

19. aprile

## Le vescicole extracellulari derivate dal latte proteggono l'integrità della barriera intestinale nell'asse intestino-fegato

*Il gatto lecca raggi di luna nella scodella dell'acqua,  
pensando che siano latte.  
Proverbio indù*

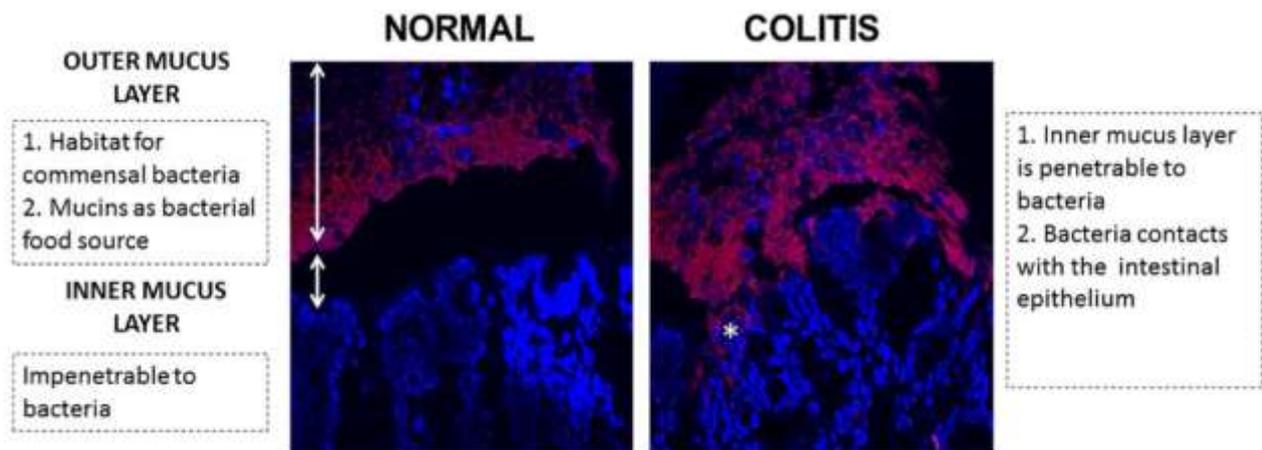
La barriera intestinale funge da filtro selettivo per consentire la traslocazione di nutrienti essenziali nel flusso sanguigno, impedendo il passaggio di entità dannose

La *disfunzione* della barriera intestinale può causare "**leaky gut**" (o iperpermeabilità intestinale), che è stata associata alla gravità della malattia nella malattia infiammatoria intestinale e nelle malattie metaboliche, tra cui la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e la steatoepatite non alcolica (NASH).

Miele [Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2009 Jun;49\(6\):1877-87.](#)

Lo strato di muco intestinale, un gel idratato formato da **mucine secrete** dalle cellule epiteliali, costituisce la prima linea di difesa per prevenire l'esposizione diretta dell'epitelio a microrganismi intestinali, enzimi e acidi digestivi, particelle alimentari digerite, sottoprodotti microbici e tossine  
Johansson ME et al. [The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 30;105\(39\):15064-9.](#)

**Mucin and IBD Research Teams, Mucosal Diseases Program, del Mater Medical Research Institute dell'Università di Queensland**, Ha dimostrato come La produzione difettosa di muco predispone gli animali alla colite e al cancro del colon-retto



Heazlewood CK et al Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. PLoS Med. 2008 Mar 4;5(3):e54.

L'epitelio intestinale, composto da un singolo strato di cellule epiteliali strettamente collegate, forma sia una barriera fisica che un centro di coordinamento tra i batteri intestinali e il sistema immunitario dell'ospite

Allaire JM et [The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. Trends Immunol. 2018 Sep;39\(9\):677-696.](#)

Le cellule epiteliali adiacenti formano giunzioni strette con proteine a giunzione stretta, tra cui Occludin, zonula occludens (ZO) e molecole di adesione giunzionale (JAM), per fornire forti legami adesivi e mantenere l'integrità della barriera intestinale.

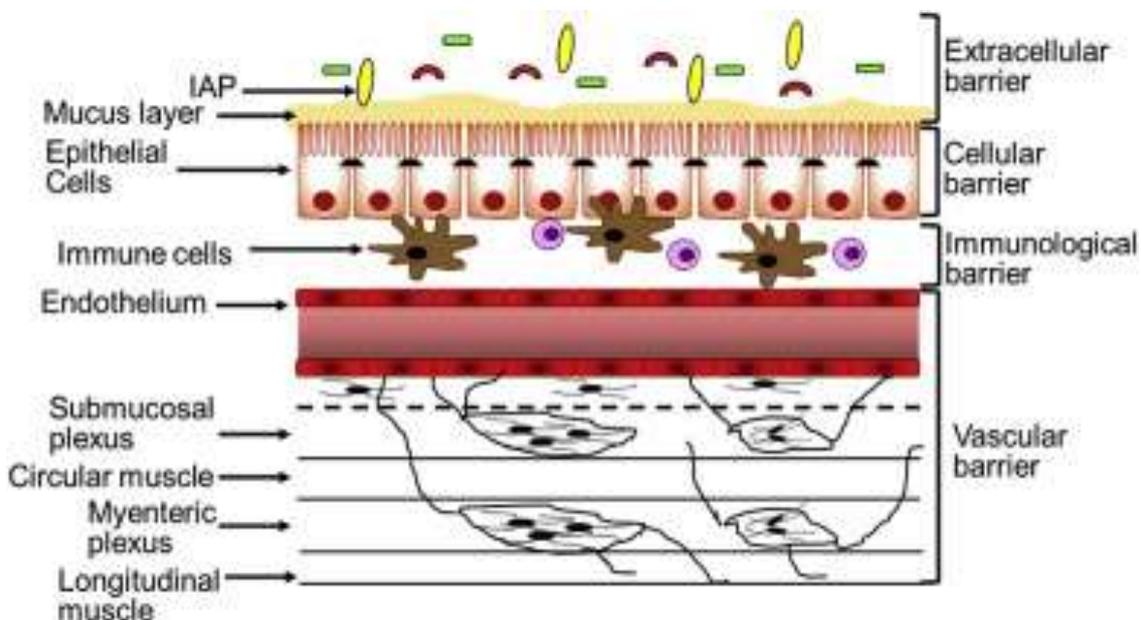
*Chelakkot C et al Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp Mol Med. 2018 Aug 16;50(8):1-9. doi: 10.1038/s12276-018-0126-x. PMID: 30115904; PMCID: PMC6095905.*

Le cellule immunitarie della lamina propria (LP) funzionano come la principale barriera immunitaria dell'intestino

*Peterson LW et al. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nat Rev Immunol. 2014 Mar;14(3):141-53.*

Se i patogeni attraversano l'epitelio intestinale, i segnali immunoregolatori delle cellule epiteliali intestinali dirigono le risposte difensive delle cellule immunitarie che coinvolgono le [cellule T regolatorie \(T<sub>reg</sub>\)](#) e le [cellule T helper 2 \(T<sub>H2</sub>\)](#) (7).

Tutti e tre gli strati della barriera intestinale sono complementari e la disfunzione di qualsiasi strato può innescare una risposta immunitaria incontrollabile nel microambiente intestinale e causare traslocazione batterica. La fuoriuscita di batteri o dei loro metaboliti (soprattutto endotossine) nella circolazione a causa dell'integrità della barriera intestinale interrotta può rendere l'ospite suscettibile all'infiammazione intestinale e/o peggiorare varie malattie non intestinali, come il diabete, le malattie neurologiche e la NAFLD o la sua forma più grave, NASH



da Siddhartha S. Ghosh Intestinal barrier function and metabolic/liver diseases

Pertanto, il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale offre una potenziale strategia terapeutica per molteplici malattie metaboliche.

Le **vescicole extracellulari (EV)** sono vescicole di dimensioni nanometriche secrete dalle cellule e coinvolte in vari processi biologici praticamente in tutti gli organismi

*Escudé Martinez de Castilla P et al **Extracellular vesicles as a drug delivery system: A systematic review of preclinical studies.** Adv Drug Deliv Rev. 2021 Aug;175:113801.*

A causa del loro arricchimento di contenuti bioattivi come proteine immunoregolatorie e microRNA, gli EV sono stati implicati nelle risposte immunitarie intestinali e nel mantenimento della funzione di barriera

*Bui TM et al **Extracellular vesicles regulate immune responses and cellular function in intestinal inflammation and repair.** Tissue Barriers. 2018;6(2):e1431038.*

Tuttavia, gli EV secreti dalla maggior parte delle cellule **non sono in grado di sopravvivere** al duro ambiente gastrico per raggiungere l'intestino

*Samuel M det al. **Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles induces senescence in the primary tumor but accelerates cancer metastasis.** Nat Commun. 2021 Jun 24;12(1):3950.*

Al contrario, i VE derivano dal cibo, come verdura, frutta e latte sono stati segnalati come in grado di raggiungere l'intestino dopo somministrazione orale ed esercitare effetti terapeutici sull'infiammazione intestinale. Pertanto, le vescicole derivate dal cibo hanno recentemente suscitato interesse clinico nella loro potenziale applicazione come terapia orale (NCT01294072 e NCT01668849; <https://clinicaltrials.gov/> ).

**Il team del College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, ha dimostrato che gli EV derivati dal latte bovino (mEV) migliorano l'immunità intestinale nei topi sani e ripristinano il microbiota intestinale nella colite**

Tuttavia, rimane sconosciuto se i mEV possano o meno ripristinare l'integrità della barriera intestinale nella malattia infiammatoria intestinale e nella NAFLD/NASH.

**Nel report :**

Tong L et al

**Milk-derived extracellular vesicles alleviate ulcerative colitis by regulating the gut immunity and reshaping the gut microbiota.**

*Theranostics. 2021 Jul 25;11(17):8570-8586.*

in questo studio sono stati caratterizzati i mEV bovini e umani, e valutata la loro attività antinfiammatoria e gli effetti protettivi sulle proprietà della barriera epiteliale intestinale in vitro e valutato, sia ex vivo che in vivo, se sono rimasti intatti e hanno mantenuto la bioattività dopo il passaggio attraverso il tratto gastrointestinale superiore.

Inoltre sono stati definiti gli effetti protettivi dei mEV sull'integrità della barriera intestinale e la potenziale attività terapeutica in due modelli murini indotti da destrano solfato di sodio (DSS) di malattia infiammatoria del colon (colite acuta e cronica) e un modello murino di NASH indotto dalla dieta. I nostri risultati dimostrano che i mEV proteggono l'integrità della barriera intestinale a più livelli.

## Discussione:

Il latte materno è fondamentale per lo sviluppo del sistema digestivo dei neonati, compresa l'immunità intestinale e il microbiota. Diversi fattori nutrizionali derivati dal latte sono stati proposti per regolare la funzione della barriera intestinale in un sistema organoide intestinale in vitro; tuttavia, i componenti attivi e i loro meccanismi di azione in vivo rimangono poco chiari.

La somministrazione orale di mEV bovini potrebbe regolare l'immunità intestinale e il microbioma sia nella salute che nell'infiammazione intestinale acuta nei topi

In questo studio, mEV migliorano l'integrità della barriera intestinale sopprimendo l'infiammazione intestinale, migliorando le giunzioni strette epiteliali intestinali e promuovendo la secrezione di muco, sia nella colite indotta da sostanze chimiche che nella NASH indotta dalla dieta come riportato nella figura che segue

La somministrazione orale di mEV non solo ha migliorato localmente l'infiammazione del colon, ma ha anche alleviato a distanza la patologia epatica della NASH. Mentre i meccanismi dettagliati restano da chiarire, tuttavia complessivamente confermano il ruolo fondamentale dell'integrità della barriera intestinale nella NASH.

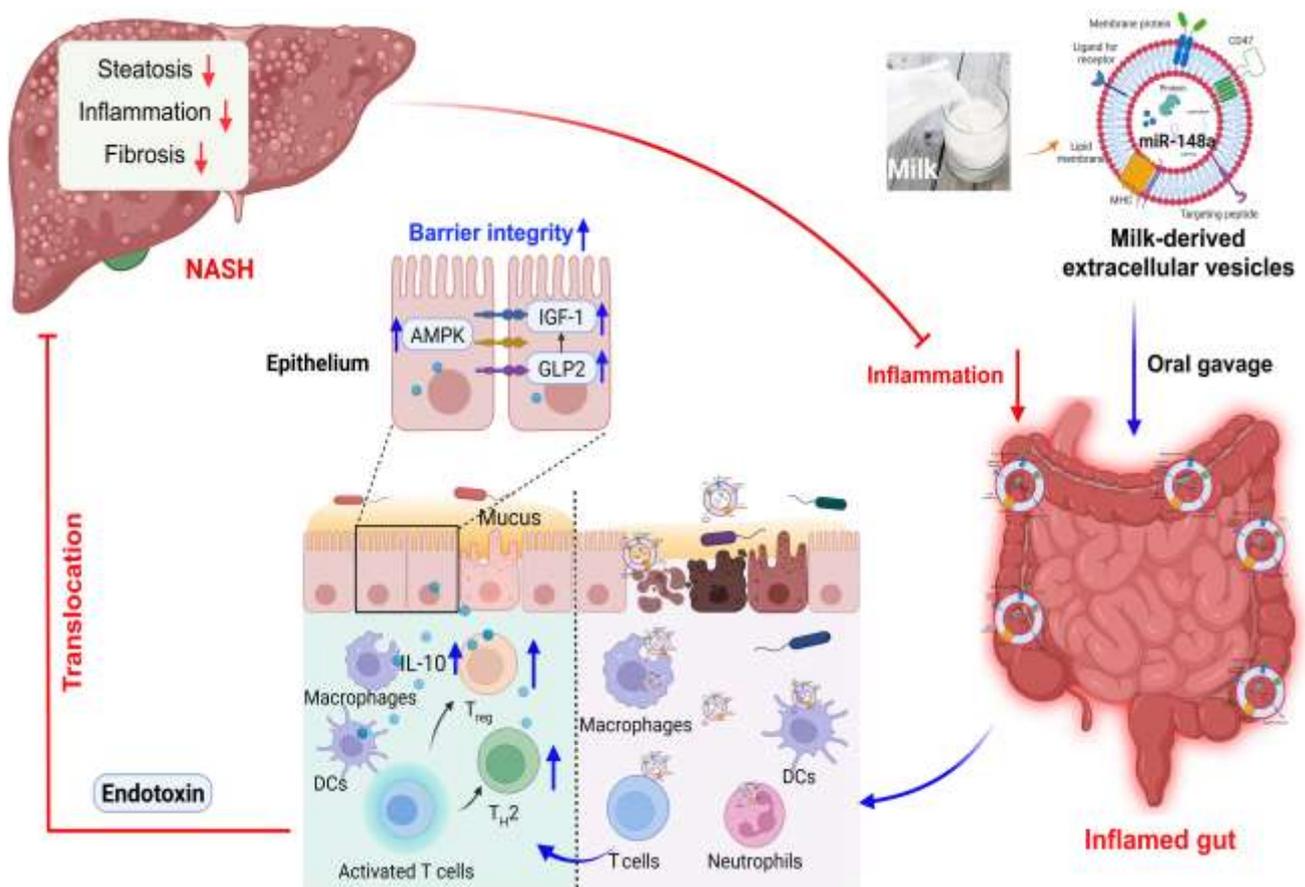


Illustrazione schematica dei potenziali meccanismi attraverso i quali le vescicole extracellulari derivate dal latte (mEV) proteggono l'integrità della barriera intestinale nell'asse intestino-fegato. I mEV proteggono l'integrità della barriera intestinale rinforzando le giunzioni strette epiteliali intestinali, sopprimendo l'infiammazione e inibendo la traslocazione dell'endotossina dall'intestino nel flusso sanguigno e nel fegato, migliorando così la malattia infiammatoria intestinale e la steatoepatite non alcolica (NASH).

I risultati indicano che la somministrazione orale di mEV, ma non di surnatante di latte impoverito di EV, ha migliorato l'integrità della barriera intestinale nell'infiammazione intestinale acuta e cronica indotta da sostanze chimiche e nella NASH sperimentale indotta dalla dieta. I mEV hanno efficacemente soppresso le risposte infiammatorie intestinali eccessive e migliorato l'integrità della barriera intestinale modulando le cellule immunitarie LP, aumentando le proporzioni di macrofagi residenti intestinali e T regcellule e la produzione di IL-10, attivando così la via AMPK, rinforzando le giunzioni strette epiteliali e aumentando la produzione di mucina.

Da notare che per ottenere quantità efficaci di mEV, un adulto umano potrebbe aver bisogno di consumare 1 litro di latte al giorno, il che è particolarmente impegnativo per chi è intollerante al lattosio.

Data la presenza di *lattosio e triacilglicerolo a catena lunga* nel latte, che possono esacerbare i sintomi della malattia infiammatoria intestinale si è tentati di ipotizzare che una formula nutrizionale medica integrata con mEV invece del latte intero promuova la salute intestinale e migliori l'infiammazione intestinale e le relative malattie. In conclusione, in quanto nanoparticelle naturali e commestibili, i mEV esercitano una forte attività terapeutica nell'infiammazione intestinale e nei disturbi epatici attraverso il presunto asse intestino-fegato.

## **Glossario pandemico essenziale (M-N-O-P-R-S-TV-W)**

### **M**

#### **MASCHERAMENTO UNIVERSALE**

La lunga sopravvivenza ambientale di SARS-CoV-2, l'elevata percentuale di pazienti asintomatici o lievemente sintomatici, il picco della carica virale prima o al momento della presentazione e quindi la sua elevata trasmissibilità giustifica un mascheramento universale, un'igiene diligente delle mani e rigorose misure di distanziamento sociale per un controllo efficace prima che l'immunità di gregge sia costruita dalla vaccinazione.

#### **MEMBRANA IALINA**

è stata attribuita a un aumento della permeabilità vascolare (definita come "tempesta di bradichinina") e all'accumulo di acido ialuronico nello spazio alveolare, portando all'intrappolamento di un volume elevato di acqua. Inoltre, in uno studio di profilazione dell'antigene extracellulare ad alto rendimento sono stati trovati autoanticorpi sierici diretti contro molte proteine immunomodulatorie tra cui citochine, chemochine, componenti di attivazione del complemento e proteine della superficie cellulare che possono aumentare il danno tissutale per deposizione di immunocomplessi e complemento. Questi autoanticorpi possono anche compromettere la funzione immunitaria e il controllo virologico inibendo la segnalazione degli immunorecettori. La presenza di questi autoanticorpi, compresi quelli contro gli interferoni, è fortemente associata alla gravità della malattia. MISTE (popolazioni virali) Oltre alla diversità genetica tra gli ospiti, all'interno di un singolo paziente possono essere presenti popolazioni virali miste. Una variante inizialmente presente a bassa frequenza in un individuo può diventare la popolazione virale predominante nel corso della malattia. Esempio: la proteina S W152L in un paziente con malattia grave. In uno studio che ha analizzato i genomi virali di pazienti in Austria, è stato riscontrato che una variante minore intra-ospite viene trasmessa ad altri e diventa la variante virale predominante in un altro paziente.

### **N**

#### **NEXSTRAIN (lignaggio/clade)**

è diviso in 19 (A, B) e 20 (AJ) secondo l'anno e l'ordine in cui è emerso il clade. Il lignaggio Pango, proposto per la prima volta nel luglio 2020, è un sistema dinamico, che tiene conto se il lignaggio si sta attivamente diffondendo o meno

### **NOMENCLATURA (virale)**

SARS-CoV-2 si è evoluto in diversi clade e lignaggi. Attualmente, ci sono tre principali sistemi di nomenclatura per i diversi cladi o lignaggi. I sistemi GISAID e Nextstrain sono stati utilizzati dall'inizio della pandemia e i clade o lignaggi sono definiti da mutazioni distintive. Sebbene le nomenclature GISAID e Nextstrain siano utili per comprendere l'evoluzione del virus su scala macroscopica, questi sistemi non sono in grado di delineare informazioni più dettagliate sui cluster di focolai. ORF8 (proteina) è una proteina unica in SARS-CoV-2 e risulta essere immunogenica. Tuttavia, sono stati identificati frequentemente mutanti eliminati o troncati da ORF8. In uno studio di Singapore, i pazienti infettati da mutanti eliminati da ORF8 hanno una malattia più lieve rispetto a quelli infettati da SARS-CoV-2 wild-type. Mutanti deleti di ORF3b sono emersi anche con la mutazione D614G. Il troncamento di ORF3b conferisce la perdita della sua funzione di antagonismo dell'interferone ORF10. Sembra essere "superfluo" per l'infezione cellulare. Le fasi del ciclo di replicazione di SARS-CoV-2 sono state rapidamente dedotte dai dati empirici e dalla conoscenza esistente di altri betacoronavirus. Il primo passo nell'infezione cellulare da SARS-CoV-2 è il legame della proteina S ai fattori di ingresso della superficie della cellula ospite come il recettore ACE2 associato alla membrana e solubile che può essere preceduto da un legame più debole della proteina S all'attaccamento a fattori come l'eparan solfato ORF1a-ORF1b (giunzione). Ha una struttura pseudonodata fondamentale per il frameshifting ribosomiale programmato e la traduzione della poliproteina ORF1ab. Il 3' UTR ha il motivo s2m, ottanucleotide conservato e molte pieghe inaspettate. **ORIGINE (virale)** L'origine di SARS-CoV-2 è ancora sconosciuta.

### **P**

#### **PANGO**

(lignaggio/clade) Il sistema del lignaggio Pango ha una risoluzione molto più fine rispetto a GISAID o Nextstrain ed è particolarmente utile per catturare l'emergere di nuove varianti.

### **R**

#### **RADIOGRAFIA TORACE**

La radiografia del torace o la TC del polmone hanno mostrato tipicamente opacità bilaterali multifocali e periferiche a vetro smerigliato che possono deteriorarsi fino a un consolidamento denso nella malattia progressiva. Le anomalie radiologiche di solito raggiungono il picco entro 2 settimane dall'esordio dei sintomi e sono sostituite da fibrosi con il recupero.

**RACCOLTA DEI CAMPIONI** La carica virale nel tratto respiratorio è massima all'inizio dei sintomi o subito dopo e diminuisce a una velocità di 1 log<sub>10</sub> a settimana. Il test dell'aspirato nasofaringeo, del tampone nasofaringeo o del tampone faringeo è adeguato per le infezioni allo stadio iniziale, in particolare per le infezioni asintomatiche o lievi del tratto respiratorio superiore. I pazienti con sintomi del tratto respiratorio inferiore dovrebbero inviare espettorato per migliorare la sensibilità. Sebbene il lavaggio broncoalveolare (BAL) abbia mostrato il più alto tasso di positività tra i diversi campioni respiratori, è indicato solo in quelli con grave coinvolgimento delle basse vie respiratorie quando i campioni nasofaringei e della gola sono risultati negativi. La secrezione orofaringea posteriore (POS) o saliva della gola profonda è sempre più studiata in quanto rappresenta un pool di secrezioni nasofaringee, orofaringee e delle basse vie respiratorie posteriori durante la posizione supina durante il sonno, se assunta la mattina presto prima di colazione e sciacquare la bocca. Può essere raccolto autonomamente dai pazienti con istruzioni, riducendo il disagio del paziente, aggirando la carenza di tamponi e riducendo al minimo l'esposizione all'aerosol per gli operatori sanitari. Il costo della raccolta del POS potrebbe essere 2,59 volte inferiore rispetto al campione nasofaringeo. La sensibilità è paragonabile a quella del tampone nasofaringeo in campioni opportunamente raccolti da pazienti che hanno collaborato. La sensibilità non varia molto tra la mattina presto e almeno 2 ore dopo il pasto. Per i campioni non delle vie aeree, la diffusione virale mediante RT-PCR è stata riscontrata nel materiale fecale nel 40,5% dei pazienti dopo la prima settimana di insorgenza dei sintomi e potrebbe persistere per 3 settimane o più. La presenza di RNA virale nel sistema fognario può fornire un modo

economico e non invasivo per monitorare la diffusione della malattia all'interno della comunità e può fungere da sistema di allerta precoce per la popolazione che non ha accesso all'assistenza sanitaria. Il virus avvolto ha affinità con i biosolidi che possono consentire il test dei fanghi negli impianti di trattamento delle acque reflue con una sensibilità migliore rispetto al test dell'affluente. Il campionamento composito è utilizzato nella maggior parte degli studi. Il campione di liquame deve essere concentrato seguito da un'efficiente estrazione dell'RNA per prevenire l'inibizione dei saggi molecolari. L'RNA virale può essere rilevato anche nel sangue in circa il 30% dei pazienti gravi, ma il tasso di rilevamento è molto più basso nei casi più lievi. Anche senza sintomi oculari, la secrezione congiuntivale può contenere una piccola quantità di RNA SARS-CoV-2 in circa l'8% dei pazienti. L'RNA virale si trova raramente nelle urine. Per accogliere la grande quantità di campioni per lo screening della popolazione asintomatica, il raggruppamento di campioni clinici, fino a 5-30 campioni per pool è una strategia aggiuntiva per far fronte alla carenza di reagenti, a scapito di tempi di elaborazione possibilmente più lunghi e ridotta sensibilità diagnostica del campione debolmente positivo. È efficiente solo quando il numero di campioni positivo atteso è basso poiché il pool positivo richiede un nuovo test individuale. La ripetizione del test strategico di un gruppo definito e l'uso di modelli matematici per stratificare le dimensioni del pool per gruppi di età in base alla rispettiva prevalenza della malattia possono migliorare l'efficienza.

### **RILEVAMENTO ANTIGENE**

Il rilevamento dell'antigene N è abbondantemente espresso in SARS-CoV-2 ed è quindi ampiamente utilizzato come bersaglio per il test dell'antigene COVID-19. Il rilevamento si ottiene catturando l'antigene virale in campioni clinici mediante anticorpi monoclonali fissati su una membrana in saggi immunologici laterali colorimetrici. Sebbene questo test possa essere fornito come POCT in un ambiente ambulatoriale o addirittura non sanitario, ha una bassa sensibilità rispetto ai test RT-PCR, specialmente per campioni con bassa carica virale. In generale, il test dell'antigene è negativo quando i loro valori di Ct sulla RT-PCR quantitativa sono superiori a 25, sebbene i valori di Ct varino con diversi test e condizioni. SARS-CoV-2 (tassonomia) appartiene al genere Betacoronavirus della famiglia Coronaviridae.

Questo genere include anche i patogeni respiratori umani SARS-CoV-1, il coronavirus della sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS) (MERS-CoV), il coronavirus umano (HCoV)-HKU1 e HCoV-OC43. Insieme al coronavirus di pipistrello strettamente correlato RaTG13 e SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 è classificato come membro del sottogenere Sarbecovirus dei coronavirus correlati alla SARS. SARS-CoV-2 (ultrastruttura) mediante microscopia elettronica e NGS ha confermato che condivideva le caratteristiche strutturali e l'organizzazione genomica di altri betacoronavirus.

È un virus con involucro pleomorfo (intervallo di dimensioni: 60-140 nm) tempestato di punte superficiali distintive. Il genoma di RNA a filamento singolo a senso positivo di SARS-CoV-2 ha una dimensione di circa 29-30 kb ed è organizzato come metil-capped-5'UTR-ORF1a/bS-ORF3-EMORF6-ORF7a/b-ORF8 -N/ORF9b-ORF10-3'UTR-poli A coda. SARS-CoV-2 (genoma) Uno dei primi genomi pubblicati, hCoV-19/Wuhan/IVDC-HB-01/2019 (numero di accesso GISAID (EPI\_ISL\_402119), ha una dimensione del genoma di 29.891 bp. Uno studio che utilizza tecniche di profilazione del ribosoma ha mostrato la presenza di ulteriori a monte e interni open reading frames (ORF). Il genoma è privo del gene dell'emoagglutinina esterasi che si trova in alcuni altri betacoronavirus. ORF1ab, che comprende due terzi dell'intero genoma, codifica per una grande poliproteina pp1ab, che viene scissa proteoliticamente in 16 proteine non strutturali (Nsps) critiche per la replicazione virale. Verso l'estremità 3' del genoma, i geni S, E, M e N codificano proteine strutturali chiave trovate nel virione maturo SPIKE (glicoproteina). La glicoproteina spike (S) forma i trimeri sulla superficie del virione e si lega al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) umano per l'ingresso cellulare. Contiene due subunità S1 e S2 con un sito polibasico PRRA alla giunzione, che consente un'efficace scissione da parte della furina e di altre proteasi.

Questo sito di scissione multibasico sembra essere un importante fattore di virulenza che può aumentare la replicazione del virus e il tropismo di più tessuti come nel caso del virus dell'influenza aviaria A(H5N1). Le mutazioni in questo sito possono attenuare la patogenicità nei modelli animali e possono essere un'opzione interessante per la progettazione di vaccini vivi attenuati. Un altro sito di clivaggio, chiamato S2', si trova all'interno della regione S2, ed è clivato dalla serina proteasi 2 transmembrana (TMPRSS2). La proteina S contiene i principali epitopi immunogenici, particolarmente concentrati nel dominio N-terminale (NTD) e

nel dominio di legame del recettore (RBD) della subunità S1, che sono bersagli degli anticorpi neutralizzanti. La proteina dell'involucro (E) probabilmente forma una viroporina, che è importante per l'assemblaggio e il rilascio del virus, ed è anche un presunto determinante della virulenza. La proteina di membrana (M) è una proteina strutturale abbondantemente espressa all'interno dell'involucro lipidico che è anche importante per la morfogenesi virale e la soppressione dell'interferone. Infine, la proteina nucleocapside (N) stabilizza il genoma dell'RNA in un complesso elicoidale] e funge da obiettivo chiave dell'immunità adattativa. SARS-CoV-2 (proteine accessorie) Inoltre, ci sono un certo numero di proteine accessorie, la funzione di alcune delle quali rimane sconosciuta. ORF3a può funzionare come induttore di apoptosi. Sia ORF6 che ORF8 sono coinvolti nell'antagonismo dell'interferone mentre ORF7a può essere coinvolto nell'inibizione della traduzione cellulare. ORF8 può legarsi al recettore A dell'IL-17 (IL17RA) che può modulare la risposta infiammatoria e livelli ematici più elevati di IL17A solubile sono stati associati a una malattia più lieve.

SARS-CoV-2 (attività intracellulare) All'interno della cellula, il virus si libera per rilasciare il suo RNA genomico nel citoplasma per la traduzione. Le poliproteine tradotte pp1a e pp1ab vengono proteoliticamente scisse in singole Nsp, molte delle quali formano il complesso replicasi-trascrittasi. Questi complessi sono localizzati all'interno di vescicole specializzate a doppia membrana (DMV). All'interno del sistema DMV, il complesso opera per replicare l'RNA genomico e trascrivere gli RNA subgenomici, che vengono successivamente tradotti in proteine strutturali. L'assemblaggio virale si verifica all'interno del reticolo endoplasmatico, del Golgi e del complesso intermedio (ERGIC) dove le membrane tempestate di proteine strutturali virali interagiscono con l'RNA genomico virale N-encapsidato. La preattivazione della proteina S da parte della furina proteasi dell'ospite può verificarsi prima che i virus maturi vengano rilasciati dalla cellula mediante esocitosi delle vescicole secretorie.

Come in altri coronavirus, vengono prodotti RNA subgenomici e la maggior parte dell'RNA subgenomico consiste in una sequenza leader nella regione 5' non tradotta del genoma e collegata al gene S o ad altri geni nell'estremità 3'. Quindi, le proteine virali tradotte sono più abbondanti verso l'estremità 3' del genoma, il che può influenzare la sensibilità dei test diagnostici utilizzandole come bersagli per la RT-PCR o il rilevamento dell'antigene. Un'eccezione è l'nsP1, che ha dimostrato di essere altamente espresso ed è risultato essere un bersaglio sensibile per RT-PCR. Il sequenziamento diretto dell'RNA rivela anche la presenza di RNA subgenomici non canonici in cui il punto di rottura 5' si trova all'interno del gene ORF1a. Per quanto riguarda il presunto RNA strutturale trovato in SARS-CoV-2, l'UTR 5' ha diversi stem-loop (SL1-5) che possono essere coinvolti nella mediazione della replicazione virale come in altri betacoronavirus.

## I TEST MOLECOLARI

La reazione a catena della polimerasi della trascrittasi inversa (RT-PCR) è la tecnica più utilizzata. I potenziali bersagli molecolari per SARS-CoV-2 includono proteine strutturali (ad es. S, E, elicasi (hel), N, M e regioni non strutturali come la regione della RNA polimerasi RNA-dipendente (Rdrp) e altri bersagli ORF1ab. Attualmente non vi è consenso su quale gene conferisca le migliori prestazioni diagnostiche. Attualmente, si raccomanda un CoV correlato alla SARS di pipistrello conservato e una regione bersaglio specifica SARS-CoV-2 per mitigare l'effetto della mutazione casuale o della deriva genetica mentre mantenendo la specificità. Tuttavia, le mutazioni possono influenzare la sensibilità di rilevamento mediante RT-PCR. Ad esempio, le mutazioni nel gene S della variante britannica B.1.1.7 hanno portato al fallimento di alcuni primer RT-PCR mirati al gene S. Sono state sviluppate piattaforme commerciali automatizzate e ad alto rendimento per la diagnosi molecolare di SARS-CoV-2. Molecular POCT consente test rapidi vicino al sito di raccolta in aree con scarso supporto di laboratorio. Per migliorare le sensibilità diagnostiche dei saggi molecolari, è stata impiegata una tecnologia basata su CRISPR (short palindromic repeat) cluster regolarmente interspaziati mediante l'accoppiamento con l'enzima Cas. Il sequenziamento dell'arricchimento del bersaglio mediante NGS con tecnologia nanopore o Illumina può svelare l'intero genoma in pochi giorni. La condivisione dei dati genetici facilita il monitoraggio della diffusione della malattia, la comprensione della via di trasmissione della malattia, il monitoraggio dell'evoluzione del genoma virale e l'individuazione di nuove varianti.

## TITOLO ANTICORPALE

La durata esatta del titolo anticorpale neutralizzante sierico rilevabile dopo l'infezione naturale o la vaccinazione attende ancora uno studio di follow-up a lungo termine. Sono stati segnalati casi di reinfezione e non è stato possibile rilevare anticorpi neutralizzanti alla presentazione del secondo episodio di infezione 5 mesi dopo il primo episodio. L'entità e la durata della persistenza delle IgG o dell'anticorpo neutralizzante sono correlate alla gravità del COVID-19 in alcuni studi.

**TRASMISSIONE** La letteratura sull'eterogeneità della trasmissione è scarsa. L'eterogeneità nella dinamica delle malattie infettive, in cui la maggior parte degli individui infetta solo pochi altri mentre un piccolo sottogruppo della popolazione è responsabile della maggior parte dei nuovi casi, è all'ordine del giorno. La storia retrospettiva di 135 casi tra il 21 gennaio e il 26 febbraio 2020 a Tianjin, in Cina, ha mostrato un'eterogeneità di trasmissione significativa con un coefficiente di dispersione di 0,25. Il tasso complessivo di mortalità per infezione (IFR) stimato in Cina era dello 0,66%, che aumentava con l'età. Ciò è simile alla stima IFR dello 0,6% dedotta utilizzando l'IFR corretto sulla nave da crociera Diamond Princess (vedi).

**TRASMISSIONE (vie di)** Si ritiene che SARS-CoV-2 si diffonda prevalentemente tramite aerosol a corto raggio, goccioline respiratorie e contatto diretto o indiretto con goccioline respiratorie infettive. La trasmissione per via aerea di SARS-CoV-2 è stata elegantemente dimostrata nel modello di criceto. Un basso livello di SARS-CoV-2 RNA (concentrazioni in aria fino a  $3,4 \times 10^3$  copie di RNA per m<sup>3</sup> di aria campionata) potrebbe essere rilevato nei campioni di aria ottenuti dall'ambiente che ospita i pazienti COVID-19 anche in assenza di aerosol- procedure di generazione. Il virus SARS-CoV-2 vitale potrebbe essere isolato da campioni di aria raccolti fino a 4,8 m di distanza da pazienti COVID-19 con concentrazioni virali stimate di 6-74 TCID<sub>50</sub>/L di aria a conferma dell'ipotesi che la diffusione per aerosol di SARS-CoV-2 possa servire come fonte di infezione. Grandi quantità di particelle, per la maggior parte inferiori a 5 micron, possono essere emesse durante il normale discorso e la quantità è positivamente correlata con il volume della vocalizzazione. Lo studio aerobiologico ha mostrato che le particelle prodotte nel tratto respiratorio umano rappresentano un continuum di dimensioni invece di una netta distinzione in goccioline respiratorie ( $\geq 5$  micron) o aerosol nell'aria.