

1Giugno

Immunità adattativa: lo stato dell'arte (parte seconda)

Stay hungry, stay foolish

Steve Jobs

La maggior parte dei test cellulari, inclusi *ELISpots* e *ICS/AIM* accoppiati alla *citometria a flusso*, richiedono la restimolazione in vitro dei linfociti T con *peptidi HLA di classe I o di classe II* per misurare la produzione di citochine o, in alternativa, la sovraregolazione dei marcatori di attivazione superficiale (AIM). Le modifiche del saggio, come l'uso di pool di peptidi sovrapposti, consentono la copertura di tutti i potenziali epitopi all'interno di una determinata proteina antigenica e consentono l'adozione di saggi cellulari per le valutazioni a livello di popolazione.

Gli **ELISpot** sono economici e i più convenienti tra questi test perché la stimolazione è seguita dallo sviluppo diretto degli spot per l'enumerazione, bypassando la necessità di apparecchiature avanzate e personale altamente qualificato.

Questa praticità ha reso **ELISpot** un test di scelta in molti studi clinici. Sebbene i test ELISpot siano più facili da usare, saggi di restimolazione seguiti da analisi basate sulla citometria a flusso come gli approcci ICS e AIM consentono una caratterizzazione più approfondita delle cellule T, inclusa l'associazione di citochine e/o marcatori di attivazione con fenotipi di cellule T specializzati, inclusi effettori, memoria e altri sottoinsiemi specializzati all'interno della popolazione antigene-specifica.

Tuttavia, tutti i test di restimolazione in vitro richiedono campioni di sangue fresco o PBMC sani e crioconservati che conservano la loro capacità di produrre citochine durante una risposta di richiamo. Inoltre, i test ICS e AIM richiedono apparecchiature e reagenti relativamente costosi, personale addestrato e sono complicati dalla soggettività intrinseca dell'analisi dei dati di citometria a flusso.

Questi problemi presentano ostacoli significativi per l'uso di questi test nell'ambiente di laboratorio clinico. Scorso, sebbene tetrameri o reagenti multimerici simili conferiscano il vantaggio aggiuntivo di legare i linfociti T indipendentemente dal loro stato funzionale, la loro applicabilità è limitata agli individui che esprimono aplotipi HLA specifici. Considerando il polimorfismo HLA, questo approccio non è quindi l'ideale per la valutazione delle risposte dei linfociti T a livello di popolazione. Simile a molti degli altri test cellulari, la citometria a flusso basata su tetrameri rimane prevalentemente uno strumento sperimentale.

In un contesto più ampio, i saggi cellulari funzionali basati sul rilevamento di marcatori consolidati dell'attivazione dei linfociti T come l'IFN- γ sono stati implementati clinicamente e si sono dimostrati utili per la tubercolosi (TB), dove il dosaggio del rilascio di IFN- γ specifico per *Mycobacterium tuberculosis* (IGRA) ha sostituito il precedente test cutaneo a base di derivati proteici purificati non specifico.

Esistono ricerche che utilizzano solo test IGRA per l'infezione da SARS-CoV-2 negli Stati Uniti, compreso **QuantiFERON SARS-CoV-2** di QIAGEN, ma non ha ricevuto l'autorizzazione della FDA per un ampio uso clinico in COVID-19. Inoltre, nel novembre 2021 la FDA ha annunciato che **non avrebbe più consentito** la commercializzazione clinica di alcun test senza essere stato prima rivisto dalla FDA e autorizzato in base a un'autorizzazione all'uso di emergenza (EUA)

Attualmente, la maggior parte degli studi di sorveglianza COVID-19 basati sulla popolazione stanno monitorando la **sieroprevalenza** nei campioni di donatori di sangue, con uno studio che analizza oltre 1,4 milioni di campioni

L'ampio uso della **sieroprevalenza** come approccio di monitoraggio è probabilmente attribuibile alla relativa facilità di condurre questi studi e li orienta verso un focus sulle risposte anticorpali. Al contrario, non esistono programmi corrispondenti per analizzare la risposta dei linfociti T a livello nazionale. Sebbene uno degli obiettivi del programma di sorveglianza della **sieroprevalenza** dei Centri statunitensi per il controllo e la prevenzione delle malattie sia quello di monitorare l'esposizione precedente, numerosi studi hanno dimostrato una scarsa durabilità delle risposte anticorpali con titoli in calo nel tempo e, in alcuni casi, la mancanza di sierconversione, in particolare in individui asintomatici suggerendo che i **dati raccolti dagli studi di sieroprevalenza possono sottostimare la prevalenza della malattia.** Al contrario, anche negli individui asintomatici, viene rilevata una risposta forte e duratura dei linfociti T indicando che la combinazione delle metriche dei linfociti T con la sieroprevalenza può fornire una misura più accurata della prevalenza della malattia e dell'immunità della popolazione.

I dati sulla risposta **immunitaria adattativa** cellulare dovrebbero essere previsti per gli studi clinici a sostegno di nuove terapie e vaccini. La FDA ha richiesto solo i dati sugli esiti (cioè, la prova diretta della protezione da infezioni e/o malattie) per l'autorizzazione all'uso di emergenza. Sebbene la guida aggiornata della FDA riconosca l'uso di studi di immunogenicità per supportare l'efficacia del vaccino modificato COVID-19 diretto contro le varianti SARS-CoV-2 e nelle prove su soggetti pediatrici più giovani, l'agenzia **si concentra esclusivamente** sulla misurazione degli anticorpi.

I risultati inizialmente annunciati della sperimentazione del vaccino BNT162b2 in una popolazione pediatrica di età compresa tra 2 e meno di 5 anni **sono stati ritenuti insufficienti** per supportare l'autorizzazione all'uso di emergenza, ma nell'analisi sono stati considerati solo i risultati degli anticorpi.

Questo risultato non ha tenuto conto della possibilità di un ruolo protettivo da parte dei **linfociti T** indotti dal vaccino. Dato il probabile contributo delle cellule T nella protezione e la scarsità di dati basati sulla popolazione sulla risposta delle cellule T all'infezione e alla vaccinazione da SARS-CoV-2, le future sperimentazioni sui vaccini finanziate con fondi pubblici dovrebbero richiedere una valutazione approfondita dell'immunità sia cellulare che umorale.

Una comprensione più completa della **risposta immunitaria adattativa** alla SARS-CoV-2 potrebbe essere sfruttata per informare le politiche di salute pubblica e gli interventi mirati per proteggere le popolazioni vulnerabili. Inoltre, una valutazione completa dell'immunità indotta dal vaccino aiuterà a contrastare la disinformazione sui vaccini che è emersa, in parte, a causa della mancanza di metriche dei linfociti T.

Un esempio calzante è uno studio che ha ricevuto una copertura mediatica significativa, che ha suggerito che il vaccino Ad26.COVS2 fosse il 50% meno efficace contro le varianti virali. Questi risultati sono stati direttamente confutati da uno studio sponsorizzato dal produttore che ha concluso che, nonostante una diminuzione dell'attività di neutralizzazione degli anticorpi contro le varianti virali, la risposta dei linfociti T è rimasta invariata, a vantaggio dei riceventi del vaccino con un'immunità forte e persistente.

Poiché le varianti virali continuano a eludere le difese immunitarie dell'ospite, potrebbe essere necessaria una seconda generazione di vaccini o nuovi booster su misura per migliorare l'immunità al futuro VOC SARS-CoV-2. Il rapido aumento della prevalenza della [variante Omicron](#) fortemente mutata con proteine spike in Sud Africa e in tutto il mondo, così come la sottovariante [Delta AY.4.2](#) nel Regno Unito, serve come un'importante promemoria del fatto che le varianti continueranno a emergere, con conseguente diminuzione dell'efficacia della risposta umorale generata da una precedente infezione con ceppi ancestrali o vaccinazione. Inoltre, la proteina spike SARS-CoV-2 è in grado di indurre la fusione delle cellule ospiti, consentendo la trasmissione virale da cellula a cellula che è refrattaria alla neutralizzazione degli anticorpi.

Questi risultati sottolineano l'importanza dell'immunità cellulare e del riconoscimento delle cellule T degli *epitopi delle varianti virali* e della clearance citotossica delle cellule infettate dal virus. È necessaria una comprensione approfondita della risposta dei linfociti T per progettare la prossima generazione di vaccini che prendono di mira un ampio spettro di antigeni SARS-CoV-2 riconosciuti dai linfociti T.

Mentre ci adattiamo a coesistere con SARS-CoV-2, è imperativo imparare tutto ciò che possiamo sul virus e sulla risposta immunitaria dell'ospite per guidare ulteriori riduzioni di malattie e decessi clinicamente gravi. Le attuali strategie di test incentrate sulla sierologia, sebbene forniscano una ricchezza di informazioni importanti, non catturano l'intero spettro delle risposte immunitarie alle varianti emergenti sia nelle popolazioni sane che in quelle vulnerabili.

Le informazioni sulla risposta immunitaria cellulare a livello di popolazione potrebbero essere sfruttate per proteggere da malattie gravi, specialmente negli *individui immunocompromessi e suscettibili*. I dati critici a supporto del ruolo delle cellule T nella protezione effettiva contro COVID-19 sono vitali e attualmente mancano.

Questo problema è ulteriormente evidenziato dalle lacune nella generazione di dati relativi ai linfociti T nello sviluppo di vaccini esistenti e futuri. Oltre a caratterizzare il ruolo delle cellule T, abbiamo anche bisogno di implementare studi clinici per definire **le risposte protettive e disadattive** delle cellule T e l'impatto che hanno sulle presentazioni cliniche e sul decorso della malattia. L'obiettivo ideale sarebbe definire le risposte protettive dei linfociti T dopo l'infezione o la vaccinazione o entrambe.

Un recente studio è stato condotto da [Oxford Immunotec Global PLC](#) in collaborazione con Public Health England, dove un test basato sul principio di ELISpot (T-SPOT Discovery SARS-CoV-2 assay) è stato utilizzato per misurare la risposta dei linfociti T in quasi **3000 partecipanti** che sono stati quindi seguiti per infezione sintomatica da SARS-CoV-2 confermata dalla PCR.

Lo studio ha concluso che gli individui con cellule T SARS-CoV-2-reattive erano protetti da COVID-19. A causa della mutabilità del virus, dei costrutti multipli del vaccino e della diversità della risposta immunitaria, potrebbero essere necessari studi clinici anche su larga scala per definire le risposte protettive dei linfociti T.

Data la scalabilità e la riproducibilità degli approcci basati sul sequenziamento TCR, questa piattaforma potrebbe essere più adatta per studi a livello di popolazione volti a definire le risposte protettive dei linfociti T.

Potrebbero essere necessari studi clinici prospettici su un'ampia coorte che reclutano migliaia di volontari per trovare e caratterizzare i correlati di protezione dei linfociti T utilizzando saggi NGS, come l'immunoSEQ di Adaptive Biotechnologies.

I *test sierologici* possono essere condotti in parallelo in questi volontari per ottenere ulteriori approfondimenti sulla correlazione dell'immunità umorale e cellulare. L'evidenza suggerisce che lo studio della risposta cellulare alla SARS-CoV-2 potrebbe consentire la stratificazione del rischio tra gli individui poiché isoliamo le variabili che contribuiscono all'aumento della morbilità e della mortalità

I progressi nelle tecnologie di test molecolari basate sui linfociti T consentono la valutazione della più ampia risposta **immunitaria adattativa**, possono migliorare la messaggistica per future campagne di vaccinazione e possono aiutare a informare e accelerare le strategie di salute pubblica.

Viatico: la comprensione dei ruoli specifici e complementari della risposta **immunitaria adattativa** a SARS-CoV-2 ridurrà ulteriormente la nostra vulnerabilità a un virus che ha dimostrato di essere un formidabile avversario.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 1 giugno 2021

Quando, il maiale sbagliato incontrò il pipistrello sbagliato e poi l'uomo sbagliato

Questa settimana, i diplomatici di tutto il mondo si incontrano a Ginevra, in Svizzera, come parte di un raduno annuale degli Stati parte per la Convenzione sulle armi biologiche (BWC). La BWC ha un mandato importante: proibisce ai 182 paesi che hanno firmato e ratificato la convenzione di sviluppare, produrre e immagazzinare armi biologiche. Il BWC, e la comunità di biosicurezza in generale, è stato storicamente più incentrata sul controllo di patogeni esistenti con chiaro potenziale per essere usati come armi biologiche, come l'antrace e gli agenti che causano il botulismo e febbre Q . Inoltre, gli esperti di sicurezza sanitaria sono preoccupati per la prossima "grande pandemia globale".

Le malattie pandemiche sono spesso zoonotiche , nel senso che passano dagli animali all'uomo. Malattie zoonotiche come Ebola , Zika , SARS e HIV vengono create quando, ad esempio, il "maiale sbagliato" incontra il "pipistrello sbagliato" per poi incontrare un fragile uomo sbagliato . L'insorgenza di tali malattie dipende molto da mutazioni genetiche spontanee e da fattori circostanziali. Quindi, ecco un pensiero spaventoso: possibili pandemie future potrebbero non dipendere dall'incontro casuale di diverse specie animali e mutazioni casuali, ma potrebbero invece essere progettate deliberatamente. Nuovi strumenti nel campo della biologia sintetica potrebbero dotare gli scienziati della spaventosa capacità di progettare e produrre agenti patogeni estremamente pericolosi , scavalcando la selezione naturale. La minaccia è molto nella mente dei funzionari della sicurezza.

Lo scorso maggio, il Johns Hopkins Center for Health Security (CHS) ha condotto un esercizio che ha coinvolto ex senatori statunitensi e funzionari del ramo esecutivo su come il paese avrebbe risposto a un focolaio internazionale di un agente patogeno ingegnerizzato. In questo scenario immaginario , un gruppo terroristico aveva costruito un virus che era sia mortale che altamente contagioso. A più di un anno dall'inizio della pandemia inventata, il bilancio delle vittime in tutto il mondo ha superato i 150 milioni , il Dow Jones è diminuito del 90% e c'è stato un esodo di massa dalle città in mezzo a carestie e disordini. Negli ultimi decenni le biotecnologie hanno avuto una crescita super-esponenziale: Solo 75 anni fa, non eravamo nemmeno sicuri che il DNA fosse il materiale principale che governa l'ereditarietà genetica. Oggi siamo in grado di leggere , scrivere e modificare genomi con sempre maggiore facilità. Ma le biotecnologie sono a duplice uso : possono essere utilizzate sia nel bene che nel male . Temiamo che, anche con le sole capacità attuali , una pandemia ingegnerizzata possa unirsi al crescente elenco di cambiamenti sismici resi possibili dai progressi biotecnologici.

Ricercatori sufficientemente capaci potrebbero lavorare per resuscitare gli agenti patogeni più mortali del passato, come il vaiolo o l'influenza spagnola , o modificare gli agenti patogeni esistenti come l'influenza

aviaria per essere più contagiosi e letali. Man mano che le tecnologie di ingegneria del genoma diventano più potenti e onnipresenti, gli strumenti necessari per apportare queste modifiche diventeranno sempre più accessibili. Ciò porta allo spettro terrificante di ricercatori indipendenti che intenzionalmente (o non intenzionalmente) progettano agenti patogeni con il potenziale di infliggere danni peggiori delle pandemie più letali della storia. Attualmente nessun vincolo fisico o biologico preclude o esclude la costruzione di tali potenti armi biologiche.

Secondo l'esperto di biosicurezza Piers Millett, "Se stai deliberatamente cercando di creare un agente patogeno che è mortale, si diffonde facilmente e che non disponiamo di adeguate misure di salute pubblica per mitigare, allora quella cosa che crei è tra le cose più pericolose sul pianeta." Mitigare questo rischio si preannuncia essere una delle principali sfide del 21° secolo, non solo perché la posta in gioco è alta, ma anche a causa della miriade di ostacoli che si frappongono tra noi e una soluzione. Le tecnologie attuali che hanno portato alla costruzione dei "salvici vaccini" e tutte le tecnologie che ci aiutano potrebbero anche farci molto male. Le pandemie naturali possono essere orribili e coglierci completamente alla sprovvista. Ad esempio, sono trascorsi tre anni tra i primi casi di AIDS ufficialmente documentati negli Stati Uniti nel 1981 e l'identificazione dell'HIV come causa. Ci sono voluti altri tre anni per sviluppare e approvare il primo farmaco contro l'HIV. Mentre i trattamenti antiretrovirali ora consentono a coloro che vivono con l'HIV di gestire la malattia in modo efficace (cioè, se possono permettersi il trattamento), ci manca ancora un vaccino contro l'HIV promettente.

Tuttavia, per quanto male equipaggiati possiamo essere pronti per combattere i nuovi patogeni naturali emergenti, ma siamo ancora meno preparati a far fronte ai patogeni ingegnerizzati. Nei prossimi decenni, potrebbe diventare possibile creare agenti patogeni che non rientrano nella gamma di agenti infettivi che la medicina moderna ha imparato a rilevare, trattare e contenere. Peggio ancora, gli ricercatori malintenzionati potrebbero costruire microbi patogeni con funzionalità strategicamente adattate per contrastare le misure di sicurezza sanitaria esistenti. Quindi, mentre i progressi nel campo della biologia sintetica ci renderanno più facile inventare terapie e altre tecnologie che possono difenderci dalle pandemie, quegli stessi progressi potrebbero consentire a ricercatori ufficiali e non di progettare agenti patogeni sempre più dannosi.

Ad esempio, nuove tecnologie di sintesi genica messe a punto per la creazione degli attuali vaccini, consentendo la produzione automatizzata di sequenze di DNA più lunghe da zero. Questo sarà un vantaggio per la ricerca biomedica di base e applicata, ma semplificherà anche l'assemblaggio di agenti nuovi patogeni artificiali. Rispetto ad altre armi di distruzione di massa, gli agenti patogeni ingegnerizzati richiedono meno risorse. Sebbene i malintenzionati attualmente necessitino di laboratori e risorse di livello universitario per crearli, un ostacolo maggiore tende ad essere l'accesso alle informazioni. I limiti della nostra conoscenza della biologia vincolano il potenziale di qualsiasi sforzo di bioingegneria. Alcune informazioni, come lavorare abilmente con una specifica macchina o tipo di cella, possono essere acquisite solo attraverso mesi o anni di formazione supervisionata.

Altre informazioni, come le sequenze annotate del genoma del patogeno, possono essere facilmente accessibili tramite database pubblici, come quelli gestiti dal National Center for Biotechnology Information. Se informazioni come le sequenze del genoma dei patogeni o i protocolli di biologia sintetica sono disponibili online, ciò potrebbe rendere molto più facile per i malintenzionati costruire i propri agenti patogeni. Ma anche se non sono online, gli hacker possono anche rubare informazioni sensibili dai database di aziende biotecnologiche, università e laboratori governativi. Prevenire i danni da agenti patogeni ingegnerizzati è complicato dal fatto che basta un solo errore, un gruppo terroristico pieno di risorse o uno stato-nazione canaglia per provocare il caos su larga scala. Anche se la maggior parte degli scienziati e dei paesi seguono protocolli adeguati, un singolo attore unilaterale potrebbe mettere in pericolo la civiltà umana....

(Per continuare vai all'originale)