batteri (BCG, *Salmonella*). L'antigene una volta espresso dalla cellula dell'ospite viene processato in modo da essere presentato ai linfociti T, ma può anche essere rilasciato o esposto sulla membrana cellulare e riconosciuto dai recettori delle cellule B. In questo modo i vaccini genetici sono in grado di indurre ottime risposte cellulo-mediate CD4+ e CD8+ e buone risposte anticorpali. Inoltre, in base al meccanismo di azione descritto, la risposta indotta dai vaccini genetici è più duratura rispetto ai vaccini a subunità o inattivati. Il grado di sicurezza dei vaccini genetici è superiore rispetto a quello dei vaccini vivi attenuati.

Dal momento della scoperta del nuovo coronavirus SARS-CoV-2 e in base anche all'esperienza precedente nell'ambito dello sviluppo di vaccini contro altri virus e altri coronavirus, quali SARS-CoV e MERS-CoV, si sono avviate in tutto il mondo sperimentazioni che utilizzano diverse strategie.

La Figura 1 dà un quadro di quali e quante strategie sono attualmente in sperimentazione per la valutazione dell'efficacia e sicurezza di un vaccino anti-SARS-CoV-2. In particolare, ad oggi la maggior parte dei vaccini è nella fase di sperimentazione preclinica, mentre tra i candidati in fase di sperimentazione clinica si annoverano vaccini genetici (BNT162 e mRNA-1273, entrambi basati su molecole di RNA incapsulato in nanoparticelle lipidiche; INO-4800, a base di DNA plasmidico; Ad5-nCoV e ChAdOx1, basati su vettori adenovirali), 2 vaccini inattivati e un vaccino a subunità.

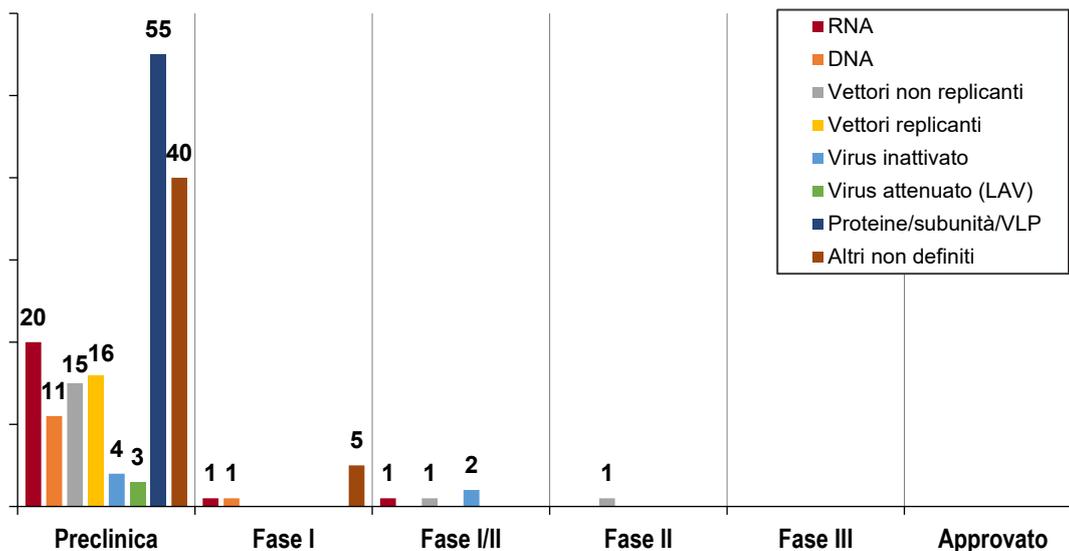


Figura 1. Numero e tipo di strategie vaccinali COVID-19 al 28 maggio 2020

Il link https://vac-Ishtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/ contiene maggiori informazioni sempre aggiornate relative alle diverse piattaforme vaccinali e al loro stato di avanzamento.

2.2. Considerazioni generali riguardo allo sviluppo dei vaccini: tempistica, tossicità ed efficacia

Anche se l'emergenza pandemica richiede tempi veloci, rimane la necessità di rispettare tutte le procedure e i tempi previsti per l'approvazione e la produzione su larga scala di un vaccino efficace e sicuro (36). In base all'esperienza pregressa di sviluppo di altri vaccini bisogna valutare alcuni aspetti tra cui: 1) la possibilità che un vaccino induca anticorpi che aumentino l'infezione (*Antibody-Dependent Enhancement*, ADE) favorendo ed esacerbando la malattia (come osservato per i vaccini contro Dengue, RSV, MERS, SARS); 2) la tossicità a lungo termine; 3) l'efficacia e la sicurezza, soprattutto in alcune fasce della popolazione come negli anziani, nei soggetti immuno-compromessi o nelle donne in gravidanza (37, 38).

3. Approcci Immunologici al trattamento dell'infezione

3.1. Immunomodulazione

Come descritto in precedenza, una parte dei pazienti COVID-19 può sviluppare una iperattivazione immunitaria con tempesta citochinica e aspetti clinici e di laboratorio che richiamano la linfocitosi emofagocitica secondaria (HPS) e/o un suo sottotipo rappresentato dalla sindrome da attivazione macrofagica (MAS) (39, 40).

In assenza di farmaci anti-virali sicuramente efficaci, l'utilizzo di farmaci immunomodulanti, spesso usati nella pratica clinica reumatologica, in grado di correggere almeno in parte l'iperattivazione immunitaria con aumento delle citochine infiammatorie, può costituire una opzione preziosa nel trattamento di COVID-19 con decorso grave (41, 42).

Di seguito i principali trattamenti anti-infiammatori, biologici e non, già utilizzati nella terapia dei casi gravi di COVID-19 e riportati in studi osservazionali.

3.1.1. anti-IL-1

Significative evidenze indicano che l'IL-1 possa rappresentare un target clinico efficace per il trattamento di pazienti con COVID-19 con decorso grave. È infatti ormai evidente che una disregolata risposta immunitaria contribuisce al quadro clinico in pazienti con infezione grave ed è stato dimostrato che tali pazienti presentano spesso un aumento della concentrazione di IL-1 e IL-6 (43, 44).

L'**IL-1** (termine con il quale genericamente vengono chiamate due diverse citochine propriamente dette IL-1 α e IL-1 β) svolge notoriamente un ruolo importante, oltre che nell'ematopoiesi, nell'infiammazione e nelle risposte dell'ospite alle infezioni, spesso agendo in concerto con IL-6 e TNF α . Sia IL-1 α che IL-1 β si legano al recettore per l'IL-1 di tipo I (IL-1RI) il quale è espresso da un'ampia tipologia di cellule presenti in quasi tutti gli organi. Per questa ragione la sua attività è strettamente controllata a livello fisiologico e al contempo è coinvolta in molti processi patologici. Per una sua fine regolazione, l'organismo produce un inibitore endogeno, chiamato antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1 receptor antagonist: IL-1Ra), che compete con IL-1 α e IL-1 β per il legame con il recettore senza trasdurre alcun segnale. Esiste anche un secondo inibitore endogeno, l'IL-1R di tipo II (IL-1RII), una sorta di recettore 'esca' non funzionale, con un'affinità più alta per IL-1 β . Sebbene IL-1 α e IL-1 β inducano segnali simili legandosi allo stesso recettore, la loro attività *in vivo* sembra essere compartimentalizzata. Entrambe le citochine sono presenti a livello intracellulare come forme proteiche inattive, che vengono all'occorrenza attivate mediante scissione ad opera di specifiche proteasi (45).

Sono stati finora sviluppati diversi farmaci in grado di bloccare l'attività di IL-1 impiegati prevalentemente per il trattamento di alcune patologie per lo più su base autoimmune, tra di essi figurano:

- Anakinra (46), una versione ricombinante dell'antagonista endogeno di IL-1 (IL-1Ra), in grado di inibire l'attività citochinica competendo con l'IL-1 per legame al suo recettore, senza trasdurre alcun segnale. Il farmaco è approvato per il trattamento di diverse patologie caratterizzate da una iperproduzione di IL-1 tra cui l'artrite reumatoide e le sindromi febbrili periodiche;
- Canakinumab (47), un anticorpo monoclonale umano che lega l'IL-1 β con elevata affinità bloccandone l'attività biologica e prevenendo l'attivazione di altri mediatori infiammatori. Il farmaco trova indicazioni in diverse patologie con decorso infiammatorio pronunciato tra cui sindromi

periodiche associate a criopirina, **Sindrome di Muckle-Wells (MWS)**, e l'artrite idiopatica giovanile sistemica (SJIA);

L'IL1 è riconosciuta come uno dei primi motori che alimentano la tempesta di citochine nel contesto della linfocitosi emofagocitica secondaria (HLHS) o nella sindrome da attivazione macrofagica (MAS), il cui quadro clinico è molto simile a quello riscontrato nei pazienti COVID-19 gravi (48-50). Gli inibitori di IL-1 risultano essere terapie chiave nel trattamento della MAS o dell'HLH secondario, e pertanto possono essere valide opzioni terapeutiche anche per il trattamento di COVID-19, vantando un buon profilo di sicurezza anche quando usati in donne in gravidanza e bambini (51). Inoltre, uno studio randomizzato controllato per il trattamento della sepsi ha indicato che pazienti con transaminita e coagulopatia, fenotipi molto ricorrenti tra i pazienti COVID-19, beneficiano del trattamento con inibitori di IL-1 (52). Un aspetto importante è che, attraverso l'inibizione di IL-1, ci si aspetta che questi farmaci possano anche contenere la iper-produzione mediata da NF- κ B di altre citochine ad attività pro-infiammatoria, inclusa la IL-6.

Esistono segnalazioni su un precoce aumento di IL-1 in pazienti COVID-19 con progressione del danno polmonare (53) ed è stato di recente pubblicato un report su 7 casi di pazienti COVID-19 e linfocitosi emofagocitica secondaria trattati con Anakinra nei quali è stato osservato un miglioramento delle condizioni cliniche (54).

Diversi studi clinici sono attualmente in fase di reclutamento per il trattamento di COVID-19, mediante il ricorso ad inibitori dell'IL1 (in particolare Anakinra e Canakinumab), da soli o in associazione con altri farmaci immunomodulatori.

3.1.2. anti-IL-6

Anche l'IL-6 si sta rivelando come un valido target negli approcci terapeutici di immunomodulazione per il trattamento dei casi severi di COVID-19.

In generale l'attivazione di monociti, macrofagi e cellule dendritiche a seguito di infezioni da betacoronavirus porta ad una loro attivazione con conseguente secrezione di IL-6 e altre citochine infiammatorie. Parallelamente, la proteina C-reattiva sierica (CRP), molecola la cui espressione è promossa da IL-6, risulta essere un importante biomarcatore per le infezioni severe da betacoronavirus (55). A conferma di ciò, una elevata concentrazione sierica di IL-6 è stata riscontrata nei casi gravi di infezioni da MERS-CoV (56) ed è un segno distintivo dei pazienti con COVID-19; inoltre i livelli di IL-6 correlano fortemente con insufficienza respiratoria ed esiti clinici avversi (57).

L'IL-6 è fisiologicamente prodotta da varie tipologie di cellule, ematopoietiche e non, in risposta ad infezioni e danni ai tessuti, e svolge un ruolo di mediatore centrale del sistema immunitario, (58). In soggetti sani, i livelli ematici di IL-6 sono estremamente bassi, compresi tra 1 e 5 pg/mL, mentre aumentano in numerose condizioni infiammatorie, tra la cui la sindrome da rilascio di citochine (CRS) (59).

IL-6 può segnalare attraverso due diverse vie di trasduzione del segnale, la via classica 'cis' e quella definita 'trans' (60). Nella segnalazione cis, l'IL-6 si lega al recettore IL-6 ancorato alla membrana cellulare (mIL-6R) in un complesso con gp130 e la trasduzione del segnale a valle è mediata dalle proteine JAK (Janus chinasi) e STAT3. La gp130 legata alla membrana è ubiquitariamente espressa, mentre l'espressione di mIL-6R è limitata in gran parte alle cellule del sistema immunitario. L'attivazione della segnalazione cis provoca effetti pleiotropici sul sistema immunitario acquisito (cellule B e T) e sul sistema immunitario innato (neutrofili, macrofagi e cellule *Natural Killer*), che possono contribuire alla CRS (60). Nella segnalazione trans, l'IL-6 circolante si lega alla forma 'solubile' del recettore (sIL-6R), che forma poi un complesso con un dimero gp130 su potenzialmente tutte le superfici cellulari (tra cui le cellule endoteliali). Questo fenomeno si pensa possa dare un contributo molto forte all'insorgenza della "tempesta di citochine" sistemica (61).

Livelli sierici elevati di IL-6 o del suo recettore solubile (IL-6Rs) sono stati osservati in diverse patologie infiammatorie tra cui artrite reumatoide (RA), psoriasi e colite (58). L'efficacia degli antagonisti di IL-6 e di IL-6R per il trattamento di CRS e HLH secondaria sottolinea il ruolo centrale di IL-6 nella fisiopatologia delle sindromi iper-infiammatorie (60).

Nelle infezioni da COVID-19 i livelli sierici di IL-6 possono elevarsi fino a raggiungere anche i 100 pg/mL. La produzione di IL-6 da parte di macrofagi, monociti e cellule dendritiche può essere innescata direttamente da SARS-CoV-2 oppure indirettamente, mediante la stimolazione di altre cellule del sistema immunitario (62). Infatti è stato dimostrato che durante COVID-19, i linfociti T CD4+ si attivano rapidamente per acquisire un fenotipo Th1, generando GM-CSF e altre citochine pro-infiammatorie, che ulteriormente inducono l'attivazione dei monociti con conseguente elevata espressione di IL-6 (63). Da un punto di vista clinico, è stata osservata una forte correlazione tra i livelli sierici di IL-6 e l'RNAemia (RNA nel plasma) dei pazienti con infezione da SARS-CoV-2, la quale a sua volta si associa con un peggioramento delle condizioni generali (13).

Considerando anche la spiccata similitudine del quadro clinico con patologie infiammatorie come la CRS e la HLH secondaria, i farmaci antagonisti di IL-6 possono essere molto utili nel trattamento dei casi gravi di COVID-19.

Il Siltuximab è l'unico anticorpo monoclonale specifico per l'IL-6 attualmente approvato per uso clinico; è un anticorpo chimerico il cui meccanismo d'azione si basa sulla sua capacità di impedire che l'IL-6 possa interagire con il suo recettore, sia esso libero o espresso sulla superficie cellulare. Questo farmaco biologico è oggetto di studio per il trattamento di diversi tipi di neoplasie, ed è stato approvato per la malattia di Castleman (MC), una patologia caratterizzata da una ipertrofia dei linfonodi in presenza di un'iperplasia linfatica angiofollicolare (64). Un recente lavoro riporta i dati preliminari ottenuti da 21 pazienti affetti da COVID-19 con complicazioni respiratorie che sono stati trattati con Siltuximab nell'ambito di un programma per uso compassionevole presso l'ospedale Papa Giovanni XXIII di Bergamo (Italia). Dei 21 pazienti che hanno ricevuto Siltuximab per via endovenosa – ad una dose compresa tra 700 e 1.200 mg – il 33% manifestava un netto miglioramento delle condizioni cliniche e nel 43% veniva registrata una stabilizzazione della malattia (65).

Questi primi riscontri clinici hanno promosso l'avvio di nuovi studi clinici con Siltuximab, da solo o in associazione con altri anticorpi immunomodulanti, per testarne l'efficacia nel contesto di casi di COVID-19 con severe complicazioni respiratorie.

Da segnalare che al momento esistono ancora incertezze sulla eventuale differenza, in termini di efficacia e di sicurezza tra gli antagonisti che hanno come bersaglio diretto l'IL-6 e quelli che interferiscono con il suo recettore. A questo proposito, la non completa efficacia del Siltuximab riscontrata in una percentuale importante di pazienti, potrebbe essere in parte dovuta ad una produzione massiva di IL-6, tale da mascherare l'effetto del targeting diretto sulla citochina; questa ipotesi può forse spiegare le più promettenti evidenze cliniche registrate mediante le terapie che bloccano il recettore di IL-6, il cui principale rappresentante è il Tocilizumab (66). Quest'ultimo è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato, agonista dell'IL-6R, approvato per il trattamento dell'RA e dell'artrite a cellule giganti (GCA), in USA e Europa. Sono diversi gli studi autorizzati sul Tocilizumab. Tra questi, la US Food and Drug Administration (FDA) ha autorizzato (marzo 2020) uno studio di Fase III per valutarne l'utilizzo in pazienti ospedalizzati con COVID-19 severa (NCT04320615). In Italia, si è concluso uno studio non comparativo (di fase II) su Tocilizumab, il primo studio approvato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) nel corso della emergenza COVID-19. L'AIFA ha inoltre autorizzato (maggio 2020) uno studio di Fase III, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, per valutare la sicurezza e l'efficacia di Tocilizumab rispetto a placebo, entrambi in combinazione con lo standard di cura. L'analisi congiunta di questi due studi consentirà di ottenere una stima affidabile dell'entità del beneficio nel trattamento dei pazienti COVID-19. Accanto al Tocilizumab, è in fase di sperimentazione anche il Sarilumab, un anticorpo monoclonale umanizzato agonista dell'IL-6R

sviluppato per il trattamento dell'RA, in corso di valutazione nell'ambito di un trial di fase II/III (marzo 2020) in pazienti con COVID-19 severa (NCT04315298).

In ogni caso la massima cautela è raccomandata nella somministrazione degli antagonisti di IL-6, e anche un attento monitoraggio dei pazienti trattati. Questi farmaci biologici infatti, visto il ruolo cruciale di IL-6 nelle risposte immuni dell'ospite, aumentano il rischio di infezioni e possono ritardare l'eliminazione del virus; pertanto, in attesa di riscontri più circostanziati dalle sperimentazioni cliniche in corso, essi devono essere utilizzati solo nei pazienti gravi e al termine della fase ad alta carica virale di COVID-19, auspicabilmente in associazione a trattamenti antivirali di supporto (67).

3.1.3. Altri approcci immunoterapici

Inibitori di janus kinase (JAK) 1-2

Gli inibitori di JAK possono trattare la tempesta citochinica bloccando il segnale intracellulare (JAK mediato) di numerose citochine infiammatorie (IL-6, IFN- γ , IL-2). Queste citochine, attraverso il legame con il recettore, attivano un segnale intracellulare che coinvolge le JAK 1 e 2 per poi amplificare la risposta infiammatoria. Le JAK sono un bersaglio per farmaci immunomodulanti da impiegare per il trattamento dei pazienti infettati da SARS-CoV-2.

In particolare due farmaci inibitori delle JAK comunemente impiegati per il trattamento dell'artrite reumatoide (RA), sono oggetto di valutazione come terapia immunomodulatoria da destinare a pazienti COVID-19: il Baricitinib e il Tofacitinib (68,69). Questi farmaci potrebbero giocare un ruolo fondamentale anche per il trattamento di pazienti COVID-19 sia moderati che severi. Di seguito lo stato dell'arte relativamente ai farmaci sopra menzionati nel contesto del trattamento di pazienti COVID-19.

Il Baricitinib, un farmaco impiegato per il trattamento dell'RA, approvato in Europa e USA, è un inibitore di JAK 1 e JAK 2, ma è in grado di inibire anche GAK e AAK1, due regolatori dell'endocitosi virale in cellule che esprimono la proteina di superficie ACE2, dimostrata essere la porta di entrata nelle cellule di SARS-CoV-2. La concentrazione di Baricitinib plasmatica alla dose terapeutica già impiegata nel trattamento dell'artrite reumatoide sembra essere sufficiente ad inibire AAK1. Quindi, questo farmaco potrebbe essere utilizzato per ridurre l'entrata virale (GAK, AAK1 mediata) e l'infiammazione (JAK mediata) in pazienti affetti da COVID-19.

Il Tofacitinib è un inibitore delle JAK, già autorizzato in Europa per il trattamento dell'RA e della colite ulcerosa. L'AIFA ha autorizzato (maggio 2020) lo studio TOFACoV-2, coordinato dall'Università Politecnica delle Marche, uno studio di fase II, randomizzato, per valutare l'efficacia e la sicurezza del Tofacitinib in pazienti COVID-19 (<https://www.aifa.gov.it/web/guest/emergenza-covid-19>).

3.2. Sieri e anticorpi neutralizzanti

3.2.1. Sieri immuni e immunoglobuline iperimmuni

La somministrazione passiva di anticorpi (come plasma/siero o immunoglobuline iperimmuni) è una pratica non certamente nuova; i primi esempi risalgono al 1890 quando non si conoscevano ancora le terapie antimicrobiche e la sua utilità è stata dimostrata anche successivamente in altre epidemie (ovviamente con un'efficacia variabile a seconda del virus e dello studio), nonostante in molti casi non fosse stata accompagnata dalla misurazione dei titoli anticorpali e dalla conoscenza dei sierotipi virali (70)

Più recentemente, il siero di pazienti convalescenti è stato usato per l'epidemia di Ebola nel 2013 e H5N1 nel 2007 e anche in casi di altre infezioni da coronavirus come SARS-CoV (2003) e MERS-CoV (2012), dimostrando una reale efficacia, soprattutto se somministrato nei primi stadi della malattia (70,71).

Attualmente molti studi hanno ormai dimostrato che la maggior parte dei pazienti COVID-19 convalescenti hanno livelli rilevabili di anticorpi neutralizzanti (72, 73), i quali sembrerebbero, tra l'altro, essere molto specifici per SARS-CoV-2, in quanto non in grado di neutralizzare l'infezione da SARS-CoV, nonostante la cross-reattività, suggerendo comunque una diversa esposizione degli epitopi e diversa immunogenicità delle proteine *spike* (S) dei due coronavirus (72).

Inoltre, sono stati già riportati studi preliminari di efficacia della somministrazione del plasma di pazienti convalescenti in pazienti con COVID-19 in Cina (74).

In base a tutte queste considerazioni, in assenza di un vaccino, anticorpi monoclonali o farmaci sintetici, l'uso del plasma o siero di pazienti convalescenti può essere, attualmente, un'opzione efficace per la prevenzione e il trattamento di COVID-19, e anche rapidamente disponibile dal momento che il numero di persone infettate e guarite che possono donare il plasma è ormai elevato.

L'uso di immunoglobuline purificate per uso intravenoso (IVIG) e concentrate a partire da un pool di plasmici iperimmuni di pazienti convalescenti, sarebbe probabilmente più sicuro e avrebbe un'efficacia più elevata contenendo titoli di anticorpi neutralizzanti specifici definiti accuratamente, ma questo approccio necessita di tempi più lunghi per la preparazione dei prodotti iniettabili da distribuire anche in ambulatori, cliniche e ospedali (70, 75, 76).

Tuttavia, è necessario porre l'attenzione anche sui possibili rischi della somministrazione di plasma di pazienti convalescenti che spaziano dai problemi che notoriamente possono derivare dalle trasfusioni di sangue come, ad esempio, potenziali infezioni o reazioni immunitarie dell'ospite, a rischi teorici come, ad esempio, quello dell'*Antibody Dependent Enhancement* (ADE) dell'infezione, ossia meccanismi immunitari dannosi e infiammatori in presenza di particolari anticorpi, per lo più a basso titolo o non neutralizzanti. Sono stati descritti diversi meccanismi di ADE per alcuni coronavirus e c'è la probabilità che questo possa esacerbare l'infezione di alcuni ceppi (77, 78). Tuttavia, è possibile che questo rischio sia trascurabile nel caso di SARS-CoV-2, se si pensa che l'uso di siero di pazienti convalescenti si baserà su preparazioni con alti titoli di anticorpi neutralizzanti.

Inoltre alcuni dati suggeriscono che l'uso di plasma di pazienti convalescenti possa arrestare la progressione dell'infezione e ridurre la severità della malattia anche con un meccanismo diverso dalla neutralizzazione virale in quanto le immunoglobuline presenti nel plasma iperimmune possono down-regolare la risposta pro-infiammatoria tramite *pathway* Fc-mediati, come dimostrato anche in altri contesti di malattie autoimmuni e infezioni virali (78, 79). Alcuni studi suggeriscono persino l'uso di IVIG da donatore sano e non da paziente convalescente per prevenire la cascata di eventi infiammatori difficili da controllare che portano alla disfunzione multiorgano spesso osservata nei casi severi di COVID-19; questo tipo di approccio si è dimostrato ad oggi efficace in 3 pazienti (80, 79).

Infine è in via di pubblicazione un primo studio sulla sicurezza della somministrazione di plasma di pazienti convalescenti in 5000 pazienti COVID-19 effettuato negli USA che ha riportato un'incidenza di eventi avversi severi nell'1% dei casi e un'incidenza della mortalità a sette giorni del 14,9%. Va però sottolineato che questo studio si riferisce ad una coorte di pazienti trattati già ospedalizzati o in terapia intensiva per i quali la mortalità per COVID-19 è più elevata (15-20% per ospedalizzati e 57% per i pazienti in terapia intensiva) (81).

Sicuramente ad oggi, per dimostrare effettivamente l'efficacia di questi approcci di terapia passiva specificatamente per COVID-19, è necessario anche uniformare i protocolli, indicando quali pazienti trattare e le dosi da somministrare, la tempistica del prelievo del sangue e la selezione dei donatori sulla base del

titolo degli anticorpi neutralizzanti, il titolo di anticorpi neutralizzanti ammesso per la terapia (che secondo le raccomandazioni dell'agenzia americana del farmaco dovrebbe essere circa 1:160, 1:80) così come la preparazione dei prodotti per l'infusione endovenosa.

Tra i pazienti dimessi è riportata una grande variabilità della risposta anticorpale neutralizzante; secondo uno studio su 175 plasmi di pazienti convalescenti, circa il 30% conteneva bassi titoli di anticorpi neutralizzanti, 10 erano al di sotto dei limiti di rilevazione del saggio utilizzato, mentre 2 avevano titoli molto elevati (72).

Attualmente per valutare il titolo neutralizzante dei sieri vi sono solo saggi virologici specifici che devono essere effettuati in laboratori appropriati da organizzare per sostenere questa attività su larga scala.

Tuttavia, recenti studi stanno evidenziando come il titolo di anticorpi neutralizzanti si possa correlare con la quantità di anticorpi che legano la proteina *spike* (S), in particolare le regioni S1, S2 e il dominio che lega il recettore ACE2 (RBD-S) (72, 73), quindi si presuppone che in futuro possano essere messi a punto test sierologici specifici e sensibili per la valutazione della capacità neutralizzante dei plasmi raccolti.

Un altro aspetto da valutare, infine, è la durata di questo tipo di immunità, sviluppata dal paziente convalescente. Ci sono indicazioni che gli anticorpi neutralizzanti siano rilevabili tra i 10 e 15 giorni dallo sviluppo dei sintomi, e che le IgG anti SARS-CoV-2 siano ancora stabilmente presenti dopo i 50 giorni, ma non sono stati ancora valutati tempi più lunghi. (70, 82)

L'uso del plasma potrebbe essere considerato anche per la profilassi dell'infezione da SARS-CoV-2, per prevenire l'infezione in casi ad alto rischio come soggetti vulnerabili, operatori sanitari e individui che hanno avuto contatti con casi confermati di COVID-19. Presumibilmente per la profilassi potranno servire quantità minori di anticorpi neutralizzanti, ma i tempi per la somministrazione e le dosi necessarie non sono attualmente note (70).

In sintesi, il messaggio che si può estrapolare fino ad ora è che la terapia con il plasma iperimmune o di immunoglobuline di paziente convalescente possono essere una valida opzione sia per il trattamento che per la profilassi del COVID-19, ma sono sicuramente necessari ulteriori studi di efficacia e sicurezza. In particolare è necessario uno sforzo per uniformare protocolli, regolamentare i processi e preparare le strutture come laboratori per saggi e produzione del materiale iniettabile e banche di conservazione.

Infine, un ulteriore uso dei prelievi dei donatori convalescenti selezionati può essere quello di individuare potenziali anticorpi monoclonali neutralizzanti umani specifici per SARS-CoV-2 ad uso terapeutico.

3.2.2. Anticorpi monoclonali neutralizzanti

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono anticorpi identici fra loro, prodotti da un solo tipo di cellula immunitaria (cioè da un clone cellulare), differiscono quindi dai sieri policlonali immuni dove sono presenti anticorpi diversi specifici per diversi antigeni o specifici per diverse regioni dello stesso antigene. I mAb sono specifici per un determinato epitopo e possono essere selezionati per una particolare caratteristica in questo caso un epitopo neutralizzante l'infezione virale.

I mAb, si stanno affermando sempre più come classe di macromolecole usati a scopo profilattico/terapeutico e come esca molecolare per la ricerca di antigeni per lo sviluppo di vaccini. I mAb neutralizzanti i coronavirus colpiscono principalmente la proteina *spike* (S), una glicoproteina trimerica posta sulla superficie virale che media l'ingresso del virus nelle cellule ospiti. Questa proteina è composta da due subunità funzionali, S1 composta da 4 domini (S1a, S1b, S1c e S1d), che media l'interazione con il recettore della cellula ospite e S2 che media la fusione della membrana virale con quella cellulare. È noto che l'interazione dei recettori provoca cambiamenti conformazionali irreversibili nelle proteine S dei coronavirus favorendo la fusione della membrana e infine l'entrata del virus nella cellula.

Le proteine S di SARS-CoV-2 (1273 residui, ceppo Wuhan-Hu-1) e SARS-CoV (1255 residui, ceppo Urbani) sono identiche al 77,5% in base alla sequenza primaria di aminoacidi, sono strutturalmente molto simili. La regione di S che interagisce con il recettore sulla cellula ospite è detta "Receptor binding domain" (RBD) è localizzata a livello del dominio S1b, e lega l'enzima umano angiotensina 2 (ACE2) che funziona dunque come recettore cellulare. Malgrado le notevoli somiglianze fra le 2 proteine S, gli epitopi sul dominio RBD di SARS-CoV possono avere una differente accessibilità rispetto a quelli su RBD di SARS-CoV-2 nel quale solo uno dei tre RBD è in conformazione aperta nell'omotrimerico di S in fase di prefusione (33, 83)

Anticorpi monoclonali prodotti contro SARS-CoV e cross-reagenti con SARS-CoV-2

Dall'inizio della pandemia COVID-19 sono stati valutati tanti rimedi già sperimentati nella passata epidemia SARS, data l'elevata somiglianza fra SARS-CoV e SARS-CoV-2 e considerata l'elevata omologia fra le proteine S dei due virus, molti mAb nati per combattere SARS-CoV sono stati valutati anche sul nuovo virus con l'intento di individuare il più rapidamente possibile mAb terapeutici e/o informazioni sui requisiti necessari alla neutralizzazione. Il mAb S230 neutralizza il SARS-CoV mimando l'aggancio funzionale al recettore ACE2 e promuovendo riarrangiamenti conformazionali di fusione (84). Il mAb CR3022 lega un epitopo criptico accessibile solo quando almeno due dei tre domini RBD di un omotrimerico S sono nella conformazione aperta in SARS-CoV, (85, 86) e lega il dominio RBD di SARS-CoV-2 (87). Comunque nessuno di questi mAb neutralizza SARS-CoV-2. È interessante notare che alcuni dei più potenti mAb neutralizzanti specifici SARS-CoV (es. m396, CR3014) che legano il sito di legame per ACE2 di SARS-CoV non sono riusciti a legare la proteina S di SARS-CoV-2, ciò implica che la differenza fra RBD di SARS-CoV e di SARS-CoV-2 ha un impatto critico sulla cross-reattività dei mAb neutralizzanti e che è ancora necessario sviluppare nuovi mAb che leghino specificamente al RBD di SARS-CoV-2.

Il primo mAb cross neutralizzante specifico anche per SARS-CoV-2 è il 47D11. È stato ottenuto da topi transgenici e successivamente convertito in un formato totalmente umano con isotipo IgG1. È specifico per la regione S1b contenente RBD di SARS-CoV e SARS-CoV-2, e ha un'attività neutralizzante su pseudovirus di tipo VSV relativi sia a SARS-CoV sia a SARS-CoV-2, mediante un meccanismo indipendente dall'inibizione del legame di RBD ad ACE2. Sono stati segnalati meccanismi alternativi di neutralizzazione, come una destabilizzazione della struttura di prefusione causata da mAb neutralizzanti, si ipotizza che 47D11 possa agire con un meccanismo simile (88).

Il mAb S309 è stato isolato da cellule B di memoria di un individuo che si è infettato con SARS-CoV nel 2003. Neutralizza potentemente SARS-CoV-2 e SARS-CoV. S309 riconosce un epitopo contenente glicano che viene conservato all'interno del sottogenere sarbecovirus, e non compete con il legame di S con il recettore ACE2. Inoltre può attivare meccanismi effettori mediati dalla porzione Fc e l'attività neutralizzante aumenta sinergicamente se usato in combinazione con mAb neutralizzanti meno potenti. (89)

Anticorpi monoclonali specifici per SARS-CoV-2

mAb neutralizzanti specifici per RBD di SARS-CoV-2 ma non di SARS-CoV sono stati ottenuti da sequenze isolate da Cellule B di memoria di pazienti COVID-19 e denominati B5, B38, H2 e H4. I 4 mAb mostrano tutti un'attività neutralizzante nei confronti del virus, e B38 e H4 mostrano anche un'attività sinergica e una completa attività di inibizione del legame di S con il recettore ACE2. Inoltre un saggio di competizione fra i due mAb rivela che legano due epitopi differenti di RBD con una parziale sovrapposizione. I due anticorpi si sono dimostrati efficaci anche in modelli murini. L'analisi strutturale del complesso B38/RBD rivela che 18 dei 21 aminoacidi sull'RBD sono coinvolti nel legame di B38 e ACE2, giustificando il fatto che B38 abolisce il legame tra RBD di SARS-CoV-2 e il recettore (90).

Molte strategie sono state messe in atto per sviluppare anticorpi monoclonali specifici in grado di neutralizzare il virus. Tra le varie occorre segnalare quelle basate sull'utilizzo di librerie fagiche da cui selezionare costrutti anticorpali in grado di riconoscere porzioni specifiche dell'antigene virale. Alcuni mAb

di questo tipo sono stati isolati da una libreria anticorpale fagica a singolo dominio (sd). In questo caso viene prodotta la sola catena pesante variabile VH, selezionata per avere delle caratteristiche fisiche altamente stabili e solubili e per avere dimensioni molecolari molto contenute (circa 15kDa) così da poter raggiungere anche epitopi criptici. Selezionando la libreria contro l'antigene RBD, sono state isolate molti sd alcuni dei quali competono per il legame al recettore ACE2, anche se al momento nessuno di questi prodotti è in grado di neutralizzare l'infezione. Di contro, operando la selezione utilizzando la molecola S1 intera, sono state isolate ulteriori sd con capacità neutralizzante e con attività sinergica tra loro, in grado di riconoscere RBD anche se non sono in grado di competere per il legame ACE2 (91).

L'utilizzo di approcci di ingegneria genetica potrebbe consentire lo sviluppo accelerato di mAb in un contesto di pandemia in cui ogni accelerazione potrebbe consentire il trattamento di un maggior numero di soggetti infettati. (92). In tal senso i risultati recenti ottenuti con Ansuvimab (mAb114) usato per l'infezione da virus Ebola sintomatica è un esempio dell'importanza di poter disporre anche di queste armi in tempi rapidi durante un'epidemia (93, 94).

Conclusioni

Lo studio dei meccanismi immunologici coinvolti nel corso di infezione da SARS-CoV-2 e le implicazioni profilattiche e terapeutiche acquisite hanno consentito di inquadrare nel loro complesso le problematiche che tale nuovo virus ha sollevato.

La conoscenza di come il virus sia in grado di interagire col sistema immunitario, l'identificazione delle potenziali strutture target per lo sviluppo di un vaccino e le interazioni del virus stesso con il sistema immunitario sia stimolandone la risposta, ma anche inducendo una iperreattività in alcuni casi negativa, sono tutti aspetti che sono stati elucidati in pochissimi mesi o settimane, da quando l'infezione ha fatto la sua comparsa sino a quando ha raggiunto i livelli di pandemia.

Grandi speranze sono riposte nel vaccino ma anche in altri approcci non solo in grado di stimolare/regolare il sistema immunitario in maniera ottimale, ma anche capaci di inibire la replicazione virale impedendo la progressione della patologia.

Appare in tal senso evidente che solo un approccio multidisciplinare potrà fornire varie soluzioni specifiche per le molteplici situazioni cliniche e per la futura profilassi dell'infezione.

Bibliografia

1. ProMED. PRO/AH/EDR>Undiagnosed pneumonia - China (HU): RFI. *ProMED-mail* 2020. <https://promedmail.org/promedpost/?id=20191230.6864153>.
2. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*. 1966;1(7428):76-77. doi:10.1016/s0140-6736(66)92364-6
3. GISAID Global Initiative on Sharing All Influenza Data. Phylogeny of SARS-like betacoronaviruses including novel coronavirus (nCoV). <https://nextstrain.org/groups/blab/sars-like-cov>
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG *et al*. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
5. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G, Shi Z-L. 2020. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *bioRxiv* <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.22.914952v2>
6. Rottier PJM. The coronavirus membrane glycoprotein. In: Siddell SG (Ed.). *The Coronaviridae*. Boston, MA: Springer; 1995 p. 115-137 https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4899-1531-3_1.pdf
7. Adhikari SP, Meng S, Wu YJ, *et al*. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect Dis Poverty* 2020; 9: 29 doi: 10.1186/s40249-020-00646-x.
8. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, *et al*. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-582. doi:10.7326/M20-0504
9. Zhang Y, Chen C, Zhu S, Shu C, Wang D, Song J, Song Y, Zhen W, Zijian F, Wu G, Xu J, Xu W. 2020. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory-confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID19). *China CDC Wkly* 2(8):123-124
10. Chen H, Guo J, Wang C, *et al*. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30360-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30360-3).
11. Chen N, Zhou M, Dong X, *et al*. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-513. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
12. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, *et al*. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases (published online ahead of print, 2020 Apr 15). *Transl Res*. 2020;S1931-5244(20)30070-0. doi:10.1016/j.trsl.2020.04.007
13. Wang D, Hu B, Hu C, *et al*. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China (published online ahead of print, 2020 Feb 7). *JAMA*. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
14. Sallard E, Lescure FX, Yazdanpanah Y, Mentre F, Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19 (published online ahead of print, 2020 Apr 7). *Antiviral Res*. 2020; 178:104791. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104791
15. Mantlo E, Bukreyeva N, Maruyama J, Paessler S, Huang C. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection (published online ahead of print, 2020 Apr 29). *Antiviral Res*. 2020;179:104811. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104811
16. Maggi E, Canonica GW, Moretta L. COVID-19: unanswered questions on immune response and pathogenesis (published online ahead of print, 2020 May 7). *J Allergy Clin Immunol*. 2020;S0091-6749(20)30631-X. doi:10.1016/j.jaci.2020.05.001

17. Zhou D, Qi R, Zhang W. Accessible Surface glycopeptide motifs on spike glycoprotein of 2019-nCoV: implications on vaccination and antibody therapeutics. *Preprints* 2020, 2020020381. doi: 10.20944/preprints202002.0381.v1.
18. Matricardi PM, Dal Negro RW, Nisini R. The first, holistic immunological model of COVID-19: implications for prevention, diagnosis, and public health measures (published online ahead of print, 2020 May 2). *Pediatr Allergy Immunol.* 2020;10.1111/pai.13271. doi:10.1111/pai.13271
19. Gao T, Hu M, Zhang X, *et al.* Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation. *medRxiv preprint* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20041962>
20. Jansen JM, Gerlach T, Elbahesh H, Rimmelzwaan GF, Saletti G. Influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination. *J Clin Virol.* 2019;119:44-52. doi:10.1016/j.jcv.2019.08.009
21. Thevarajan I, Nguyen THO, Koutsakos M. *et al.* Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med* 2020;26:453–455. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2>
22. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 (published online ahead of print, 2020 Apr 29). *Nat Med.* 2020;10.1038/s41591-020-0897-1. doi:10.1038/s41591-020-0897-1
23. Qin C, Zhou L, Hu Z, *et al.* Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China (published online ahead of print, 2020 Mar 12). *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa248. doi:10.1093/cid/ciaa248
24. Xu Z, Shi L, Wang Y, *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome (published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2020 Feb 25). *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X
25. Tan L, Wang Q, Zhang D, *et al.* Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Sig Transduct Target Ther* 2020;5:33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>
26. Mehta P, McAuley DF, Brown M, *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020;395 (10229):1033-1034. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
27. Zhao M. Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies (published online ahead of print, 2020 Apr 16). *Int J Antimicrob Agents.* 2020;105982. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105982
28. Zhang C, Wu Z, Li JW, Zhao H, Wang GQ. The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality (published online ahead of print, 2020 Mar 29). *Int J Antimicrob Agents.* 2020;105954. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105954
29. Chu H, Chan JF, Wang Y, *et al.* Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19 (published online ahead of print, 2020 Apr 9). *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa410. doi:10.1093/cid/ciaa410
30. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(1):3-10. doi:10.1038/cmi.2015.74
31. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):517-528. doi:10.1007/s00281-017-0639-8
32. Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(5):765-774. doi:10.1513/AnnalsATS.201411-507FR
33. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
34. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-1263. doi:10.1126/science.abb2507
35. Calina D, Docea AO, Petrakis D, *et al.* Towards effective COVID 19 vaccines: Updates, perspectives and challenges (Review). *Int J Mol Med.* 2020;10.3892/ijmm.2020.4596. doi:10.3892/ijmm.2020.4596

36. Kim YC, Dema B, Reyes-Sandoval A. COVID-19 vaccines: breaking record times to first-in-human trials. *NPJ Vaccines*. 2020;5: 34. Published 2020 Apr 30. doi:10.1038/s41541-020-0188-3
37. Poland GA. Tortoises, hares, and vaccines: A cautionary note for SARS-CoV-2 vaccine development. *Vaccine*. 2020;38(27):4219-4220. doi:10.1016/j.vaccine.2020.04.073
38. Diamond MS and Pierson TC. The challenges of vaccine development against a new virus during a pandemic. *Cell Host Microbe*. 2020;27(5):699-703. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.021.
39. Al-Samkari H, Berliner N. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Pathol*. 2018;13:27-49. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043625
40. Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ. The immunology of macrophage activation syndrome. *Front Immunol*. 2019;10:119. doi: 10.3389/fimmu.2019.00119. eCollection 2019.
41. Nicholas E Ingraham, Sahar Lotfi-Emran, Beth K Thielen, Kristina Techar, Rachel S Morris, Shernan G Holtan. *et al*. Immunomodulation in COVID-19 *Lancet Respir Med* 2020. Published online May 4, 2020 [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30226-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30226-5).
42. Zhou F, Yu T, Du R, *et al*. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; 395: 1054–62.
43. Wen,W.,W. Su, H. Tang,W. Le, X. Zhang, Y. Zheng, X. Liu, L. Xie, J. Li, J. Ye, *et al*. 2020. Immune Cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20039362> (Preprint posted March 31, 2020).
44. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, Dai T, Zhang T, Lai, Y Wang J, *et al*. 2020. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042655> (Pre-print posted March 26, 2020).
45. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(9):703-18. doi: 10.1038/nrd2805.PMID: 20811382 Review
46. Lovell DJ, Bowyer SL, Solinger AM. Interleukin-1 blockade by anakinra improves clinical symptoms in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *Arthritis Rheum*. 2005;52(4):1283-1286. doi:10.1002/art.20953.
47. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, *et al*. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2416-2425. doi:10.1056/NEJMoa0810787
48. Huang C, Wang Y, Li X, *et al*. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China (published correction appears in *Lancet*. 2020 Jan 30). *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
49. Chen G, Wu D, Guo W, *et al*. Clinical and immunologic features in severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020; published online April 13. doi: 10.1172/JCI137244.
50. Conti P, Gallenga CE, Tete G, Caraffa A, Ronconi G *et al*. How to reduce the likelihood of coronavirus-19 (CoV-19 or SARS- CoV-2) infection and lung inflammation mediated by IL-1. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2020; 34 (2). doi: 10.23812/Editorial-Conti-2
51. Ilowite N, Porras O, Reiff A, *et al*. Anakinra in the treatment of polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis: safety and preliminary efficacy results of a randomized multicenter study. *Clin Rheumatol*. 2009;28(2):129-137. doi:10.1007/s10067-008-0995-9
52. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, *et al*. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III Trial. *Crit Care Med*. 2016;44(2):275-281. doi:10.1097/CCM.0000000000001402
53. Ong EZ, Chan YFZ, Leong WY, *et al*. A dynamic immune response shapes COVID-19 progression (published online ahead of print, 2020 Apr 30). *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128(20)30185-2. doi:10.1016/j.chom.2020.03.021

54. Dimopoulos G, de Mast Q, Markou N, *et al.* Favorable anakinra responses in severe covid-19 patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. (published online ahead of print, 2020 May 14). *Cell Host Microbe*. 2020;10.1016/j.chom.2020.05.007. doi:10.1016/j.chom.2020.05.007
55. Moore JB, *et al.* Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020. PMID: 32303591 No abstract available.
56. Fehr AR., Channapannavar R, Perlman S. Middle East respiratory syndrome (MERS): Emergence of a pathogenic human Coronavirus. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14; 68: 387–399. Published online 2016 Aug 26. doi: 10.1146/annurev-med-051215-031152
57. Qiurong Ruan, Kun Yang, Wenxia Wang, Lingyu Jiang, Jianxin Song. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020 Mar 3:1–3. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x (Epub ahead of print)
58. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Sep;9(9):703-18. doi: 10.1038/nrd2805.PMID: 20811382 Review
59. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A masterplayer in the cytokine network. *Oncology* 2020; 98 (3): 131-137. doi: 10.1159/000505099.
60. Sujin Kang, Toshio Tanaka, Masashi Narazaki, Tadimitsu Kishimoto. Targeting Interleukin-6 signaling in clinic. *Immunity* 2019 Apr 16;50(4):1007-1023. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.026.
61. Toshio Tanaka, Masashi Narazaki, Tadimitsu Kishimoto. Immunotherapeutic Implications of IL-6 Blockade for Cytokine Storm. *Immunotherapy* 2016 Jul;8(8):959-70. doi: 10.2217/imt-2016-0020.
62. Liao Y, Wang X, Huang M, Tam JP, Liu DX. Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 2011; 420 (2): 106-116. doi: 10.1016/j.virol.2011.09.003
63. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C *et al.* Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+ CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus. *BioRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945576>doi
64. Sarosiek S, Shah R, Munshi NC. Review of siltuximab in the treatment of multicentric Castleman's disease. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(6):360-366. doi:10.1177/2040620716653745
65. Gritti, G., F. Raimondi, D. Ripamonti, I. Riva, F. Landi, L. Alborghetti, M. Frigeni, M. Damiani, C. Mico, S. Faggioli, *et al.* 2020. Use of siltuximab in patients with COVID-19 pneumonia requiring ventilatory support. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.20048561> (Preprint posted April 15, 2020).
66. Xu, X.H.M., T. Li, W. Sun, D. Wang, B. Fu, Y. Zhou, X. Zheng, Y. Yang, X. Li, X. Zhang, *et al.* 2020a. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Chinaxiv* <http://chinaxiv.org/abs/202003.00026>; (Preprint posted March 5, 2020).
67. Ferro F, Elefante E, Baldini C, *et al.* COVID-19: the new challenge for rheumatologists. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(2):175-180
68. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, Stebbing J. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet*. 2020 Feb 15; 395(10223):e30-e31. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30304-4.
69. Lu CC, Chen MY, Chang YL, Chin J. Potential therapeutic agents against COVID-19: What we know so far. *Med Assoc*. 2020 Apr 1:10.1097/JCMA.0000000000000318. doi: 10.1097/JCMA. 0000000000000318
70. Casadevall A, Pirofski L-A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J Clin Invest*. 2020;130(4):1545-1548. <https://doi.org/10.1172/JCI138003>
71. Kazatchkine MD, Goldman M, Vincent J-L. Antibody-based therapies for COVID-19: Can Europe move faster? *PLoS Med*. 2020 May; 17(5): e1003127. Published online 2020 May 5. doi: 10.1371/journal.pmed.1003127
72. Fan Wu, *et al.* Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv* 2020.03.30.20047365 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
73. Ling Ni, *et al.* Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*. 2020 May 3 doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023

74. Shen C, Wang Z, Zhao F, *et al.* Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA* Published online March 27, 2020 doi:10.1001/jama.2020.4783
75. Roback JD, Guarner J. Convalescent plasma to treat COVID-19 possibilities and challenges. *JAMA* April 28, 2020 Volume 323, Number 16
76. Zhan Zhang, Yi-Wu Xie, Jiling Hong, Xin Zhang, Sui Yi Kwok, Xiaowu Huang, Sai Wah Wong, Bing-Lou Wong, SARS Ig Group. Purification of severe acute respiratory syndrome hyperimmune globulins for intravenous injection from convalescent plasma. *Transfusion*. 2005 Jul; 45(7): 1160–1164. Published online 2005 Jun 29. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.00179.x
77. Ruklanthi de Alwis, Shiwei Chen, Esther S. Gan, Eng Eong Ooi. Impact of immune enhancement on Covid-19 polyclonal hyperimmune globulin therapy and vaccine development. *EBioMedicine*. 2020 May; 55: 102768. Published online 2020 Apr 16. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102768
78. Akiko Iwasaki, Yexin Yang. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Apr 21: 1–3. doi: 10.1038/s41577-020-0321-6.
79. Prete M, Favoino E, Catacchio G, *et al.*, SARS-CoV-2 infection complicated by inflammatory syndrome. Could high-dose human immunoglobulin for intravenous use (IVIg) be beneficial? *Autoimmunity Reviews* 2020. [https://doi.org/ 10.1016/j.autrev.2020.102559](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102559)
80. Scoppetta C, Di Gennaro G, Polverino F. Editorial – High dose intravenous immunoglobulins as a therapeutic option for COVID-19 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24:5178-5179 doi: 10.26355/eurrev_202005_21214
81. Joyner M, *et al.* Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5,000 patients. *medRxiv* 2020.05.12.20099879; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.20099879>. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-ind-or-device-exemption-ide-process-cber/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma>
82. Guoxin Zhang, Shuke Nie, Zhaohui Zhang, Zhentao Zhang. Longitudinal Change of SARS-Cov2 Antibodies in Patients with COVID-19. *The Journal of Infectious Diseases*, 02 May 2020. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiaa229>
83. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367(6483):1260-1263 doi: 10.1126/science.abb2507.
84. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.
85. Yuan M, Wu NC, Zhu X, *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*. 2020;368(6491):630-633. doi:10.1126/science.abb7269
86. Joyce MG, Sankhala RS, Chen WH, *et al.* A cryptic site of vulnerability on the receptor binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *bioRxiv* 2020.2003.2015.992883, <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.992883>
87. Tian X, Li C, Huang A, *et al.* Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):382-385. Published 2020 Feb 17. doi:10.1080/22221751.2020.1729069
88. Wang C, Li W, Drabek D, *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection (published correction appears in Nat Commun. 2020 May 14;11(1):2511). *Nat Commun*. 2020;11(1):2251. Published 2020 May 4. doi:10.1038/s41467-020-16256-y
89. Pinto D, Park YJ, Beltramello M, *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody (published online ahead of print, 2020 May 18). *Nature*. 2020;10.1038/s41586-020-2349-y. doi:10.1038/s41586-020-2349-y
90. Wu Y, Wang F, Shen C, *et al.* A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2 (published online ahead of print, 2020 May 13). *Science*. 2020;eabc2241. doi:10.1126/science.abc2241

91. Wu Y, Li C, Xia S, *et al.* Identification of human single-domain antibodies against SARS-CoV-2 (published online ahead of print, 2020 May 12). *Cell Host Microbe*. 2020;S1931-3128(20)30250-X. doi:10.1016/j.chom.2020.04.023
92. Kelley B. Developing therapeutic monoclonal antibodies at pandemic pace. *Nat Biotechnol*. 2020;38(5):540-545. doi:10.1038/s41587-020-0512-5
93. Corti D, Misasi J, Mulangu S, *et al.* Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. *Science*. 2016;351(6279):1339-1342. doi:10.1126/science.aad5224
94. Levine M. Monoclonal antibody therapy for Ebola Virus Disease. *N Engl J Med* 2019;381:2365-2366, <https://doi.org/10.1056/NEJMe1915350> .

Rapporti ISS COVID-19

Accessibili da <https://www.iss.it/rapporti-covid-19>

1. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni. *Indicazioni ad interim per l'effettuazione dell'isolamento e della assistenza sanitaria domiciliare nell'attuale contesto COVID-19*. Versione del 7 marzo 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 1/2020)
2. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni. *Indicazioni ad interim per un utilizzo razionale delle protezioni per infezione da SARS-CoV-2 nelle attività sanitarie e socio-sanitarie (assistenza a soggetti affetti da COVID-19) nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2*. Versione del 10 maggio 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 2/2020 Rev. 2)
3. Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Gestione dei Rifiuti. *Indicazioni ad interim per la gestione dei rifiuti urbani in relazione alla trasmissione dell'infezione da virus SARS-CoV-2*. Versione del 31 maggio 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 3/2020 Rev. 2)
4. Gruppo di lavoro ISS Prevenzione e controllo delle Infezioni. *Indicazioni ad interim per la prevenzione e il controllo dell'infezione da SARS-CoV-2 in strutture residenziali socio-sanitarie*. Versione del 17 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n. 4/2020 Rev.)
5. Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Qualità dell'aria indoor. *Indicazioni ad interim per la prevenzione e gestione degli ambienti indoor in relazione alla trasmissione dell'infezione da virus SARS-CoV-2*. Versione del 25 maggio 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 5/2020 Rev. 2).
6. Gruppo di lavoro ISS Cause di morte COVID-19. *Procedura per l'esecuzione di riscontri diagnostici in pazienti deceduti con infezione da SARS-CoV-2*. Versione del 23 marzo 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 6/2020).
7. Gruppo di lavoro ISS Biocidi COVID-19 e Gruppo di lavoro ISS Ambiente e Rifiuti COVID-19. *Raccomandazioni per la disinfezione di ambienti esterni e superfici stradali per la prevenzione della trasmissione dell'infezione da SARS-CoV-2*. Versione del 29 marzo 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 7/2020).
8. Osservatorio Nazionale Autismo ISS. *Indicazioni ad interim per un appropriato sostegno delle persone nello spettro autistico nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2*. Versione del 30 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 8/2020 Rev.).
9. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente – Rifiuti COVID-19. *Indicazioni ad interim sulla gestione dei fanghi di depurazione per la prevenzione della diffusione del virus SARS-CoV-2*. Versione del 3 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 9/2020).
10. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente-Rifiuti COVID-19. *Indicazioni ad interim su acqua e servizi igienici in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2*. Versione del 7 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 10/2020).
11. Gruppo di Lavoro ISS Diagnostica e sorveglianza microbiologica COVID-19: aspetti di analisi molecolare e sierologica *Raccomandazioni per il corretto prelievo, conservazione e analisi sul tampone oro/rino-faringeo per la diagnosi di COVID-19*. Versione del 17 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 11/2020).
12. Gabbrielli F, Bertinato L, De Filippis G, Bonomini M, Cipolla M. *Indicazioni ad interim per servizi assistenziali di telemedicina durante l'emergenza sanitaria COVID-19*. Versione del 13 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 12/2020).
13. Gruppo di lavoro ISS Ricerca traslazionale COVID-19. *Raccomandazioni per raccolta, trasporto e conservazione di campioni biologici COVID-19*. Versione del 15 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 13/2020).

14. Gruppo di lavoro ISS Malattie Rare COVID-19. *Indicazioni ad interim per un appropriato sostegno delle persone con enzimopenia G6PD (favismo) nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2. Versione del 14 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 14/2020).
15. Gruppo di lavoro ISS Farmaci COVID-19. *Indicazioni relative ai rischi di acquisto online di farmaci per la prevenzione e terapia dell'infezione COVID-19 e alla diffusione sui social network di informazioni false sulle terapie. Versione del 16 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 15/2020).
16. Gruppo di lavoro ISS Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare COVID-19. *Animali da compagnia e SARS-CoV-2: cosa occorre sapere, come occorre comportarsi. Versione del 19 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 16/2020).
17. Gruppo di lavoro ISS Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare COVID-19. *Indicazioni ad interim sull'igiene degli alimenti durante l'epidemia da virus SARS-CoV-2. Versione del 19 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 17/2020).
18. Gruppo di lavoro ISS Ricerca traslazionale COVID-19. *Raccomandazioni per la raccolta e analisi dei dati disaggregati per sesso relativi a incidenza, manifestazioni, risposta alle terapie e outcome dei pazienti COVID-19. Versione del 26 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 18/2020).
19. Gruppo di lavoro ISS Biocidi COVID-19. *Raccomandazioni ad interim sui disinfettanti nell'attuale emergenza COVID-19: presidi medico-chirurgici e biocidi. Versione del 25 aprile 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 19/2020).
20. Gruppo di Lavoro ISS Prevenzione e Controllo delle Infezioni. *Indicazioni ad interim per la sanificazione degli ambienti interni nel contesto sanitario e assistenziale per prevenire la trasmissione di SARS-CoV 2. Versione del 14 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 20/2020 Rev.).
21. Ricci ML, Rota MC, Scaturro M, Veschetti E, Lucentini L, Bonadonna L, La Mura S. *Guida per la prevenzione della contaminazione da Legionella negli impianti idrici di strutture turistico recettive e altri edifici ad uso civile e industriale, non utilizzati durante la pandemia COVID-19. Versione del 3 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 21/2020).
22. Gruppo di lavoro ISS Salute mentale ed emergenza COVID-19 *Indicazioni ad interim per un appropriato supporto degli operatori sanitari e sociosanitari durante lo scenario emergenziale SARS-COV-2. Versione del 28 maggio.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 22/2020 Rev.)
23. Gruppo di lavoro ISS Salute mentale ed emergenza COVID-19 *Indicazioni di un programma di intervento dei Dipartimenti di Salute Mentale per la gestione dell'impatto dell'epidemia COVID-19 sulla salute mentale. Versione del 6 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 23/2020).
24. Gruppo di lavoro ISS Malattie Rare COVID-19. *Indicazioni ad interim per una appropriata gestione dell'iposurrenalismo in età pediatrica nell'attuale scenario emergenziale da infezione da SARS-CoV-2. Versione del 10 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 24/2020)
25. Gruppo di Lavoro ISS Biocidi COVID-19. *Raccomandazioni ad interim sulla sanificazione di strutture non sanitarie nell'attuale emergenza COVID-19: superfici, ambienti interni e abbigliamento. Versione del 15 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 25/2020)
26. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente e Rifiuti. *Indicazioni ad interim sulla gestione e smaltimento di mascherine e guanti monouso provenienti da utilizzo domestico e non domestico. Versione del 18 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 26/2020)
27. Ricci ML, Rota MC, Scaturro M, Nardone M, Veschetti E, Lucentini L, Bonadonna L, La Mura S. *Indicazioni per la prevenzione del rischio Legionella nei riuniti odontoiatrici durante la pandemia da COVID-19. Versione del 17 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 27/2020).
28. Gruppo di Lavoro ISS Test Diagnostici COVID-19 e Gruppo di Lavoro ISS Dispositivi Medici COVID-19. *Dispositivi diagnostici in vitro per COVID-19. Parte 1: normativa e tipologie. Versione del 18 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 28/2020)

29. Gruppo di lavoro ISS Malattie Rare COVID-19. *Indicazioni ad interim su malattia di Kawasaki e sindrome infiammatoria acuta multisistemica in età pediatrica e adolescenziale nell'attuale scenario emergenziale da infezione da SARS-CoV-2. Versione 21 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 29/2020)
30. Gruppo di lavoro Salute mentale ed emergenza COVID-19. *Indicazioni sull'intervento telefonico di primo livello per l'informazione personalizzata e l'attivazione dell'empowerment della popolazione nell'emergenza COVID-19. Versione del 14 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 30/2020)
31. Gruppo di lavoro Salute mentale ed emergenza COVID-19. *Indicazioni ad interim per il supporto psicologico telefonico di secondo livello in ambito sanitario nello scenario emergenziale COVID-19. Versione del 26 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 31/2020)
32. Gruppo di lavoro ISS Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare COVID-19. *Indicazioni ad interim sul contenimento del contagio da SARS-CoV-2 e sull'igiene degli alimenti nell'ambito della ristorazione e somministrazione di alimenti. Versione del 27 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 32/2020).
33. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente-Rifiuti COVID-19. *Indicazioni sugli impianti di ventilazione/climatizzazione in strutture comunitarie non sanitarie e in ambienti domestici in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2. Versione del 25 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 33/2020).
34. Gruppo di Lavoro Bioetica COVID-19. *Sorveglianza territoriale e tutela della salute pubblica: alcuni aspetti etico-giuridici. Versione del 25 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 34/2020)
35. Gruppo di Lavoro Bioetica COVID-19. *Il Medico di Medicina Generale e la pandemia di COVID-19: alcuni aspetti di etica e di organizzazione. Versione del 25 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 35/2020)
36. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente-Rifiuti COVID-19. *Indicazioni sulle attività di balneazione, in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2. Versione del 31 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 36/2020).
37. Gruppo di Lavoro ISS Ambiente-Rifiuti COVID-19. *Indicazioni per le piscine, di cui all'Accordo 16/1/2003 tra il Ministro della salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano, in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2. Versione del 31 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 37/2020).
38. Silano M, Bertinato L, Boirivant M, Pocchiari M, Taruscio D, Corazza GR, Troncone R *Indicazioni ad interim per un'adeguata gestione delle persone affette da celiachia nell'attuale scenario emergenziale SARS-CoV-2. Versione del 29 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 38/2020).
39. Gruppo di lavoro ISS Malattie Rare COVID-19 *Censimento dei bisogni (23 marzo - 5 aprile 2020) delle persone con malattie rare in corso di pandemia da SARS-CoV-2. Versione del 30 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 39/2020).
40. Gruppo di Lavoro Bioetica COVID-19. *Comunicazione in emergenza nei reparti COVID-19. Aspetti di etica. Versione del 25 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 40/2020).
41. Gruppo di lavoro ISS Salute mentale ed emergenza COVID-19. *Indicazioni per prendersi cura delle difficoltà e dei bisogni dei familiari di pazienti ricoverati in reparti ospedalieri COVID-19. Versione del 29 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 41/2020).
42. Gruppo di Lavoro ISS Bioetica COVID-19. *Protezione dei dati personali nell'emergenza COVID-19. Versione del 28 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 42/2020).
43. Gruppo di lavoro ISS Salute mentale ed emergenza COVID-19. *Indicazioni ad interim per un appropriato sostegno della salute mentale nei minori di età durante la pandemia COVID-19. Versione del 31 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 43/2020)

44. Gruppo di lavoro ISS Salute mentale ed emergenza COVID-19. *Indicazioni di un programma di intervento per la gestione dell'ansia e della depressione perinatale nell'emergenza e post emergenza COVID-19. Versione del 31 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 44/2020)
45. Giusti A, Zambri F, Marchetti F, Sampaolo L, Taruscio D, Salerno P, Chiantera A, Colacurci N, Davanzo R, Mosca F, Petrini F, Ramenghi L, Vicario M, Villani A, Viora E, Zanetto F, Donati S. *Indicazioni ad interim per gravidanza, parto, allattamento e cura dei piccolissimi 0-2 anni in risposta all'emergenza COVID-19. Versione 31 maggio 2020.* Roma: Istituto Suprire di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19 n. 45/2020)
46. Gruppo di Lavoro ISS Test Diagnostici COVID-19 e Gruppo di Lavoro ISS Dispositivi Medici COVID-19. *Dispositivi diagnostici in vitro per COVID-19. Parte 2: evoluzione del mercato e informazioni per gli stakeholder. Versione del 23 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 46/2020)
47. Gruppo di Lavoro ISS Bioetica COVID-19. *Etica della ricerca durante la pandemia di COVID-19: studi osservazionali e in particolare epidemiologici. Versione del 29 maggio 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 47/2020)
48. Gruppo di Lavoro Immunologia COVID-19. *Strategie immunologiche ad interim per la terapia e prevenzione della COVID-19. Versione del 4 giugno 2020.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19 n. 48/2020).