

18 Giugno

## Vaccinazioni eterologhe perplessità e domande: la neutralizzazione anticorpale. (Parte terza)

*Il tempo è la chimica dell'universo.*  
Khalid Masood

Per valutare gli effetti delle vaccinazioni eterologhe sarà prioritario poter definire la capacità antivirale degli anticorpi prodotti e se questi saranno in grado e per quanto tempo, di continuare a fornire una protezione "probabile" in caso di una successiva esposizione al virus o ad una sua variante. Questo è un punto "cruciale" definibile esclusivamente attraverso la disponibilità di specifici test di neutralizzazione degli anticorpi prodotti.

### **-Test di neutralizzazione attualmente disponibili**

Attualmente, i test di neutralizzazione anticorpale più affidabili utilizzano virus SARS-CoV-2 vivi prodotti in coltura cellulare e pertanto richiedono che tutte le procedure siano eseguite in una struttura di *livello di biosicurezza 3 (BSL3)*. E' pertanto diventa indispensabile avere a disposizione test di neutralizzazione da eseguire in un *laboratorio BSL2 standard*, a casa o in clinica.

Attualmente sono disponibili sempre nuovi test che utilizzano sostanzialmente *ACE2 purificato* per determinare l'effetto degli anticorpi neutralizzanti sull'interazione ACE2-Spike senza la necessità di dover ricorrere a cellule vive o virus. Un esempio di un test di neutralizzazione è il kit di rilevamento degli anticorpi di neutralizzazione SARS-CoV-2 *cPass di GenScript Biotech*. Questo kit, pubblicizzato per testare gli anticorpi *neutralizzanti pan-Ig*, utilizza il SARS-CoV-2 RBD come antigene virale per la cattura dell'anticorpo (GenScript *GenScript cPass™ Kit di rilevamento degli anticorpi di neutralizzazione SARS-CoV-2* (2020). Disponibile su: <https://www.genscript.com/cpass-sars-cov-2-neutralization-antibody-detection-kit.html> )

Sono anche disponibili test a *neutralizzazione surrogata* che utilizzano un saggio di legame competitivo basato su ELISA contro ACE2 ( Tan CW 2020)

### **-Test di neutralizzazione dell'antigene**

Attualmente, le proteine *RBD* e *Spike* sono gli antigeni più affidabili per misurare l'abbondanza di anticorpi neutralizzanti, inoltre hanno dimostrato di essere la fonte primaria di stimolazione contro il virus (Premkumar L 2020)

Tuttavia, va ricordato che non tutti gli anticorpi che legano l'*RBD* dimostrano un potenziale di neutralizzazione e che gli anticorpi *anti-RBD* in grado di neutralizzare possono essere presenti solo a concentrazioni molto basse in alcuni individui dopo l'infezione, inoltre, *RBD* non è l'unico antigene virale per la neutralizzazione mediata da anticorpi; ulteriori epitopi *non-RBD* presenti sulla proteina S hanno anche dimostrato di poter neutralizzare il virus.(Chi X, 2020)

**Alessandra Schäfer** del Dipartimento di Epidemiologia, University of North Carolina ritiene che gli attuali test di neutralizzazione disponibili forniscono *informazioni limitate* su possibili funzioni effettrici dipendenti da **Fc**, che probabilmente svolgono anche un ruolo importante nella protezione da SARS-CoV-2 (Schäfer A 2021)

I diversi test sierologici commerciali utilizzano l'*antigene N* per la cattura dell'anticorpo. Data l'elevata abbondanza di anticorpi *anti-N*, il targeting di questo antigene virale possiede il potenziale per aumentare la sensibilità del test. Le *proteine N* si trovano sulla superficie interna dei virus intatti e quindi rimangono inaccessibili agli anticorpi circolanti. Pertanto, è improbabile che i test che utilizzano N identifichino anticorpi neutralizzanti che forniscono un'immunità

sterilizzante all'infezione. Tuttavia non è escluso che le funzioni effettrici degli anticorpi *anti-N* potrebbero ancora fornire protezione. In sintesi gli attuali saggi di neutralizzazione diretti su un antigene singolo rilevano solo un sottoinsieme del pool totale di anticorpi neutralizzanti.

**Robert Trevethan** geniale ricercatore “accademico indipendente australiano” (così si definisce) ritiene che la qualità e l'utilità di un test sierologico per monitorare il risultato di una vaccinazione dipende principalmente dal suo grado di sensibilità e specificità (Trevethan R 2017)

La **sensibilità** descrive la capacità di un test sierologico di fornire un risultato positivo da campioni che contengono anticorpi contro SARS-CoV-2 ("veri positivi"); pertanto, un test altamente sensibile avrebbe una frequenza molto bassa di falsi negativi. Mentre la **specificità** descrive la capacità di un test di fornire un risultato negativo quando un campione non contiene anticorpi SARS-CoV-2. I test sierologici che “prendono di mira” le **IgM**, che naturalmente hanno una minore affinità per l'antigene virale rispetto alle **IgG**, saranno a maggior rischio di produrre falsi positivi e pertanto dovrebbero richiedere una soglia di specificità più elevata.

Le **soglie di test** per la specificità e la sensibilità sono *valori arbitrari* stabiliti sperimentalmente e differiscono tra i test e i metodi sierologici. **Attualmente, non esistono standard di riferimento internazionali per segnalare la sensibilità e la specificità dei test,** il che rende molto difficile confrontare i diversi test e test sierologici senza effettuare un confronto sperimentale diretto.

Le soglie di sensibilità e specificità inoltre sono importanti anche ai fini di *considerazioni epidemiologiche specifiche* per determinate situazioni e ambienti. Queste soglie possono essere modificate per consentire una maggiore sensibilità del test a scapito della specificità, o viceversa, per cui la specificità è favorita a scapito della sensibilità.

Ad esempio, in una regione con elevata sieroprevalenza SARS-CoV-2, la sensibilità può essere prioritaria rispetto alla specificità per garantire l'identificazione della maggior parte dei casi positivi. È vero anche il contrario nelle regioni a bassa prevalenza. Se la prevalenza in una data regione è molto rara, sarebbe favorita una maggiore specificità e una sensibilità relativamente bassa in modo che un minor numero di pazienti abbia risultati falsi positivi pur rilevando la maggior parte dei veri positivi.

Pertanto è indispensabile trovare un giusto equilibrio tra sensibilità e specificità, poiché le implicazioni epidemiologiche di falsi negativi o falsi positivi sproporzionati possono avere conseguenze profonde.

Un test con troppi falsi positivi manterrà le persone isolate più a lungo del necessario, creando tensioni sociali ed economiche altrimenti evitabili.

Un test con troppi falsi negativi risulterà nella sottostima della prevalenza della malattia, che potrebbe portare a un allentamento prematuro delle politiche di contenimento della malattia e a una recrudescenza delle ondate di infezione poiché i pazienti erroneamente identificati continuano inconsapevolmente a trasmettere la malattia. In un regime che adotta vaccinazioni eterologhe questo è un aspetto da affrontare e definire nelle sue procedure essenziali

### ***-Durata degli anticorpi neutralizzanti SARS-CoV-2***

Nonostante esistono vistose discrepanze tra gli studi riguardanti la persistenza o il declino degli anticorpi totali nei convalescenti è fondamentale notare che la persistenza degli anticorpi **IgG** non implica necessariamente la persistenza degli anticorpi neutralizzanti durante questo stesso periodo.

Infatti, **molte studi**:

-Lungo QX. *Nat Med* (2020) 26 :1200-4.

-Robbiani DF. *Nature* (2020) 584 ( 7821 ): 437-42.

-Isho B. *Sci Immunol* (2020) 5 ( 52 ).

-Chen Y *PLoS Pathog* (2020) 16 ( 9 ): e1008796. 10.1371/journal.ppat.

riportano varie intensità di declino in anticorpi neutralizzanti dopo tre mesi PSO, alla gravità della malattia essendo un fattore fortemente correlato con il tasso di decadimento di neutralizzazione

Al contrario, i dati di **alcuni studi**:

-Wajnberg A. *Science* (2020). 10.1126/Science.

-Iyer AS. *Sci Immunol* (2020) 5 ( 52 ). 10.1126/sciimmunol.abe0367

-Wu J. *medRxiv* (2020) 2020.07.21.20159178 .

-Ripberger TJ. *Immunology* 53 ( 5 ): 925-33. 10.1016/j.immuni.2020.10.004

Riportano che i titoli *anticorpali neutralizzanti* rimangono stabili da **75 giorni a 6 mesi** di PS O in individui convalescenti COVID-19 che presentano un ampio spettro di gravità della malattia

Un buon compromesso è ricavabile da un ampio studio di coorte di **Wajnberg et al.** *Dipartimento di Medicina Interna Generale, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York* che ha analizzato le risposte umorali in **30.032 individui positivi** agli anticorpi a New York City e ha dimostrato titoli anticorpali **anti-S IgG** relativamente stabili per cinque mesi, con titoli correlati alla neutralizzazione del virus (Wajnberg A, 2020)

Risultati simili sono stati dimostrati in uno studio di *coorte di convalescenza* in **Cina** per un periodo di follow-up di sei mesi con anticorpi IgG anti-S e anti-N rilevabili nel 70% dei pazienti, con associata stabilità nei titoli di neutralizzazione, sebbene questi risultati non sono stati ancora essere sottoposti a revisione paritaria (Wu J 2020)

I fattori che potrebbero influenzare la persistenza degli anticorpi neutralizzanti all'interno di coorti specifiche sono molteplici e vanno da un'elevata prevalenza del virus in una regione geografica definita o in una specifica sottopopolazione di individui come gli operatori sanitari in prima linea, alla riesposizione regolare al virus che può aiutare a sostenere livelli di anticorpi più alti e neutralizzare i livelli di anticorpi.

Un altro fattore può essere la persistenza di antigeni nei tessuti o come immunocomplessi sulle cellule dendritiche follicolari. In effetti, nuove prove suggeriscono che le risposte delle cellule B della memoria continuano ad evolversi negli individui guariti per almeno sei mesi dopo l'infezione

Inoltre durante questo periodo, le mutazioni somatiche si accumulano per produrre anticorpi neutralizzanti con maggiore potenza. Ciò suggerisce che, indipendentemente dal fatto che gli anticorpi neutralizzanti diminuiscano nel tempo, è probabile che la riesposizione al virus stimoli le cellule B della memoria a organizzare una risposta umorale rapida ed efficace.

Nel loro insieme, mentre le condizioni specifiche che influenzano la durata totale dell'immunità umorale SARS-CoV-2 rimangono da definire con maggiore precisione, la diminuzione dei titoli anticorpali non implica necessariamente una diminuzione o un'immunità difettosa. Infatti, ci si aspetta che i titoli anticorpali diminuiscano dopo la risoluzione di un'infezione acuta come conseguenza naturale dell'esaurimento delle plasmacellule a vita breve quando non sono più necessarie risposte immunitarie immediate e sostenute

Inoltre, l'emivita delle **IgG** nel siero è di circa 26 giorni (Mankarious S 1988) . Senza la produzione continua di anticorpi dalle plasmacellule, gli anticorpi antigene-specifici tenderanno a diminuire naturalmente. Pertanto, mentre i sintomi COVID-19 più gravi possono suscitare una protezione

più lunga per gli individui convalescenti, è plausibile che sintomi più lievi possano fornire finestre molto più brevi di *immunità sterilizzante*. Tuttavia, è noto che le risposte immunitarie adattative si basano sulla memoria immunologica sia delle cellule B che delle cellule T non solo per prevenire le reinfezioni, ma anche per diminuire la gravità della malattia; questa è anche la base della vaccinazione classica ma ignoriamo completamente cosa potrebbe accadere nella eterologa.  
*To be continued...*

### **Riferimenti:**

- Tan CW et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol.* 2020 Sep;38(9):1073-1078.
- Premkumar L et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol.* 2020 Jun 11;5(48):eabc8413.
- Chi X et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020 Aug 7;369(6504):650-655.
- Schäfer A et al. Antibody potency, effector function, and combinations in protection and therapy for SARS-CoV-2 infection in vivo. *J Exp Med.* 2021 Mar 1;218(3):e20201993.
- Trevethan R et al. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plausibilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Front Public Health.* 2017 Nov 20;5:307.
- Wajnberg A et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science.* 2020 Dec 4;370(6521):1227-1230.
- Wu J et al. L'infezione da SARS-CoV-2 induce risposte immunitarie umorali sostenute in pazienti convalescenti a seguito di COVID-19 sintomatico..  
*medRxiv* (2020) 2020.07.21.20159178 . 10.1101/2020.07.21.20159178
- Mankarious S et al. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med.* 1988 Nov;112(5):634-40. PMID: 3183495.