



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E  
GASTROENTEROLOGICHE- DISCOG

Direttore: Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

U.O.C GASTROENTEROLOGIA

Direttore: Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

### TESI DI LAUREA

**RISPOSTA ANTICORPALE ALLA VACCINAZIONE ANTI-SARS-COV-2:  
CONFRONTO TRA PAZIENTI CIRROTICI E TRAPIANTATI DI FEGATO**

Relatore: Prof. Francesco Paolo Russo

Laureanda: Silvia Zanella

Anno Accademico 2021/2022



# SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
------------------------	----------

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
-----------------------	----------

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
---------------------------------------	----------

<b>1.1 SARS-COV-2</b> .....	<b>5</b>
-----------------------------	----------

1.1.1 L'inizio della pandemia: .....	5
--------------------------------------	---

1.1.2 La situazione italiana:.....	5
------------------------------------	---

1.1.3 Generalità Coronavirus: .....	8
-------------------------------------	---

1.1.4 Modalità di trasmissione:.....	11
--------------------------------------	----

1.1.5 Le manifestazioni cliniche: .....	12
---	----

1.1.6 Le varianti: <sup>16</sup> .....	14
--	----

1.1.7 Diagnosi: <sup>22</sup> .....	16
-------------------------------------	----

1.1.8 Vaccini: <sup>23</sup> .....	18
------------------------------------	----

1.1.9 Trattamenti: .....	21
--------------------------	----

<b>1.2 CIRROSI EPATICA</b> .....	<b>26</b>
----------------------------------	-----------

1.2.1 Generalità: .....	26
-------------------------	----

1.2.2 Eziologia: .....	26
------------------------	----

1.2.3 Quadro clinico e complicanze: .....	27
---	----

1.2.4 Diagnosi e valutazione del paziente cirrotico: .....	28
--	----

1.2.5 Deficit immunitario cirrosi-associato:.....	30
---	----

1.2.6 Impatto della pandemia:.....	30
------------------------------------	----

1.2.7 COVID e cirrosi .....	31
-----------------------------	----

<b>1.3 TRAPIANTO DI FEGATO:</b> .....	<b>32</b>
---------------------------------------	-----------

1.3.1 Generalità.....	32
-----------------------	----

1.3.2 Indicazioni: .....	32
--------------------------	----

1.3.3 Controindicazioni: .....	34
--------------------------------	----

1.3.4 Score prognostici: .....	34
--------------------------------	----

1.3.5 Terapia immunosoppressiva:.....	35
---------------------------------------	----

1.3.6 Impatto della pandemia.....	36
-----------------------------------	----

1.3.7 COVID nei pazienti trapiantati: .....	37
---	----

1.4 VACCINAZIONE NEI PAZIENTI TRAPIANTATI ED EPATOPATICI .....	38
1.4.1 Generalità.....	38
1.4.2 Vaccinazione nei pazienti trapiantati.....	38
<b>CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 DISEGNO DELLO STUDIO .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 CONTESTO .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 SELEZIONE DEI PAZIENTI.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 RACCOLTA DEI CAMPIONI:.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 ASPETTI ETICI .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPITOLO 4: ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPITOLO 5: RISULTATI.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 DESCRIZIONE DEL CAMPIONE .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 TITOLI ANTICORPALI MEDI .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 ANALISI ACCOPPIATE .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 ANALISI NON ACCOPPIATE.....</b>	<b>55</b>
5.4.1 Trapiantati vs Popolazione sana .....	55
5.4.2 Cirrotici vs Popolazione sana .....	56
5.4.3 Trapiantati vs Cirrotici.....	56
5.4.4 Positivi vs Non Positivi .....	57
<b>5.5 ANALISI STRATIFICATE.....</b>	<b>57</b>
5.5.1 Stratificazione per classi d'età .....	57
5.5.2 Stratificazione per sesso .....	58
5.5.3 Stratificazione per comorbidità .....	59
5.5.4 Stratificazione per terapia immunosoppressiva .....	59

<b>CAPITOLO 6: DISCUSSIONE.....</b>	<b>62</b>
<b>6.1 LIMITI DELLO STUDIO .....</b>	<b>66</b>
<b>6.2 PROSPETTIVE FUTURE .....</b>	<b>66</b>
<b>CAPITOLO 7: CONCLUSIONI.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>68</b>



## RIASSUNTO

**Introduzione:** la pandemia da SARS-CoV-2, esplosa in Cina nel dicembre 2019, ha colpito duramente milioni di persone sconvolgendo la quotidianità in tutto il mondo. Per arginare il numero dei contagi il mondo scientifico ha sviluppato dei vaccini in tempi record sfruttando nuove tecnologie, come quella dei vaccini a mRNA.

Da dicembre 2020 ad oggi sono state somministrate milioni di dosi vaccinali, con lo scopo di ottenere una copertura vaccinale il più ampia possibile.

È importante sottolineare come non tutta la popolazione vaccinata sviluppi una risposta immunitaria solida: infatti, determinate condizioni possono influire negativamente. Ci si aspetta quindi che i pazienti trapiantati di fegato, in cura con terapia immunosoppressiva, e i pazienti con malattia epatica avanzata, con deficit immunitario cirrosi-associato (CAID), sviluppino una risposta immunitaria umorale minore rispetto alla popolazione sana.

**Scopi dello studio:** lo scopo principale dello studio è stato quello di valutare la risposta immunitaria anticorpale in seguito alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 nei pazienti cirrotici e trapiantati di fegato e determinare se questa risposta è comparabile a quella dei controlli sani. Si sono inoltre confrontate le risposte anticorpali tra le due popolazioni target (cirrotici vs trapiantati) e sono stati ricercati i fattori di rischio per la diminuita risposta anticorpale.

**Materiali e metodi:** lo studio ha come promotore l'Università di Oxford e l'Università di Padova è uno dei centri satelliti che ne ha preso parte. Nella coorte di studio patavina sono stati arruolati 71 pazienti trapiantati e 22 pazienti cirrotici. La raccolta dei campioni è avvenuta in 5 timepoint differenti (baseline, post 1<sup>a</sup> dose, 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup> dose).

Gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 sono stati misurati da una piattaforma centralizzata standardizzata che ha rilevato la presenza e la quantità di anticorpi contro le proteine Spike (S) e Nucleocapside (N) del SARS-CoV-2.

**Risultati:** è emerso che al Baseline 9 pazienti avessero già contratto il virus. Al timepoint post 1<sup>a</sup>dose il titolo anticorpale medio è risultato di 3974.71 U/ml per i pazienti trapiantati e di 1219.84 U/ml per i pazienti cirrotici. Al timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, invece, le risposte anticorpali medie della popolazione trapiantata, cirrotica e di controllo sono risultate rispettivamente di 2419.48, 3177.86 e 9136 U/ml. Al timepoint post 3<sup>a</sup> dose il titolo anticorpale è diventato di 13824.32 U/ml per i trapiantati e 19145.75 U/ml per i cirrotici. Da analisi non accoppiate è emerso come post 2<sup>a</sup> dose vi sia una differenza statisticamente significativa tra il titolo anticorpale della popolazione sana e quello delle popolazioni target, diversamente da quanto accade post 3<sup>a</sup> dose, dove la differenza è significativa solamente tra trapiantati e controlli. Analogamente, la differenza tra trapiantati e cirrotici è statisticamente significativa solamente post 2<sup>a</sup> dose e non post 3<sup>a</sup>. Solo 3 pazienti, appartenenti alla popolazione trapiantata, sono rimasti sieronegativi per tutta la durata dello studio.

L'unico fattore di rischio, che è risultato avere una reale influenza sulla risposta anticorpale, è il regime immunosoppressivo nei pazienti trapiantati, in particolare chi assume una terapia immunosoppressiva combinata (terapia spesso includente l'MMF) ha sviluppato, con differenza statisticamente significativa, titoli anticorpali più bassi post 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> dose rispetto ai pazienti in monoterapia (rispettivamente 355.56 e 10501.88 vs 625.96 e 18817.91 U/ml).

**Conclusioni:** lo studio ha dimostrato che entrambe le popolazioni analizzate, post 2<sup>a</sup>dose, hanno sviluppato un titolo anticorpale minore rispetto alla popolazione sana di controllo. Diversamente post 3<sup>a</sup>dose solamente i pazienti trapiantati hanno sviluppato una risposta inferiore rispetto ai controlli.

È emerso inoltre che le risposte anticorpali siano più basse nei pazienti trapiantati rispetto ai pazienti con malattia cirrotica e che i pazienti trapiantati in terapia immunosoppressiva combinata, in particolare i pazienti che assumono MMF, abbiano sviluppato una risposta anticorpale minore rispetto ai pazienti in monoterapia.



## ABSTRACT

**Background:** the SARS-CoV-2 pandemic, that began to circulate among humans in China in December 2019, disrupted daily life around the world.

To contain the number of infections, the scientific world has developed vaccines in record time by exploiting new technologies, such as mRNA vaccines.

From December 2020, millions of vaccine doses have been administered, with the aim of achieving the widest possible vaccination coverage.

However, not all vaccinated population develops a robust immune response; in fact, certain prior conditions may adversely affect it.

Thus, liver transplant patients, under immunosuppressive therapy, and patients with advanced liver disease, with cirrhosis-associated immune deficiency (CAID), are expected to develop a lower humoral immune response than the healthy population.

**Objectives of the study:** the main aim of the study is to determinate the magnitude of the humoral immune response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with cirrhosis and LT recipients and to evaluate whether this response is comparable to that of healthy controls. The antibody responses between the two target populations (cirrhotic vs. transplanted) were also compared, and the presence of any correlations between a decreased response and different factors such as age, sex, comorbidities and type of immunosuppressive therapy were assessed.

**Material and methods:** the study is sponsored by the University of Oxford and the University of Padua is one of the participating satellite centers. 71 LT (liver transplant) recipients and 22 cirrhotic patients were enrolled in the Padua study cohort. Samples were collected at 5 different timepoints (baseline, post 1st dose, 28 days post 2nd dose, 6 months post 2nd dose and post 3rd dose).

Anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies were measured using a standardized centralized platform that measured the presence and amount of serum antibodies to both the Spike (S) and Nucleocapsid (N) antigens of SARS-CoV-2.

**Results:** at Baseline, 9 patients had contracted the SARS-CoV-2 infection. At the post 1<sup>st</sup> dose timepoint the mean antibody titer was 3974.71 U/ml for LT recipients and 1219.84 U/ml for cirrhotic patients. At the 28 days post 2nd dose timepoint, the mean antibody responses of the LT recipients, the cirrhotic patients and control population were 2419.48, 3177.86 and 9136 U/ml, respectively. At the post 3rd dose timepoint, the antibody titer became 13824.32 U/ml for the LT recipients and 19145.75 U/ml for the cirrhotic patients.

Unpaired analyses showed that post 2nd dose, there was a statistically significant difference between the antibody titer of the healthy population and that of the target populations, unlike post 3rd dose, where the difference was significant only between LT recipients and controls. The difference between LT recipients and cirrhotic patients is statistically significant only post 2nd dose and not post 3rd dose.

Only 3 patients, belonging to the transplanted population, remained seronegative. Following stratification by risk factors, the immunosuppressive regimen in the LT recipients influenced the antibody response. LT recipients taking combination immunosuppressive therapy (therapy often including MMF) developed, with statistically significant difference, lower antibody titers post 2nd and 3rd dose than patients on monotherapy (355.56 and 10501.88 vs 625.96 and 18817.91 U/ml, respectively).

**Conclusion:** this study showed that both analysed populations post 2nd dose developed lower antibody titer than the healthy control population. Differently, post 3rd dose only LT recipients developed a lower response than controls. In addition, antibody responses were lower in LT recipients than in patients with cirrhosis. Finally, LT recipients under combination immunosuppressive therapy, particularly patients taking MMF, developed a lower antibody response than patients on monotherapy.

# Capitolo 1: INTRODUZIONE

## 1.1 SARS-CoV-2

### 1.1.1 L'inizio della pandemia: <sup>1</sup>

Le prime informazioni sul nuovo coronavirus hanno iniziato a diffondersi nel dicembre 2019, quando, in Cina, in particolare nella regione di Wuhan, sono stati segnalati i primi casi di polmoniti severe ad eziologia ignota.

Nel gennaio 2020 è stato identificato l'agente virale causante la sintomatologia ed in seguito all'aumento del numero dei contagi e ai primi decessi in Cina, così come in altri stati confinanti tra cui Giappone, Corea e Thailandia, il 30 gennaio 2020 l'OMS ha dichiarato l'emergenza sanitaria di rilevanza internazionale.

Con il passare dei mesi in Cina si sono registrati dei picchi di contagio molto alti ed il governo è stato costretto ad attuare misure di contenimento. Tuttavia, il virus si era già diffuso in maniera esponenziale in molti altri Paesi, tanto che l'OMS l'11 marzo 2020 ha dichiarato quella di SARS-CoV-2 una pandemia.

Il nome inizialmente attribuito al nuovo coronavirus è stato 2019-nCoV (nuovo coronavirus del 2019), in seguito è stato rinominato SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) e la malattia che causa è il COVID-19 (Coronavirus disease 2019).

### 1.1.2 La situazione italiana:

#### Prima ondata:

L'Italia, in particolare nel Nord Italia, è stata uno dei paesi più colpiti: il carico sugli ospedali, in particolare sulle terapie intensive, è stato grandissimo, senza precedenti. <sup>2</sup>

Il 20 febbraio 2020, in provincia di Lodi, è stato diagnosticato il primo caso e il giorno seguente sono stati confermati altri sedici casi in Lombardia e in Veneto, fra cui il primo decesso.

Già il 3 marzo 2020 i casi confermati in Italia erano saliti a 3.089, i decessi a 107 e i pazienti guariti a 276.

Ad aprile 2020 si registravano già più di 130.000 casi e un tasso di mortalità molto alto, con circa 16.500 deceduti.

In questo periodo l'Italia era seconda al mondo come numero di contagi, seconda solo agli Stati Uniti.

Dopo il lockdown di marzo, aprile e maggio, a inizio giugno 2020 i casi totali si aggiravano attorno a 230.000 con circa 34mila deceduti, ma il numero delle persone attualmente positive era sceso drasticamente.

Il 23 giugno si sono registrati solamente 113 nuovi positivi, il minor numero di positivi in 24 ore da quando è iniziata la pandemia.

### **Seconda ondata:**

A fine ottobre 2020, purtroppo, è esplosa la seconda ondata: il giorno peggiore è stato il 13 novembre con nuovi 41.000 positivi.

In Italia verso metà novembre si è superato il milione di persone contagiate, con circa 42mila decessi.

A gennaio 2021 si sono registrati casi di una nuova variante: la variante B117, denominata variante inglese, ha colpito duramente soprattutto la Gran Bretagna.

### **Terza ondata:**

A inizio marzo 2021 è esplosa la terza ondata di contagio che ha visto un calo solo a metà aprile.

Tra maggio e giugno è cresciuta esponenzialmente una nuova variante, soprannominata prima Indiana e poi Delta che ha preoccupato tutto il mondo, Italia compresa.

### Quarta ondata:

A novembre 2021 è iniziata la quarta ondata, con un picco di contagi senza precedenti in particolare a gennaio 2022.

La variante responsabile di questo nuovo picco è Omicron, molto più contagiosa delle precedenti.

Il record dei contagi è avvenuto il 18 gennaio 2022 con ben 228.179 casi e 434 morti in un giorno.

Al 22 giugno 2022 il totale delle persone contagiate in Italia e nel mondo è rispettivamente di 17.959.329 e di 545.869.915.

Per quanto riguarda il numero dei decessi nel mondo sono 6.343.918 e in Italia 167.842.<sup>3</sup>

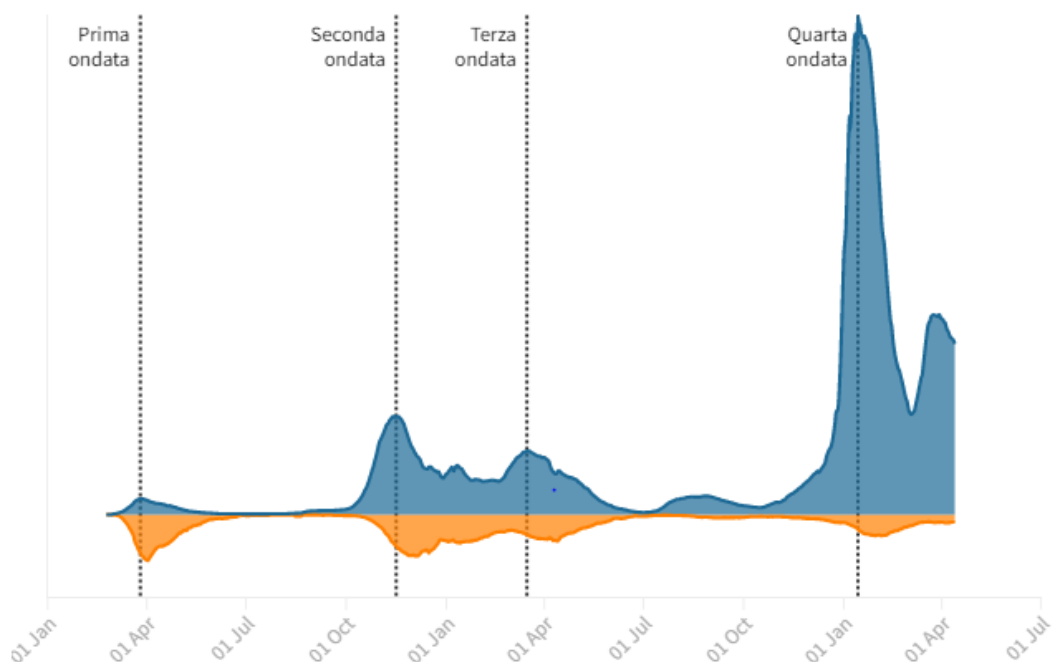


Figura 1<sup>1</sup>

*In blu sono segnati i casi totali, in arancione i decessi: ad un aumento esponenziale dei casi non corrisponde un aumento delle morti.*

### 1.1.3 Generalità Coronavirus:

I coronavirus appartengono alla famiglia dei Coronaviridae, che comprende molte sottofamiglie: la più interessante dal punto di vista medico è quella degli Orthocoronavirinae, la quale è suddivisa a sua volta in molti generi (Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, Deltacoronavirus).<sup>4</sup>

Il virus è ben visibile al microscopio elettronico non solo per le sue dimensioni, avendo un diametro che varia tra 80-220 nm, ma anche per la caratteristica forma dell'envelope.

Il nome "Coronavirus", infatti, deriva dal termine latino corona, a sua volta derivato dal greco κορώνη (korónē, "ghirlanda"), che significa "corona" o "aureola".

Ciò si riferisce alla presenza di proteine anti-Recettore, le proteine Spike, che sporgendo dall'envelope, sembrano formare una coroncina sulla superficie del virus.

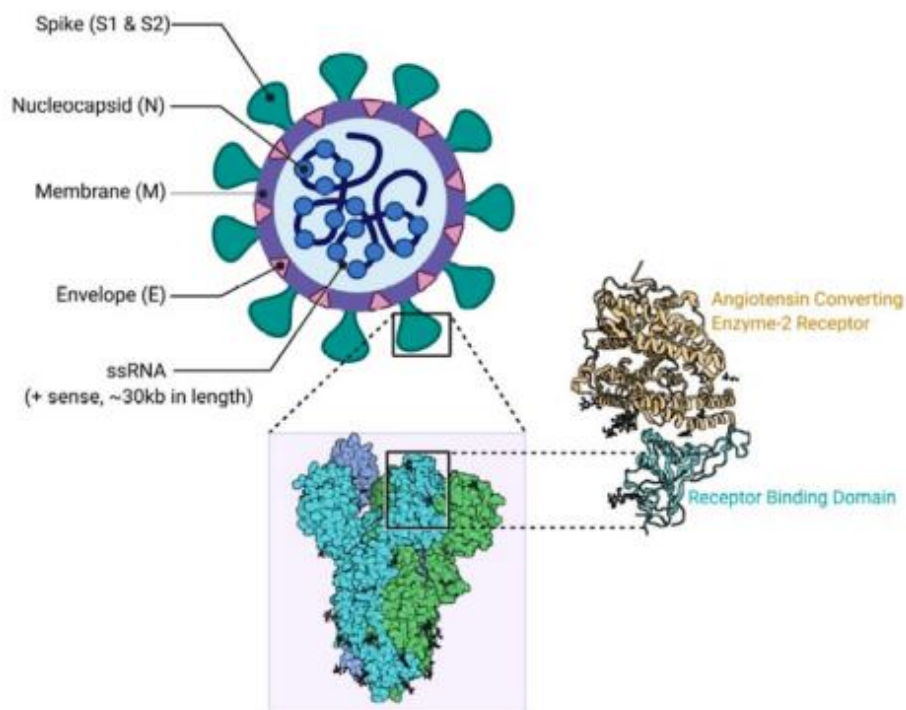


Figura 2<sup>5</sup>

Dal punto di vista strutturale si tratta di virus pleiomorfi provvisti di envelope e solitamente dotati di tre proteine di superficie: la proteina S (Spike protein) anti-

Recettore che media il legame con i recettori cellulari, la proteina M (di matrice) più interna e la Proteina E (emagglutinina/esterasi) non sempre presente.

Più specificamente la proteina S è una glicoproteina di membrana di tipo 1 con domini funzionali diversi a livello delle estremità amminoterminali (S1) e carbossiterminale (S2). Mentre la subunità S2 è una proteina transmembrana, che media la fusione tra le membrane virale e cellulare, S1 è una subunità periferica, coinvolta nel legame del recettore.<sup>5,6</sup>

In generale, la glicoproteina S facilita il legame virale alle cellule sensibili, provoca la fusione cellulare e induce la produzione di anticorpi neutralizzanti.

All'interno del nucleocapside si trova il genoma virale, formato da un singolo filamento di RNA a polarità positiva di grandi dimensioni: con le sue 30kb, rappresenta il genoma a RNA più grande tra i virus a RNA.

Questo genoma interagisce con la nucleoproteina N, che ne permette la condensazione.

Il genoma, inoltre, codifica per molte proteine, in particolare per le poliproteine ORF1a e ORF1b, che vengono successivamente clivate, dando origine a 16 proteine funzionali (non strutturali).

I coronavirus di interesse medico, che possono infettare l'uomo, appartengono ai generi alpha e beta.

I tre coronavirus principali sono senza dubbio il SARS (Severe acute Respiratory Syndrome) – CoV, il MERS (Middle East Respiratory Syndrome) – CoV e il SARS-CoV-2.

Per quanto riguarda il primo si tratta di un virus identificato per la prima volta nella provincia cinese di Quangdong nel novembre 2002 e che si è successivamente diffuso in più di 30 nazioni. A seguito di questo focolaio, sono stati segnalati più di 8000 casi in tutto il mondo, con 774 decessi. Fortunatamente, questa epidemia si è placata e dal 2004 non si sono verificati nuovi casi.

Per quanto riguarda la MERS si tratta di un'epidemia scoppiata nel settembre 2012, causata dal MERS-CoV, che ha colpito specialmente il Medio Oriente.

Questo virus si è diffuso in 27 paesi, infettando 2519 persone e causandone la morte di 866.

L'infezione da parte di questi 3 coronavirus può arrivare a provocare una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) con un tasso di mortalità del 9.6, 34.4 e 1-3%, rispettivamente per SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2. <sup>7</sup>

### SARS-CoV-2:

Si tratta di un beta-coronavirus, la cui sequenza genetica è identica per l'80% a quella del SARS-CoV e per l'50% a quella del MERS-CoV. <sup>8</sup>

Rispetto a questi due coronavirus il SARS-CoV-2 è più contagioso: il suo  $R_0$  è stato stimato essere di 2.2, ovvero una persona infetta ne contagia in media altre 2.2.

$R_0$  rappresenta quindi il numero medio di infezioni secondarie causate da ciascuno individuo infetto in assenza di interventi esterni ed è un parametro molto utile per valutare l'andamento di una pandemia nella fase iniziale.

$R_t$  invece descrive il tasso di contagiosità dopo l'applicazione di misure atte a contenere il diffondersi della malattia.

È chiaro quindi che, affinché la pandemia rallenti,  $R_t$  deve essere minore di 1. <sup>9,10</sup>

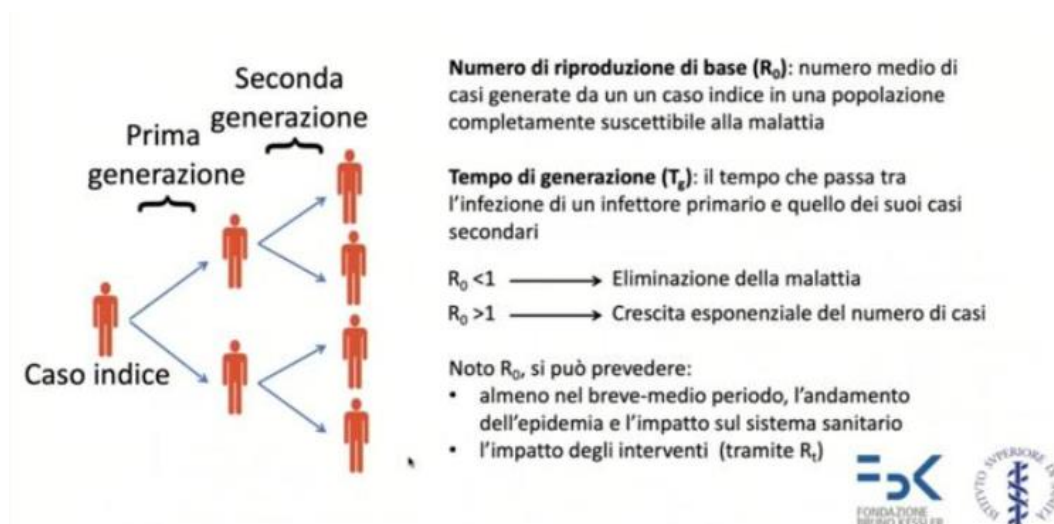


Figura 3 <sup>9</sup>



Ancora non è del tutto chiara l'origine del virus: si pensa sia avvenuta tramite spillover (salto di specie).

Visto che molti dei primi casi di COVID-19 erano collegati al mercato di Wuhan è possibile che l'animale responsabile fosse presente proprio lì e, vista la somiglianza del SARS-CoV-2 con un coronavirus di pipistrello, è molto probabile che questi animali abbiano funto da reservoir.

Il coronavirus RaTG13, campionato da un pipistrello *Rhinolophus affinis*, ha infatti una sequenza genetica identica al 96.2% a quella del SARS-CoV-2.

Si ipotizza inoltre la presenza di un ospite intermedio.

Come il SARS-CoV, il nuovo coronavirus si lega, grazie alla proteina Spike, al recettore cellulare umano ACE2. Si tratta di una proteina di membrana che gioca un ruolo importante nel sistema renina-angiotensina e aldosterone (RAAS).

ACE2 è espressa da un gran numero di cellule del nostro organismo: ad esempio, a livello polmonare, renale, gastrointestinale, cardiovascolare e del sistema nervoso centrale.

Di conseguenza le cellule ACE2-positive sono cellule target e suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2: le manifestazioni cliniche del COVID-19 sono strettamente connesse all'espressione di questo recettore.

#### **1.1.4 Modalità di trasmissione:**

La modalità di trasmissione principale è quella diretta (person-to-person), attraverso goccioline (droplets) respiratorie contenenti il virus, che possono essere starnutite e/o tossite dalla persona infetta. Queste goccioline possono entrare tramite inalazione nei polmoni e infettare le persone vicine. <sup>11</sup>

Oltre alla trasmissione diretta, la contaminazione ambientale è un altro modo per diffondere il virus. È noto come il COVID-19 possa essere diffuso indirettamente: ad esempio se una persona non infetta tocca prima oggetti contaminati da droplets e poi i propri occhi, il naso o la bocca.

Il SARS-CoV-2 può rimanere stabile e infettivo nell'aria per ore. <sup>8</sup> Si è inoltre scoperto che sulle superfici in plastica il virus può rimanere stabile per giorni.

### **1.1.5 Le manifestazioni cliniche:**

Lo spettro delle manifestazioni cliniche del COVID-19 è estremamente ampio: si passa infatti da pazienti completamente asintomatici a pazienti con polmonite virale grave con conseguente insufficienza respiratoria, disfunzione multiorgano, sepsi e morte.

Se da un lato, fortunatamente, la maggior parte dei soggetti infetti presenta una sintomatologia lieve, che può essere gestita a casa, dall'altro, vi è una minoranza che necessita di ricovero in terapia intensiva.

Il tempo medio di incubazione è di circa 5 giorni dopo l'esposizione e tutte le età sono suscettibili all'infezione.

La gravità e il rischio di decesso sono però maggiori negli anziani e nei soggetti con comorbidità preesistenti come diabete, ipertensione, obesità e malattie polmonari e cardiovascolari.

Tra i sintomi più comuni del COVID-19 si registrano tosse secca, febbre, mialgia, affaticamento, mal di testa, produzione di espettorato e diarrea.

Comunemente riportate sono anche anosmia (perdita dell'olfatto) e ageusia (perdita del gusto).<sup>12</sup>

Per quanto riguarda la dispnea, sintomo tipico della malattia severa, se ne osserva la comparsa in media 8 giorni dopo il contagio.

A differenza delle varianti precedenti, Omicron causa prevalentemente sintomi a livello delle alte vie respiratorie: tra i sintomi principali vi sono infatti rinorrea e mal di gola.<sup>13</sup>

Le manifestazioni si dividono principalmente in polmonari ed extrapolmonari.<sup>14,14</sup>

Fanno parte del secondo gruppo le manifestazioni cardiovascolari, renali, neurologiche, psichiatriche, dermatologiche, endocrinologiche e gastrointestinali.

**Manifestazioni gastrointestinali:**

Per quanto riguarda le manifestazioni gastrointestinali i sintomi più comunemente riportati sono diarrea, nausea, anoressia, vomito, dolori addominali e sanguinamenti.<sup>14</sup>

È inoltre emerso come i sintomi gastrointestinali siano prevalenti nella malattia severa.

Evidenze dell'infezione gastrointestinale da SARS-CoV-2 sono state fornite dall'isolamento dell'RNA virale a livello delle cellule gastrointestinali. Questo significa che il SARS-CoV-2 può colpire direttamente queste cellule, specialmente quelle gastriche ed intestinali, con conseguente risposta infiammatoria: lo stormo citochinico sta infatti alla base della sintomatologia.

Come noto il SARS-CoV-2 entra nelle cellule grazie al recettore ACE2, che è stato scoperto essere, appunto, abbondantemente espresso nelle cellule sopracitate.

**Manifestazioni epatiche:**

Circa il 60% dei pazienti con infezione sviluppa danno epatico, con possibilità di detectare il virus a livello del tessuto epatico.

Nella maggior parte dei casi sono stati trovati moderati incrementi dei livelli di ALT (alanina aminotransferasi), AST (aspartato aminotransferasi) e GGT.

Incrementi rilevanti di AST, ALT e bilirubina totale, così come bassi livelli di albumina nel siero sono stati osservati prevalentemente in pazienti affetti da malattia severa. Inoltre, in questi pazienti più compromessi si è osservata l'attivazione della coagulazione e della fibrinolisi, accompagnata da trombocitopenia.

Il danno epatico può essere aggravato dalla severità dell'infezione da SARS-CoV-2 e per questo il grado di danno epatico potrebbe essere utilizzato come indicatore della progressione della malattia.

Il fegato può venir compromesso dal COVID-19 attraverso molti meccanismi: danno a livello cellulare virus-correlato, risposta immunitaria disorganizzata, danno epatico farmaco-indotto (DILI) e disfunzione epatica ischemica in un contesto di insufficienza multiorgano.<sup>15</sup>

Studi preesistenti hanno mostrato come ACE2 sia abbondantemente espresso a livello degli epatociti, delle cellule endoteliali epatiche, ma soprattutto a livello delle cellule del dotto biliare (59.7%). Poiché quest'ultime giocano un importante ruolo nella difesa immunitaria e nella rigenerazione epatica, la loro compromissione può essere una causa maggiore del danno epatico virus-indotto nei pazienti COVID.

### **1.1.6 Le varianti:** <sup>16</sup>

I virus, in particolare quelli a RNA come i coronavirus, evolvono costantemente attraverso mutazioni del loro genoma. Maggiore è la circolazione del virus, maggiore è il rischio d'insorgenza di mutazioni.

Mentre la maggior parte delle mutazioni non ha un impatto significativo, quelle localizzate a livello della proteina S possono portare a cambiamenti della patogenesi e del comportamento virale diventando maggiormente trasmissibili.

Queste mutazioni possono andare ad alterare il RBD (receptor binding domain) della proteina Spike, evadendo così la risposta immunitaria precedentemente acquisita o per infezione naturale o in seguito alla vaccinazione: proprio per questo spesso le varianti comportano la diminuzione dell'efficacia neutralizzante dei vaccini. <sup>17</sup>

Le principali sono:

- Alfa: la prima variante emersa classificata con la sigla B.1.1.7 è stata individuata nel dicembre 2020 in Inghilterra, sostituendo la versione precedente del SARS-CoV-2. Rispetto alla versione originale ha un'efficacia di trasmissione maggiore del 50%.
  
- Beta: è stata identificata in Sudafrica nel settembre 2020 e per questo inizialmente chiamata sudafricana. Viene classificata con la sigla B.1.351

- Gamma: è stata identificata in Giappone e poi in Brasile all'inizio del 2021 e classificata con la sigla (P.1). Presenta tre mutazioni, indicate con le sigle N501Y, E484K e K417T, coinvolte nell'efficacia con cui il virus si lega al recettore ACE2.
  
- Delta: è stata identificata per la prima volta in India e per questo chiamata anche variante indiana. Viene classificata con la sigla B.1.617.2.  
Si è diffusa rapidamente a partire da giugno 2021 in numerosi Paesi grazie alla grande efficienza di trasmissione, stimata fra il 50% e il 60% superiore rispetto alla variante Alfa, che ha finito per sostituire nel ruolo di mutazione dominante.
  
- Omicron<sup>18</sup>: è stata identificata per la prima volta in Sudafrica a fine novembre 2022. Viene classificata con la sigla B.1.1.529.  
Essendo molto più contagiosa rispetto alle precedenti in pochissimo tempo si è diffusa in tutto il mondo, Italia compresa.<sup>19</sup>  
È infatti questa variante la responsabile della quarta ondata, che ha visto il record assoluto di contagi in un solo giorno. Sebbene sia molto più contagiosa, in media è meno pericolosa, poiché coinvolge principalmente le vie aeree superiori.  
Andando a sequenziare il genoma si è scoperto che questa variante possiede più di 30 mutazioni a livello della proteina S.<sup>20</sup>  
Si sono già sviluppate inoltre una serie di sottovarianti.  
Da un'indagine svolta il 7 marzo 2022 è risultato come la variante Omicron abbia una prevalenza in Italia pari al 99.9%.<sup>21</sup>

### 1.1.7 Diagnosi: <sup>22</sup>

Al fine di formulare una corretta diagnosi si deve considerare il momento in cui è avvenuta l'infezione, la storia medica del paziente, i sintomi e la situazione clinica generale.

Inoltre, l'accuratezza di un test diagnostico correla con il momento di esecuzione dello stesso: se il virus è ancora nello stadio di incubazione non vi sono sufficienti copie di RNA in circolazione, né anticorpi o antigeni virali detectabili.

Diversi approcci vengono utilizzati per detectare il SARS-CoV-2, in particolare i principali sono:

- I test molecolari che rilevano la presenza di genoma virale.  
I test molecolari RT-PCR sono considerati il gold standard diagnostico.  
Questa tipologia di test funziona tramite trascrizione inversa del SARS-CoV-2-RNA in cDNA seguito dalla misurazione della carica virale.
- I test antigenici che rilevano la presenza di antigeni virali.  
I cosiddetti tamponi rapidi contengono come substrato degli anticorpi specifici che si legano agli antigeni virali del coronavirus se presenti: vengono quindi riconosciuti specifici peptidi della proteina S o N. Si tratta di test qualitativi e il risultato può essere o positivo o negativo.
- I test sierologici che rilevano la presenza delle IgM e IgG.  
Essi hanno un valore solo retrospettivo e per questo non possono essere usati nella fase acuta della malattia. Sono utili per studi di tipo epidemiologico, per capire se in passato è avvenuta un'infezione o un'immunizzazione da vaccino.  
Se combinati con la RT-PCR possono migliorare l'accuratezza nella diagnosi di infezione da SARS-CoV-2.  
Si è visto che le IgM contro le proteine S e N hanno un picco durante la seconda settimana dall'infezione, mentre le S-IgG e N-IgG hanno un picco a partire dalla terza settimana.

Ovviamente gli anticorpi sviluppati in seguito alla vaccinazione sono solamente quelli diretti contro la proteina Spike: di conseguenza per andare ad investigare una passata infezione sono utili solamente gli anticorpi contro la proteina N.

Altre tecniche utilizzate come l'amplificazione dell'acido nucleico isotermale, approcci basati su CRIPS/Cas, PCR digitale e la chemiluminescenza vengono utilizzati solo in campi di ricerca.

Un altro metodo per far diagnosi è quello radiologico: specialmente quando l'agente eziologico era ancora sconosciuto la diagnosi si basava sui sintomi, sia respiratori che non, e sull'imaging.

L'Rx torace assieme alla TAC sono i metodi imaging migliori per diagnosticare una polmonite da COVID-19.

Alla TAC sono riconoscibili opacità bilaterali interstiziali a vetro smerigliato: la TAC ad alta risoluzione ha una sensibilità altissima (95-100%), ma allo stesso tempo ha una limitata specificità. All'Rx torace, d'altro canto, alcune anomalie polmonari non vengono apprezzate.

Per questo e per la necessità di personale medico altamente qualificato il metodo radiologico è poco utilizzato nella diagnosi.

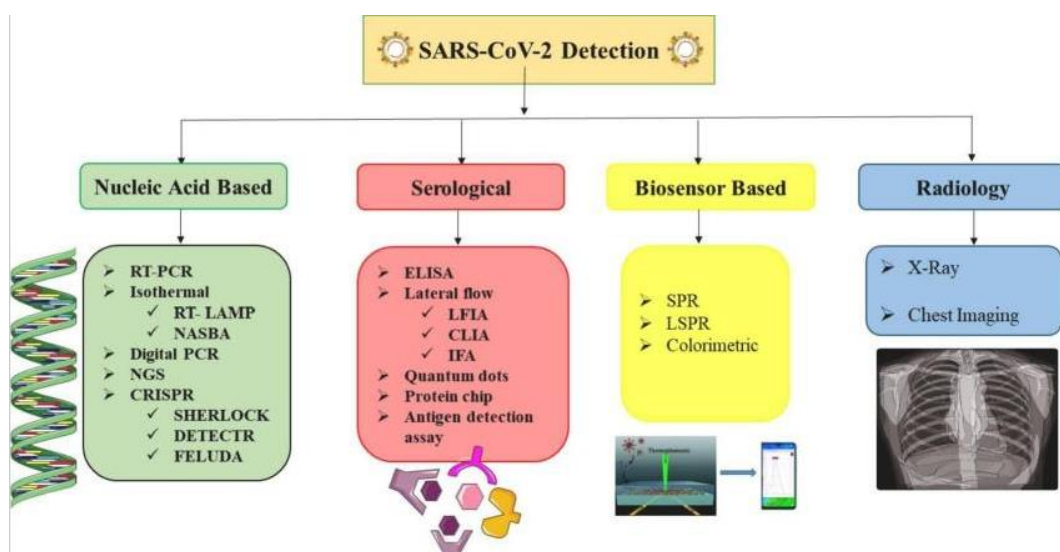


Figura 4<sup>22</sup>

### **1.1.8 Vaccini:** <sup>23</sup>

La proteina S è il target antigenico utilizzato nello sviluppo dei vaccini anti-SARS-CoV-2. Essa è composta da due subunità: la subunità S1 è responsabile del legame al recettore contenente il RBD, mentre S2 permette la fusione con la membrana cellulare.<sup>24</sup>

La proteina Spike induce un'efficace risposta da parte delle cellule T CD4+, così come un importante sviluppo di IgG and IgA.

I vaccini autorizzati al momento in Europa sono cinque: Pfizer-BioNTech, Moderna, AstraZeneca, Johnson&Johnson e Novavax.

La prima vaccinazione contro il Sars-CoV-2 è stata eseguita l'8 dicembre 2020 in Inghilterra.

L'EMA (Agenzia Europea del Farmaco) ha dato l'autorizzazione prima al vaccino di Pfizer-BioNTech nel dicembre 2020 e poi a gennaio 2021 al vaccino Moderna: è iniziata infatti così anche la campagna vaccinale in Italia.

A febbraio 2021 sono arrivate le prime dosi del vaccino AstraZeneca e a marzo 2021 è stato approvato anche il vaccino Johnson and Johnson.

Al 22 giugno 2022 le dosi totali somministrate in Italia e nel mondo sono rispettivamente di 138.126.938 e 12.008.792.588

#### **Vaccini a mRNA:**

I vaccini a mRNA contengono molecole di RNA messaggero che codificano per determinati antigeni proteici. I design di questi vaccini sono in continua evoluzione, al fine di migliorare la stabilità delle molecole di mRNA e l'efficacia della trascrizione proteica, con conseguente miglioramento della risposta immunitaria.<sup>24</sup>

Questa metodologia offre un'ottima flessibilità nel manipolare l'antigene da codificare e ne permette una rapida produzione.

In questi vaccini l'mRNA è incapsulato dentro nanoparticelle lipidiche (LNPs), che permettono un migliore stabilità. Successivamente all'iniezione intramuscolare, il



complesso LNP-mRNA viene internalizzato nella cellula ospite e funge da stampo per la sintesi della proteina Spike full-length.

I vaccini a mRNA hanno mostrato numerosi vantaggi rispetto ai vaccini tradizionali in quanto a sicurezza, efficacia dei costi e induzione della risposta immunitaria sia cellulare che anticorpale.

I vaccini a mRNA autorizzati finora sono due: Pfizer/BioNTech (BNT162b2) e Moderna (mRNA-1273).

Entrambi hanno dimostrato una notevole efficacia nella prevenzione della malattia severa. Inoltre, questi vaccini inducono una solida risposta da parte delle cellule CD4+ in quasi tutti i riceventi.<sup>25,26</sup>

Per quanto riguarda i pazienti trapiantati di organo solido la terza dose ha migliorato significativamente l'immunogenicità del vaccino.

#### **Vaccini a vettore virale:**

I vaccini a vettore virale consistono in virus geneticamente modificati che, utilizzando il complesso traduzionale dell'ospite, portano all'espressione dell'antigene o degli antigeni target.

I virus vettore più usati per lo sviluppo dei vaccini sono gli adenovirus, il virus del morbillo, i lentivirus e il VSV (vesicular stomatitis virus).

Questa tipologia di vaccini può essere suddivisa in due: vaccini a vettore virale non-replicante e a vettore virale replicante.

I primi sono quelli più utilizzati: in seguito alla delezione di geni strutturali i virus diventano infatti incapaci di riprodursi. I vettori non replicanti vengono ingegnerizzati per produrre l'antigene target, in modo da stimolare sia la risposta umorale che quella cellulare.

Uno degli svantaggi maggiori è che questi vettori possono venir parzialmente neutralizzati da una preesistente immunità contro il vettore, con riduzione dell'efficacia.

Per prevenire questa preesistente immunità l'Università di Oxford ha utilizzato come vettore una versione modificata di un adenovirus di scimpanzé, conosciuta come ChAdOx1. Questo ha portato allo sviluppo del vaccino ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca).<sup>27</sup>

Dopo la vaccinazione è stata osservata una solida attivazione e proliferazione delle cellule B, con produzione di anticorpi in particolare IgG1 e IgG3. Inoltre, questo vaccino induce un'ampia e solida risposta da parte delle cellule T: si è dimostrato un aumento dei livelli di IFN- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  e IL-2.

Un altro vaccino simile è quello sviluppato da Johnson&Johnson, che sfrutta come vettore l'adenovirus umano di tipo 26.

### **Vaccini basati su proteine:**

I vaccini basati su proteine sono prodotti grazie alla tecnologia dei DNA ricombinanti (rDNA), che permette l'espressione in diversi ospiti di proteine virali: ad esempio sia della proteina S full-length o anche solamente del suo RBD. Ciò porta allo sviluppo di una risposta immunitaria da parte dell'ospite.

I vaccini basati su questa tecnologia sono molti, tra cui i vaccini contro l'epatite B, influenza, papilloma virus (HPV) e meningococco B.

Fa parte di questo gruppo il vaccino Novavax NVX-CoV2373, un vaccino ricombinante a nanoparticelle che contiene la proteina Spike full-length.

Tra i vantaggi di questa tipologia di vaccini vi sono la sicurezza e l'economicità; hanno però il difetto di essere altamente dipendenti dagli adiuvanti per aumentare la propria immunogenicità.<sup>24</sup>

### 1.1.9 Trattamenti:

Vari trattamenti sono stati studiati dall'inizio della pandemia e lo scenario si è evoluto molto rapidamente.<sup>28</sup>

Per quanto riguarda i pazienti asintomatici o pauci-sintomatici il trattamento è basato sui sintomi; mentre per quanto riguarda i pazienti affetti da malattia più severa vi sono altre possibilità.

Tipicamente la terapia antivirale è più efficace nella prima fase della malattia, quando il virus si sta replicando. Nel decorso della malattia, quando la risposta immune e infiammatoria è amplificata, le terapie immunosoppressive e antiinfiammatorie sembrano portare migliori benefici clinici.

#### 1) Corticosteroidi:

Il rationale per l'utilizzo dei corticosteroidi è basato sulla fisiopatologia della malattia.

Come in altre polmoniti virali la risposta infiammatoria durante l'infezione da SARS-CoV2 gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'insufficienza d'organo. La malattia da COVID-19 severa è caratterizzata da una reazione polmonare acuta con danno alveolare diffuso, infiltrati interstiziali e microtrombi.

Lo scopo della terapia steroidea è quello di ridurre la risposta infiammatoria.

Il desametasone, potente antiinfiammatorio, va ad inibire la produzione di citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, VEGF, TNF, prostaglandine e IFNgamma. Allo stesso tempo induce anche l'attivazione della sintesi di citochine antiinfiammatorie.<sup>24</sup>

Da vari studi emerge come il desametasone, comparato alla standard care riduca la mortalità a 28 giorni in pazienti che necessitano di ossigenoterapia o supporto ventilatorio.

Da queste evidenze le linee guida per il trattamento del COVID-19 NIH (National Institutes of Health) raccomandano l'uso di 6mg di desametasone al giorno, fino a 10 giorni o fino alla dimissione in pazienti che richiedono ventilazione e/o supplemento di ossigeno.

È da sottolineare come i corticosteroidi abbiano meno benefici in pazienti con insorgenza dei sintomi più recente.<sup>24</sup>

## 2) Antivirali:

Tra i diversi antivirali che sono stati valutati il remdesivir è senza dubbio quello che ha ottenuto più consensi.

Si tratta di un analogo nucleotidico che inibisce l'RNA polimerasi-RNA dipendente dei coronavirus, inclusi il SARS-CoV1 e il MERS-CoV, facendo terminare così prematuramente la replicazione virale.<sup>24</sup>

È stato dimostrato che questo farmaco riduca il tempo di ricovero dalla malattia severa.

## 3) Anti-interleuchina-6:

Il razionale per l'utilizzo dei farmaci anti-interleuchina-6 è l'inibizione della pathway infiammatoria con alti livelli di markers infiammatori (D-dimero e ferritina) e citochine proinfiammatorie, inclusa IL-6, associati alla malattia severa. L'IL-6 sembra infatti essere un elemento chiave nello storm citochinico, che porta ad un danneggiamento significativo dei polmoni e degli altri organi.

Tra i farmaci anti-IL6 il tocilizumab è stato il più studiato: si tratta di un anticorpo monoclonale umanizzato anti-IL6 Receptor.

I vari studi condotti hanno portato a risultati discordanti e per questo le raccomandazioni e le linee guida variano molto.

Basato sulle evidenze correnti l'FDA ha suggerito l'utilizzo del tocilizumab come singola dose intravenosa assieme ai corticosteroidi per pazienti ospedalizzati con rapida decompensazione respiratoria.

#### 4) Plasma iperimmune:

L'utilizzo del plasma iperimmune provvede ad un'immunizzazione passiva basata su anticorpi, specialmente in pazienti con produzione deficitaria.

Anche in questo caso i vari trial non hanno dimostrato un chiaro beneficio, anche se qualche studio osservazionale ha documentato che la somministrazione di plasma iperimmune con un alto titolo anticorpale nei primi stadi di COVID-19 è stata associata con una mortalità a 30 giorni minore.

Per questo recentemente l'FDA ha autorizzato l'utilizzo del plasma iperimmune unicamente nei primi stadi della malattia nei pazienti ospedalizzati.

#### 5) Cloroquina e Idrocloroquina

CQ e HCQ sono farmaci antimalarici utilizzati anche nelle malattie autoimmuni. Sebbene il meccanismo d'azione sia ancora non totalmente conosciuto, si crede che entrambi i farmaci vadano ad alterare il pH degli organelli intracellulari impedendo la fusione e la replicazione virale.

Sebbene i dati in vitro siano incoraggianti, molti trial clinici non hanno dimostrato differenze significative in termini di clearance virale, proliferazione della malattia e la mortalità a 28 giorni.

Per quanto l'FDA raccomanda l'uso di CQ/HCQ solo per il trattamento di pazienti ospedalizzati.

#### 6) Anticorpi monoclonali:

Più recentemente sono stati sviluppati gli anticorpi monoclonali, la maggior parte dei quali ha come target la proteina Spike, impedendo così la connessione con la cellula ospite.

Attualmente gli anticorpi monoclonali approvati dall'FDA sono: Casirivimab con Imdevimab, Bamlanivimab, Etesevimab e Sotrovimab.

Casirivimab e imdevimab sono immunoglobuline G1 (IgG1) ricombinanti umane approvate sia per pazienti adulti che pediatrici nella malattia lieve-

moderata da COVID19, ma anche per pazienti con un alto rischio di progressione alla malattia severa.

Benefici limitati sono stati osservati in pazienti con malattia severa conclamata.

7) Anticoagulanti e antiaggreganti:

La malattia da COVID-19 è caratterizzata da uno stato protrombotico con una massiva attivazione della coagulazione sanguigna.

Sono stati registrati infatti un aumento della concentrazione di D-dimero, l'attivazione delle piastrine e la generazione di anticorpi anti-fosfolipidi, che possono portare ad episodi di tromboembolismo venoso: si stima che circa il 9% dei pazienti con COVID-19 e il 21% dei pazienti in terapia intensiva ne abbia sviluppato uno.

La manifestazione più comune è l'embolia polmonare.

La tromboprofilassi con eparina, preferibilmente quella a basso peso molecolare, è raccomandata in tutti i pazienti ospedalizzati con COVID-19, a meno che non sussistano controindicazioni assolute.

C'è da sottolineare come la tromboprofilassi non debba essere prescritta di routine, perché offre benefici solo in casi selezionati.

8) Ossigenoterapia:

Visto che le manifestazioni cliniche principali di un'infezione severa da SARS-CoV-2 sono l'ipossiemia e la dispnea, l'ossigenoterapia sta alla base del trattamento nei casi di malattia severa.

Tipicamente il pattern respiratorio da COVID-19 è caratterizzato da un'insufficienza respiratoria ipossemica, con differenti gradi di severità, fino all'ARDS.

9) Baricitinib:

si tratta di un inibitore selettivo di JAK1 e JAK2 ed inibisce anche le citoniche JAK1/2-dipendenti, come ad esempio IL-6 e IFNgamma, tipicamente coinvolte nell'infiammazione da COVID-19.

È approvato in associazione con il remdesivir in pazienti che necessitano di ossigeno e supporto ventilatorio.

Inoltre, il Baracitinib e il desametasone sono le uniche due terapie che riducono l'infiammazione e che si sono dimostrati efficaci in diversi trail clinici nel trattamento dei pazienti ospedalizzati.

## **1.2 Cirrosi epatica:**

### **1.2.1 Generalità:**

La cirrosi epatica è una malattia a lenta progressione, nella quale vi è un'alterazione dell'architettura del fegato caratterizzata dalla presenza contemporanea di noduli di rigenerazione e di fibrosi.

Queste alterazioni anatomiche rappresentano il risultato finale dell'azione di fattori lesivi di diversa natura, che agendo cronicamente causano una progressiva necrosi degli epatociti, una conseguente infiammazione, lo sviluppo di fibrosi e, successivamente, il sovvertimento strutturale del parenchima, con alterazioni anche del microcircolo.<sup>29</sup>

Macroscopicamente, a seconda delle dimensioni dei noduli la cirrosi, si definisce macronodulare (>3mm di diametro) o micronodulare (< 3mm di diametro).

Dal punto di vista epidemiologico, la prevalenza della cirrosi epatica è stimata attorno allo 0,3% e lo 0,6 % nella popolazione generale adulta, anche se probabilmente il dato reale è superiore a causa dell'asintomaticità degli stadi iniziali.<sup>30</sup>

Il tasso di mortalità a un anno è molto vario: si passa dall'1% al 57% in base all'insorgenza di eventi che portano a scompenso. È la quattordicesima causa di morte al mondo nella popolazione adulta ma arriva ad essere la quarta causa di morte nell'Europa Centrale<sup>31</sup>

### **1.2.2 Eziologia:**

Sono numerose le cause che stanno a monte dell'insorgenza di cirrosi.

Le più comuni nei paesi occidentali sono l'alcolismo, l'infezione da HCV e la steatoepatite non alcolica (NAFLD). Quest'ultima, infatti, nelle ultime decadi è diventata la causa principale di epatopatia cronica in Occidente, mentre in Oriente l'epatite B (HBV) rimane la causa prevalente.



Tra le cause più rare si ricordano quelle autoimmuni e colestatiche (epatite cronica autoimmune, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante), da disordini metabolici (emocromatosi, malattia di Wilson, deficit di alfa1-antitripsina), iatrogene (farmaci epatotossici, lesione chirurgica vie biliari) e da cause vascolari (Sindrome di Budd-Chiari). Esistono poi casi di cirrosi idiopatica o criptogenetica.<sup>32</sup>

### **1.2.3 Quadro clinico e complicanze:**

La storia naturale della cirrosi è caratterizzata da una fase silente, detta cirrosi compensata, seguita da una fase di scompenso caratterizzata dall'insorgenza di complicanze.

La maggior parte dei pazienti con cirrosi epatica compensata si presenta appunto senza sintomi clinicamente rilevanti: infatti i sintomi, se presenti, sono lievi come astenia, febbre, prurito, perdita di peso e dolore addominale. Questa fase può durare molti anni.<sup>29</sup>

Il danno epatico cronico e il progressivo peggioramento della fibrosi causano nel tempo una progressiva riduzione del parenchima funzionale e un'alterazione dell'architettura epatica con conseguente perdita della funzionalità epatica e ipertensione portale.

Quest'ultima è legata principalmente ad un aumento della resistenza al flusso ematico all'interno del parenchima epatico, dovuto sia all'ostacolo provocato dai noduli di rigenerazione e dai setti fibrosi, sia all'attività contrattile delle cellule di Ito, stimolata da vasocostrittori locali. Si parla di ipertensione portale clinicamente significativa quando il gradiente pressorio porta-sovraepatiche è maggiore di 10-12 mmHg.<sup>33</sup>

La ritenzione venosa che ne consegue, porta a sua volta alla genesi di circoli collaterali oltre che alla formazione di varici esofagee e gastriche, gastropatia congestizia, encefalopatia epatica, splenomegalia e versamento ascitico.

Le complicanze della cirrosi hanno come causa principale l'ipertensione portale.

Le principali sono:

- Emorragia digestiva: da rottura di varici esofagee o gastriche o da gastropatia congestizia<sup>34</sup>
- Ascite: presenza di liquido nella cavità addominale che si manifesta in oltre il 50% dei pazienti cirrotici nel corso della malattia. Può essere associata all'insorgenza di peritonite batterica spontanea o sindrome epatorenale,<sup>35</sup>
- Encefalopatia epatica: alterazione neurologica secondaria all'accumulo di metaboliti tossici dovuto alla perdita della funzionalità epatica;<sup>36</sup>
- Carcinoma epatocellulare;
- Trombosi portale;
- Ipertensione polmonare
- Coagulopatia
- Infezioni

#### **1.2.4 Diagnosi e valutazione del paziente cirrotico:**

Data l'asintomaticità della prima fase, la diagnosi di cirrosi epatica può essere ipotizzata al momento dello scompenso.

Il gold standard è la biopsia epatica che però, essendo un esame invasivo e costoso, non viene attualmente effettuata di routine.

Vengono effettuati invece esami più semplici e meno invasivi che permettono, in particolare se combinati, di fornire una diagnosi accurata.<sup>37</sup> Tali esami sono l'elastometria epatica, gli esami ematochimici e altre metodiche di imaging come l'ecografia, la TC o la RMN, che permettono di valutare gli assetti morfologici tipici.

Dopo la diagnosi è necessario definire la causa della malattia, lo stadio e il rischio di complicanze e per questo vengono utilizzati principalmente due score.

- 1) Child-Pugh: è uno score prognostico di severità di malattia cirrotica basato sui valori di alcuni test di funzionalità epatica (bilirubina, albumina e tempo di protrombina) e sull'eventuale presenza di ascite e/o encefalopatia. A ogni quadro clinico viene assegnato un punteggio che va da un minimo di 5 punti ad un massimo di 15. Si vengono così a delineare 3 classi: Child A (5-6 punti) quando la malattia è ancora compensata; Child B (7-9 punti) quando lo scompenso è in fase iniziale; Child C (10-15) tipico degli scompensi avanzati.<sup>38</sup>

Negli ultimi anni questo indice ha dimostrato alcune criticità legate al fatto che i parametri ascite ed encefalopatia sono parametri soggettivi, non misurabili oggettivamente.

Parametri	1 punto	2 punti	3 punti
Ascite	Assente	Lieve	Moderata
Bilirubina (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albumina (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
INR	<1.7	1.7-2.2	>2.2
Encefalopatia	Assente	Grado 1-2	Grado 3-4

Tabella 1

- 2) MELD (Model for end-stage liver disease): è basato su un calcolo che include i valori della bilirubinemia, della creatinemia e dell'INR.

$$9.57 \log (\text{creatinina}) + 3.78 \log (\text{bilirubina}) + 11.20 \log (\text{INR}) + 6.43^{39}$$

Esso permette di predire la mortalità a 3 mesi nel paziente cirrotico.

### **1.2.5 Deficit immunitario cirrosi-associato:**

L'acronimo CAID (cirrhosis-associated immune dysfunction) comprende uno spettro di alterazioni immunitarie associate alla malattia cirrotica, con alterazioni sia dell'immunità innata, che adattativa predisponendo così i pazienti ad una aumentata suscettibilità a condizioni infiammatorie sistemiche severe e a gravi stati di esaurimento immunitario.

Alla base della CAID, la cui severità è dinamica e progressiva, vi è principalmente una disfunzione della barriera intestinale, a cui è associato un deficit di compartimentalizzazione ed omeostasi del microbiota, con conseguente infiammazione sistemica e deficit immunitario.<sup>40</sup>

La CAID comprende due fenotipi immunitari: il fenotipo infiammatorio sistemico a basso grado e quello ad alto grado. Il primo può essere trovato in pazienti con malattia compensata o con decompensazione clinica ma senza insufficienza d'organo.<sup>41</sup> In questo fenotipo vi è un'attivazione immunitaria esagerata, ma la risposta immunitaria non è marcatamente compromessa.

Il fenotipo ad alto grado è presente in pazienti con malattia epatica acuta su cronica, con malattia decompensata o insufficienza d'organo ed è associata ad un'alta mortalità a breve termine. In questo tipo di fenotipo il rischio di infezioni, principalmente batteriche o fungine, è criticamente aumentato.<sup>40</sup>

L'intensità della CAID ha importanti conseguenze sulla progressione della cirrosi e correla con la severità dell'insufficienza epatica.

### **1.2.6 Impatto della pandemia:**

L'avvento della pandemia ha avuto un grave impatto sul sistema di assistenza ospedaliera ed extraospedaliera sia in Italia che in altri stati.

Specialmente all'inizio della pandemia si è assistito alla redistribuzione delle risorse umane e materiali verso aree di cura per i pazienti con il COVID-19 e di conseguenza alla riduzione dell'attività assistenziale finalizzata al trattamento, alla diagnosi e al monitoraggio delle altre malattie, come quelle epatiche croniche.

Molti dei test utilizzati nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie di fegato croniche come l'ecografia, la biopsia epatica, l'elastometria sono state rinviate o addirittura annullate. Questo, assieme alla sospensione delle attività preventive, come lo screening per l'HCC, ha fatto sì che i pazienti si siano presentati con problemi più seri<sup>42</sup> che potevano essere prevenuti o essere più facilmente curabili.

### **1.2.7 COVID e cirrosi**

Già dopo i primi casi di infezione da SARS-CoV-2 è apparso come i pazienti con malattia epatica cronica ed in particolare con cirrosi avessero un rischio maggiore di sviluppare un decorso di malattia severo.<sup>43</sup>

Oltre alla disfunzione immunitaria (CAID) i pazienti con cirrosi hanno spesso altre comorbilità che predispongono alla malattia severa come diabete, insufficienza renale e cardiaca.<sup>44</sup>

Da vari studi americani è emerso come tra i pazienti con cirrosi, aggiustando per età, razza, eziologia della malattia epatica e comorbilità, il rischio di mortalità a 30 giorni dopo l'infezione da SARS-CoV-2 sia aumentato.<sup>44</sup>

È stato anche osservato che probabilmente il COVID-19 influenza la progressione dell'epatite: la replicazione del virus dell'epatite B può essere infatti aumentata durante l'infezione. Per questo pazienti COVID HBV+ sviluppano più facilmente danno epatico.

## **1.3 Trapianto di fegato:**

### **1.3.1 Generalità**

Il trapianto di fegato rappresenta il trattamento di scelta per malattie epatiche croniche in fase terminale e in determinati casi anche per l'epatite fulminante.

Il primo trapianto di fegato venne eseguito in Colorado nel 1963 da Thomas Starzl. Da allora il numero di pazienti trapiantati di fegato ha visto un andamento esponenziale, grazie ad una migliore gestione del paziente ma soprattutto grazie all'introduzione di una corretta terapia immunosoppressiva, che previene il rigetto dell'organo. <sup>45,46</sup>

Al giorno d'oggi in Italia vengono eseguiti circa 1300 trapianti all'anno.

Si tratta di un trapianto ortotopico: il fegato, infatti, viene trapiantato nella stessa sede in cui il fegato nativo viene espantato.

La sopravvivenza dei pazienti a 5 anni dall'intervento varia dal 70 al 75% in base all'eziologia della malattia epatica primitiva, alle condizioni cliniche del paziente al momento dell'intervento e alle caratteristiche del donatore. <sup>29</sup>

### **1.3.2 Indicazioni:**

La cirrosi epatica rappresenta la più comune indicazione al trapianto.

Tra le malattie che più comunemente rappresentano un'indicazione al trapianto la patologia virale, sebbene sia ancora una causa importante, sta vedendo una netta diminuzione, grazie soprattutto ai nuovi farmaci DAAs eradicanti il virus dell'epatite C (HCV)

Allo stesso tempo si sta assistendo ad un aumento delle patologie alcol-correlate, delle malattie metaboliche e delle neoplasie epatiche.

## Malattie che rappresentano indicazione al trapianto di fegato

<p><b>MALATTIE EPATICHE CRONICHE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cirrosi virale (HBV, HCV, HDV, HEV)</li> <li>- Cirrosi alcolica</li> <li>- Cirrosi epatica ad eziologia metabolica (Steatoepatite non alcolica NASH)</li> <li>- Cirrosi ad impronta colestatica (colangite biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva, colangite biliare secondaria, colangite sclerosante secondaria, colangite intraepatica, sindrome di Alagille)</li> <li>- Cirrosi da epatite autoimmune</li> <li>- Cirrosi da difetto del metabolismo (emocromatosi, malattia di Wilson, deficit di <math>\alpha</math>1AT)</li> <li>- Cirrosi da cause vascolari (malattia veno-occlusiva, malattia di Budd-Chiari)</li> <li>- Neoplasie del fegato (epatocarcinoma, in rari casi selezionati anche colangiocarcinoma), carcinoide, epatoblastoma</li> <li>- Cirrosi criptogenica</li> <li>- Fibrosi epatica congenita, malattia di Caroli</li> <li>- Iperossaluria tipo I, ipercolesterolemia tipo II, emofilia</li> </ul>
<p><b>MALATTIE EPATICHE ACUTE O FULMINANTI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Da causa virale (HBV, HAV, HDV, HEV e raramente HCV)</li> <li>- Da cause tossiche (farmaci, amanita falloide, erbe, sostanze epatotossiche)</li> <li>- Da cause metaboliche (malattia di Wilson)</li> <li>- Epatite autoimmune</li> <li>- Insufficienza epatica acuta idiopatica</li> <li>- Insufficienza epatica acuta in corso di gravidanza</li> </ul>
<p><b>MALATTIE EPATICHE MENO COMUNI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Emangioendotelioma epitelioido</li> <li>- Metastasi epatiche da neoplasia neuroendocrina ben differenziata</li> <li>- Malattia di Rendu-Osler</li> <li>- Fegato policistico</li> </ul>

Tabella 2

### **1.3.3 Controindicazioni:**

Esistono anche delle controindicazioni al trapianto che si dividono in assolute e relative.

Tra le prime vi sono: sepsi, colangite, instabilità emodinamica, neoplasie extraepatiche e metastasi da HCC, dipendenza attiva da sostanze, problemi psichiatrici rilevanti e supporto familiare inadeguato.

Tra le relative invece vi sono: trombosi della vena porta, iponatriemia severa, peritonite batterica spontanea, sarcopenia, infezione da HIV ed età maggiore di 70 anni.

### **1.3.4 Score prognostici:**

Al fine di identificare i potenziali candidati al trapianto, utilizzando dei criteri quanto più oggettivi, vengono utilizzati degli score.

Il Child-Pugh, utilizzato fino al 2002 per definire lo stadio e la sopravvivenza del soggetto cirrotico è stato sostituito dal MELD-score (Model for End-Stage Liver Disease).

Inizialmente formulato per valutare i pazienti candidabili a TIPS è stato in seguito utilizzato nel campo della trapiantologia.

La scala MELD valuta tre parametri: il tempo di protrombina, la bilirubina e la creatinina.

I pazienti vengono inseriti in lista d'attesa quando il loro MELD supera i 15 punti. Ci sono tuttavia delle eccezioni: vengono messi infatti in lista anche pazienti con MELD < 15 ma che presentano ad esempio ascite refrattaria o intrattabile, emorragie ripetute da varici, ittero ingravescente, encefalopatia refrattaria, epatocarcinoma, prurito resistente alla terapia oppure qualità della vita pessima.



### 1.3.5 Terapia immunosoppressiva:

In seguito al trapianto il paziente deve assumere a vita una terapia immunosoppressiva, tranne in casi estremamente rari in cui viene indotta la tolleranza.

Da un lato la terapia va a diminuire le difese immunitarie per prevenire il rigetto (iperacuto, acuto e cronico), dall'altro predispone all'insorgenza di insufficienza renale, infezioni o addirittura di neoplasie de novo.

I principali farmaci utilizzati nel trapianto di fegato sono gli inibitori della calcineurina: la ciclosporina e il tacrolimus

A questi farmaci principali si possono associare altri farmaci quali azatioprina o mofetil micofenolato (MMF), che inibiscono il metabolismo delle purine, steroidi e più recentemente anche sirolimus ed everolimus, che inibiscono la pathway di mTOR (mammalian target of rapamycin).

Nella fase di induzione dell'immunosoppressione, al momento del trapianto e nei giorni immediatamente successivi vengono utilizzati anche i farmaci monoclonali.

29

Sono state studiate anche le interazioni tra questi farmaci immunosoppressori e i farmaci attualmente utilizzati nel trattamento del COVID-19.<sup>15</sup>

Ad esempio, si è osservato come la combinazione di antivirali lopinavir-ritonavir interagisca con gli inibitori della calcineurina (CNI), il MMF e con la pathway di mTOR; inoltre non è raccomandato l'utilizzo in combinazione con gli steroidi.

Il tocilizubam sembra incrementare la concentrazione plasmatica degli CNI, a differenza del remdesivir che non interagisce con i farmaci immunosoppressivi. L'idrossiclorochina invece va ad interagire sia con gli CNI e sia con gli inibitori di mTOR.

Per questo motivo è altamente raccomandato il monitoraggio del livello dei farmaci immunosoppressori. L'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases consiglia di non ridurre le dosi dei farmaci immunosoppressori, anche se la gestione della terapia immunosoppressiva risulta ancora complessa e da approfondire.

### 1.3.6 Impatto della pandemia

La pandemia ha sconvolto diversi settori del sistema sanitario in tutto il mondo. Servizi elettivi sono stati cancellati o riprogrammati, mentre i programmi di trapianti salvavita sono continuati. Al contrario, i programmi di trapianti non salvavita sono stati frequentemente ritardati, esponendo i pazienti a situazioni di emergenza.<sup>15</sup>

Anche in questo campo la telemedicina ha assunto un ruolo importante per minimizzare l'esposizione dei pazienti al COVID-19.

Nella degenza post-operatoria del paziente trapiantato sono necessarie rigide misure di controllo delle infezioni, incluso anche quella da SARS-CoV-2. Per questo i pazienti dovrebbero rimanere in camere distanti dai reparti comuni e dovrebbero venir adottate pratiche di disinfezione e isolamento.

Lo scopo della terapia intensiva nel paziente trapiantato è quello di tenerlo costantemente monitorato dal punto di vista neurologico ed emodinamico, prevenendo così le infezioni nosocomiali e le complicanze relative al graft.

La pandemia però ha incrementato in modo esponenziale la richiesta di posti letti in terapia intensiva e la necessità di più operatori sanitari, al fine di massimizzare il numero di posti disponibili, e per questo i servizi trapiantologici hanno subito una grave limitazione, con saturazione dei posti in terapia intensiva e riduzione delle forniture.

È emerso quindi che, soprattutto durante le prime ondate, il numero dei trapianti sia diminuito di molto: negli Stati Uniti sono stati stoppati in molti centri i trapianti da donatore vivente<sup>47</sup>.

Se da un lato lo scopo è quello di proteggere i pazienti, dall'altro ci sono conseguenze a lungo termine che devono essere prese in considerazione: i pazienti, infatti, si rivolgono alla struttura ospedaliera quando la malattia si trova in uno stadio più avanzato, con conseguente aumento della mortalità.

### **1.3.7 COVID nei pazienti trapiantati:**

All'inizio della pandemia i pazienti trapiantati di fegato sono stati considerati una popolazione vulnerabile e ci si è chiesti se fossero particolarmente a rischio di malattia severa e di lesioni dell'organo trapiantato data l'immunosoppressione e l'alta prevalenza di comorbidità metaboliche.<sup>48</sup>

Si è scoperto che gli uomini di mezza età con problematiche metaboliche sono i principali target dell'infezione, come nei casi di pazienti non trapiantati.

La presentazione della malattia è simile a quella riportata nella popolazione generale, con febbre e tosse come sintomi più comuni.<sup>49</sup> Allo stesso tempo però un'alta percentuale di pazienti trapiantati, maggiore rispetto alla popolazione di controllo, ha riferito problemi gastrointestinali.

Circa il 60% dei pazienti trapiantati con infezione da SARS-CoV-2 è stato ospedalizzato, percentuale ben più alta rispetto alla popolazione generale, anche se è necessario sottolineare come, soprattutto durante la prima ondata, molti casi asintomatici o paucisintomatici non siano stati diagnosticati.<sup>50</sup>

Molto interessante è il fatto che andando a comparare la mortalità sembra non ci sia netta differenza rispetto alla popolazione generale.<sup>51</sup>

Sembra però ci sia una differenza significativa nella risposta immunitaria all'infezione da SARS-CoV-2, così come alla vaccinazione.

L'assunzione di una terapia immunosoppressiva continuativa, in particolare di antimetaboliti, sembra avere un ruolo chiave nella mancata risposta.

La ridotta immunogenicità in seguito alla vaccinazione contro altri virus respiratori, come l'influenza, è già stata dimostrata.

## **1.4 Vaccinazione nei pazienti trapiantati ed epatopatici**

### **1.4.1 Generalità**

I pazienti con malattia epatica cronica e trapiantati di fegato, a causa rispettivamente del deficit immunitario cirrosi-associato e del regime immunosoppressivo per prevenire il rigetto d'organo, hanno un rischio elevato di sviluppare infezioni severe associate ad insufficienza epatica acuta, perdita dell'organo trapiantato e ad aumentata mortalità.

Nel periodo post-trapianto, a causa dei protocolli di induzione, l'immunosoppressione è massima nei primi sei mesi.

Per questo la vaccinazione rappresenta la principale misura preventiva contro patogeni come lo pneumococco, l'influenza e le epatiti virali A e B, che possono essere molto pericolosi specialmente per questi pazienti più fragili.

Tuttavia, la vaccinazione in questo contesto solleva diverse questioni poiché i programmi di vaccinazione raccomandati si basano su pochi dati e studi clinici. Inoltre, i vaccini vivi attenuati sono controindicati dopo il trapianto e la dinamica dell'immunosoppressione rende difficile capire la risposta all'immunizzazione.<sup>52</sup>

### **1.4.2 Vaccinazione nei pazienti trapiantati**

I pazienti trapiantati di organo solido, come il fegato, contraggono con aumentata incidenza e soprattutto con aumentata severità diverse infezioni, alcune delle quali prevenibili con la vaccinazione.

Proprio per questo è necessaria una specifica pianificazione vaccinale, con eventuali aggiunte di dose booster: i vaccini in questa determinata popolazione, infatti, generano solitamente una diminuita risposta immunitaria e spesso vi è un'accelerata perdita di protezione.<sup>53</sup>

I rischi infettivi maggiori e l'efficacia dei vaccini possono variare a seconda della dinamica dell'immunosoppressione: come già sottolineato, è massima nei primi sei mesi post-trapianto e poi tende a migliorare.

Le attuali linee guida raccomandano l'attuazione di programmi di vaccinazione il prima possibile nel periodo pre-trapianto a causa della bassissima immunogenicità prevista nella malattia epatica allo stadio terminale e post-trapianto.<sup>54</sup>

I vaccini vivi attenuati sono controindicati dopo il trapianto e dovrebbero essere proposti quindi nel periodo precedente, almeno quattro settimane prima.

Al contrario, i vaccini inattivati sono considerati sicuri.<sup>55</sup>

Nei riceventi non vaccinati, i tempi di immunizzazione post-trapianto sono dibattuti: al fine di migliorare l'immunogenicità del vaccino, si raccomanda di aspettare un intervallo di 3-6 mesi, quando i regimi immunosoppressivi hanno raggiunto la loro dose di mantenimento, ad eccezione del vaccino antinfluenzale<sup>56</sup> inattivato che può essere somministrato già un mese dopo.<sup>57 58</sup>

Dato che la protezione vaccinale può essere ridotta dallo stato immunosoppressivo risulta fondamentale vaccinare anche i familiari e gli operatori sanitari, che stanno a stretto contatto con questi pazienti.<sup>58</sup>

## **Capitolo 2: SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare la risposta immunitaria umorale in seguito alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 nei pazienti cirrotici e nei pazienti trapiantati di fegato e compararla tra loro e con quella dei controlli sani.

Si sono valutate anche eventuali correlazioni tra una diminuita risposta anticorpale e determinati fattori come l'età, il sesso, le comorbidità e il tipo di terapia immunosoppressiva.

## Capitolo 3: MATERIALI E METODI

### 3.1 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio multicentrico, prospettico, osservazionale che mira a valutare le risposte immunitarie in seguito alla somministrazione del vaccino anti-SARS-CoV-2.

Sono state valutate le risposte immunitarie in seguito alla somministrazione dei seguenti vaccini: Pfizer/BioNTech BNT162b2 mRNA, Moderna mRNA-1273 e AstraZeneca/University of Oxford ChAdOx1-nCoV-19.

Questo studio non prevede il reclutamento di una coorte di controllo:

- Al timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose i dati sull'immunogenicità sono stati confrontati con i dati generati da due coorti composte da volontari appartenenti al personale sanitario. Queste coorti fanno parte di due progetti completamente separati, condotti in modo completamente indipendente: si tratta di uno studio multicentrico svolto nel Regno Unito e uno studio osservazionale sugli operatori sanitari svolto presso il Centro medico universitario di Amburgo-Eppendorf.
- Al timepoint post 3<sup>a</sup> dose i dati sull'immunogenicità sono stati confrontati con dei dati provenienti dalla letteratura<sup>59</sup>.

### 3.2 Contesto

Il promotore principale di questo studio è l'Oxford Liver Unit appartenente all'ospedale universitario di Oxford, in Inghilterra.

Sono stati arruolati pazienti provenienti da sette diversi centri in Europa, tra cui il complesso Azienda-Università di Padova. Questo con lo scopo di ampliare il bacino di pazienti e di ottenere risultati riproducibili.

Per quanto riguarda la realtà patavina lo studio è stato svolto presso l'Unità Operativa Complessa di Gastroenterologia e l'Unità Operativa Dipartimentale Semplice Trapianto Multiviscerale, dove sono stati reclutati pazienti che sono periodicamente seguiti in ambulatorio.

### 3.3 Selezione dei pazienti

Per quanto riguarda la selezione dei pazienti, questi sono stati arruolati nello studio, attingendo da database clinici già esistenti, sulla base dei seguenti criteri di inclusione e di esclusione.

- Criteri di inclusione:
  - Pazienti con età maggiore di 16 anni;
  - Pazienti che non avevano ancora ricevuto alcuna somministrazione del vaccino per SARS-COV-2;
  - Pazienti eleggibili per i seguenti vaccini: Pfizer/BioNTech BNT162b2 mRNA, Moderna mRNA-1273 o AstraZeneca/University of Oxford ChAdOx1-nCoV-19
  - Pazienti con un'aspettativa di vita prevista maggiore di 6 mesi.
  
- Criteri di esclusione
  - Gravidanza;
  - Infezione da HIV non controllata;
  - Pazienti non in grado di fornire un consenso informato.



### 3.4 Raccolta dei campioni:

Per ogni timepoint sono stati raccolti per paziente 35 ml di sangue, il quale è stato poi processato presso il laboratorio di Gastroenterologia, seguendo le linee guida del protocollo, e da cui sono state ricavati 3 vials di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), 5 vials di siero e 5 vials di plasma.

La raccolta dei campioni è avvenuta:

- Baseline: la raccolta dei campioni è avvenuta entro 3 mesi dalla prima vaccinazione (V1);
- Post 1<sup>a</sup> dose/ Pre 2<sup>a</sup> dose: la raccolta dei campioni è avvenuta massimo 2 settimane prima della seconda vaccinazione (V2);
- 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose: la raccolta dei campioni è avvenuta dopo 28 giorni (+/- 3 giorni) dalla seconda vaccinazione;
- 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose/ Pre 3<sup>a</sup> dose: la raccolta dei campioni è avvenuta dopo 6 mesi (+/- 4 settimane) dalla seconda vaccinazione;
- Post 3<sup>a</sup> dose: la raccolta dei campioni è avvenuta dopo 28 giorni (+/- 3 giorni) dalla terza vaccinazione (V3);

Gli anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 sono stati misurati attraverso una piattaforma centralizzata standardizzata, comune a tutti i siti (ELISA immunoassey).

Questa ha rilevato la presenza e la quantità di anticorpi sierici contro gli antigeni spike (S) e dei nucleocapside(N) di SARS-CoV-2.

Questo test ha consentito la comparazione delle risposte umorali derivanti dalla vaccinazione e/o dall'infezione da SARS-CoV-2.

Infatti, solamente chi ha contratto il virus ha sviluppato anche anticorpi anti-nucleocapside, al contrario dei pazienti vaccinati che hanno sviluppato solamente quelli contro la proteina Spike.

### 3.5 Aspetti etici

Il protocollo di questo studio è stato redatto in conformità alle norme di Buona Pratica Clinica, uno standard internazionale di qualità etica e scientifica utilizzato per progettare, condurre, registrare e riportare studi che coinvolgono la partecipazione di soggetti umani. Il rispetto di questo standard garantisce pubblicamente che i diritti, la sicurezza e il benessere dei soggetti di studio siano protetti, in coerenza con i principi originati nella Dichiarazione di Helsinki (e aggiornati secondo la sua ultima versione, Fortaleza, Brasile, 2013).

Ogni paziente è stato informato verbalmente e per mezzo di un apposito documento scritto riguardo alle finalità e procedure dello studio.

È stato spiegato al paziente che la sua partecipazione allo studio è volontaria, libera e consapevole e che il consenso potrà essere ritirato in qualsiasi momento per qualsivoglia ragione o anche senza alcun motivo.

Il paziente è stato inoltre informato che scegliere di non partecipare non influirà sulle cure che riceverà per il trattamento della sua malattia. È stata data facoltà al paziente di consultarsi con persone di fiducia e concesso un idoneo lasso di tempo per identificare criticità, per chiedere ulteriori informazioni, ecc. e infine è stato chiesto al paziente di firmare il modulo di consenso nell'eventualità fosse accettata la proposta di partecipazione allo studio.

La raccolta e il trattamento dei dati personali dei soggetti sono stati raccolti ed elaborati in modo da garantire la riservatezza e la conformità alle leggi e ai regolamenti sulla protezione dei dati personali (Regolamento UE 2016/679).

## Capitolo 4: ANALISI STATISTICA

Per ciascun partecipante sono state confrontate le coppie di risposte umorali (IgG anti-S) al Baseline e a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, utilizzando il test di Wilcoxon

Sono state poi svolte delle analisi non accoppiate al fine di confrontare le risposte anticorpali tra i pazienti trapiantati, cirrotici e la popolazione di controllo.

- a) Per il confronto della risposta a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose è stato utilizzato il test U di Mann Whitney.

Per quanto riguarda la popolazione sana di controllo, l'unico dato conosciuto presente all'interno del protocollo dello studio, è che il titolo medio delle immunoglobuline G (IgG) leganti la proteina S a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose ha un valore di 9136 U/ml con un intervallo di confidenza (CI) stimato del 95% di 5782-12490 U/ml.

A partire da queste indicazioni, si è dunque supposto che la risposta anticorpale della popolazione sana si distribuisse come una variabile aleatoria gaussiana (Figura 5) di media 9136 e deviazione standard 1711. Il campione statistico è stato campionato da tale distribuzione per un totale di 100.000 unità.

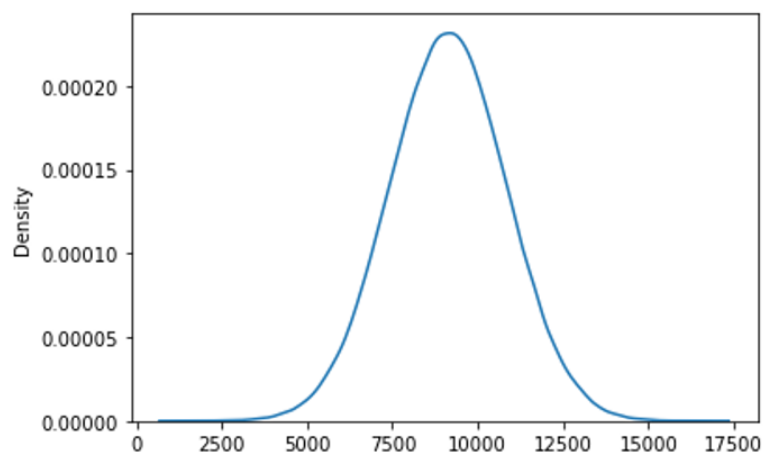


Figura 5

b) Per quanto riguarda il timepoint post 3<sup>a</sup> dose sono stati ricercati dati in letteratura.

Non essendo stati individuati dati plausibili sulla popolazione sana, per quanto spiegato nel Capitolo 6, non è stato possibile confrontare l'intera distribuzione.

Dall' articolo "Antibody Response to COVID-19 Booster Vaccination in Healthcare Workers"<sup>59</sup> è però emerso che il 25esimo percentile del titolo anticorpale tra gli individui sani che non hanno contratto l'infezione è 14381 (Figura 6).

Per determinare la differenza statistica tra i diversi campioni è stato utilizzato il test di Fisher, al fine di confrontare la proporzione di individui tra i trapiantati e i cirrotici con risposta inferiore a 14381.

**TABLE 2** | Anti-RBD IgG Geometric mean titre before and after booster vaccination according to previous SARS-CoV2 infection status.

	No SARS-CoV-2 infection			SARS-CoV-2 infection before vaccine			SARS-CoV-2 infection after vaccine			Total		
	GM	CI95%		GM	CI95%		GM	CI95%		GM*	CI95%*	
Pre-booster	555	528	582	1836	1603	2103	864	385	1938	682	651	715
Post-booster	24460	23405	25560	22244	20361	24301	25646	14643	44915	24076	23136	25056
	Mean	IQR		Mean	IQR		Mean	IQR		Mean	IQR	
Pre-booster	522	300	942	1868	820	45505	1035	334	2809	615	322	1238
Post-booster	23525	14381	39200	21670	13475	32762	27350	1738	40000	23102	14226	38100

\*Estimated from mixed model.

GM, geometric mean; CI, confidence interval; IQR, interquartile range.

Figura 6<sup>59</sup>

Infine, sono state svolte delle analisi stratificate per classe d'età, sesso, comorbidità e tipologia di terapia immunosoppressiva.

Sono tutte state confrontate tramite il Mann Whitney test.

Solo nel primo caso è stato svolto anche un Kruskal Wallis test per confrontare le 4 classi d'età, ma essendoci una numerosità troppo bassa in 2 classi si è preferito nuovamente un più classico Mann Whitney test.

Affinché il test risultasse statisticamente significativo si è scelta come soglia per il p-value 0.05.

La strumentazione utilizzata per la misurazione degli anticorpi ha come limite inferiore  $< 0.40$  e come limite superiore  $> 25000$  U/ml.

Per le analisi il valore riportato come  $< 0.40$  è stato considerato 0, mentre  $> 25000$  come 250000.

L'unità di misura utilizzata per il titolo anticorpale è U/ml.

## Capitolo 5: RISULTATI

### 5.1 Descrizione del campione

Il campione analizzato in questo studio è composto da 93 pazienti, di cui 71 trapiantati e da 22 cirrotici.

#### Sesso:

Si nota una netta predominanza del sesso maschile con un totale di 67 uomini (72%).

	UOMINI	DONNE
<b>TRAPIANTATI</b>	49 (69%)	22 (31%)
<b>CIRROTICI</b>	18 (81.8%)	4 (18.2%)
<b>TOTALE</b>	67 (72%)	26 (28 %)

Tabella 3

#### Età:

L'età media dei pazienti è 61.2 con mediana 62: vi è una leggera differenza tra i pazienti trapiantati (media 62.2) e i cirrotici (media 58.2).

Sono state create 4 classi d'età:

- 1) Età < 40 anni
- 2) Età compresa tra 40 e 60 anni
- 3) Età compresa tra 60 e 80 anni
- 4) Età > 80 anni

	< 40	40-60	60-80	>80
<b>TRAPIANTATI</b>	3	23	42	3
<b>CIRROTICI</b>	2	9	11	0
<b>TOTALE</b>	5	32	53	3

Tabella 4

**Comorbidità:**

Andando a stratificare per le comorbidità è emerso come ben 64 pazienti (68.8%) presentino almeno una comorbidità.

In particolare, ci si è concentrati sul diabete mellito (DM) e l'ipertensione arteriosa.

Per quanto riguarda i trapianti 5 soffrono di ipertensione arteriosa, 6 di diabete mellito e 2 di entrambe.

Analogamente 2 pazienti cirrotici sono affetti da diabete mellito, 2 da ipertensione arteriosa e 3 da entrambe.

Questi dati sono riassunti nella tabella 6 sottostante.

	<b>COMORBIDITÀ</b>	<b>DM</b>	<b>IPERTENSIONE</b>
<b>TRAPIANTATI</b>	48 (64.3%)	8 (11.3%)	7 (9.9%)
<b>CIRROTICI</b>	16 (72.7%)	5 (22.7%)	5 (22.7%)
<b>TOTALE</b>	64 (68.8%)	13 (14%)	12 (12.9%)

Tabella 5

**BMI:**

Questo dato è sconosciuto per 35 pazienti trapiantati e per 5 pazienti cirrotici, di conseguenza la popolazione analizzata per questo parametro si compone di 36 pazienti trapiantati e di 17 pazienti cirrotici (53 pazienti in totale).

Sono state delineate 4 classi: Normopeso (BMI 18.5-24.9), Pre-obesità (BMI 25-29.9), Obesità di I grado (BMI 30-34.9) e Obesità di II grado (BMI 35-39.9)

Nella popolazione trapiantata 14 pazienti sono normopeso, 14 fanno parte della classe Pre-obesità, 5 della classe Obesità grado I e 3 della classe Obesità grado II.

Nei cirrotici invece 7 sono normopeso, 6 fanno parte della classe Pre-obesità, 3 della classe Obesità grado I e solo 1 della classe Obesità grado II.

	<b>NORMOPESO</b>	<b>PRE-OBESITÀ</b>	<b>OBESITÀ I GRADO</b>	<b>OBESITÀ II GRADO</b>
<b>TRAPIANTATI</b>	14 (38.9%)	14 (38.9%)	5 (13.9%)	3 (8.3%)
<b>CIRROTICI</b>	7 (41.2%)	6 (35.3%)	3 (17.6%)	1 (5.9%)
<b>TOTALE</b>	21 (39.6%)	20 (37.8%)	8 (15.1%)	4 (7.5%)

Tabella 6

**Eziologia cirrosi (solo popolazione cirrotica):**

Ben 14 pazienti cirrotici (63.6%) vedono come responsabile, da solo o in associazione, l'HCV.

Al secondo posto per frequenza vi è l'alcol, causa o concausa di cirrosi in 7 pazienti (31.8%).

**Terapia immunosoppressiva (solo popolazione trapiantata):**

Tutti i pazienti trapiantati assumono una terapia immunosoppressiva: 27 pazienti (38%) sono in monoterapia, mentre 44 pazienti (62%) assumono una terapia combinata (2 o più farmaci). In questo secondo sottogruppo 26 pazienti (59.1%) fanno uso di MMF (micofenolato mofetile).

**Drop-out pazienti:**

Durante il follow-up alcuni pazienti non si sono presentati all'appuntamento prefissato e di conseguenza non in tutti i timepoint la numerosità è la stessa.

Questo è riassunto nella tabella 7 sottostante:

	PRE 1 <sup>^</sup> DOSE	POST 1 <sup>^</sup> DOSE	28 GG POST 2 <sup>^</sup> DOSE	6 MESI POST 2 <sup>^</sup> DOSE	POST 3 <sup>^</sup> DOSE
<b>TRAPIANTATI</b>	71 (100%)	71 (100%)	65 (91.5%)	60 (84.5%)	41 (57.7%)
<b>CIRROTICI</b>	21 (95.4%)	21 (95.4%)	21 (95.4%)	20 (90.9%)	12 (54.5%)
<b>TOTALE</b>	92 (99%)	92 (99%)	86 (92.5%)	80 (86%)	53 (57%)

Tabella 7

**Pazienti non responder**

Per paziente non responder si intende un paziente che, nonostante la somministrazione di dosi vaccinali, presenta un titolo anticorpale <0.40.

Andando a differenziare tra i vari timepoint si nota che i pazienti non responder sono:

- Post 1<sup>^</sup> dose: 1 paziente cirrotico e 43 pazienti trapiantati
- 28 giorni post 2<sup>^</sup> dose: 16 pazienti trapiantati
- 6 mesi post 2<sup>^</sup>dose: 10 pazienti trapiantati
- Post 3<sup>^</sup> dose: 3 pazienti trapiantati



	POST 1^	28 GIORNI POST 2^	6 MESI POST 2^	POST 3^
<b>TRAPIANTATI</b>	43 (60.5%)	16 (22.5%)	10 (16.6%)	3 (7.3%)
<b>CIRROTICI</b>	1 (47.6%)	0	0	0
<b>TOTALE</b>	44 (47.8%)	16 (17.4%)	10 (11.6%)	3 (5.7%)

Tabella 8

### Pazienti che hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2:

Andando a misurare anche le IgG anti-Nucleocapside, che sono positive solo in seguito all'infezione da SARS-CoV-2, si sono potuti individuare i pazienti che hanno contratto il virus.

Questi pazienti per comodità sono stati rinominati "Positivi".

Andando ad osservare i dati al Baseline è emerso come 9 pazienti, precisamente 8 pazienti trapiantati e un paziente cirrotico, avessero contratto il virus SARS-CoV-2. Solo uno di questi pazienti, appartenente alla coorte dei pazienti trapiantati, era a conoscenza di aver contratto il virus.

In seguito alla seconda vaccinazione 3 pazienti hanno contratto il virus, tutti appartenenti alla popolazione trapiantata.

5 pazienti, 2 trapiantati e 3 cirrotici, hanno riferito di aver contratto l'infezione in seguito alla 3^ dose. I dati relativi al timepoint post 4^ dose non sono stati ancora analizzati ed è per questo probabile che i pazienti positivi siano di più.

	PRE 1^ DOSE	POST 2^ DOSE	POST 3^ DOSE
<b>TRAPIANTANTI</b>	8	3	2
<b>CIRROTICI</b>	1	0	3
<b>TOTALE</b>	9	3	5

Tabella 9

### Tipologia di vaccino:

Tutti i pazienti hanno ricevuto come vaccino Pfizer-BioNTech, tranne un paziente, appartenente alla coorte dei cirrotici, che è stato vaccinato con Moderna.

## **5.2 Titoli anticorpali medi (IgG anti-S):**

I titoli anticorpali medi sono stati in tutti i timepoint differenziati in due gruppi: nel primo caso si è analizzato tutto il campione a disposizione, nel secondo caso solo i pazienti che non hanno contratto il virus (campione totale – pazienti positivi).

### **0) Baseline (Pre 1<sup>a</sup> dose):**

Per questo timepoint, sono state analizzate le risposte anticorpali solo della popolazione totale.

Per quanto riguarda i pazienti appartenenti alla popolazione trapiantata è risultato che il titolo anticorpale pre 1<sup>a</sup> dose fosse di 27.69 U/ml.

Analogamente per quanto riguarda la popolazione cirrotica il titolo anticorpale medio è risultato essere di 84.81 U/ml.

### **1) Post 1<sup>a</sup> dose:**

Il titolo anticorpale medio post 1<sup>a</sup> dose è risultato di 3974.71 per i pazienti trapiantati e di 1219.84 per i pazienti cirrotici.

Non considerando i pazienti positivi il titolo è diventato di 7.11 per i pazienti trapiantati e 30.83 per i pazienti cirrotici.

### **2.1) 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose**

Il titolo anticorpale medio a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, considerando tutto il campione è risultato 2419.48 per i pazienti trapiantati e di 3177.86 per i pazienti cirrotici.

Considerando solo i pazienti che non hanno contratto l'infezione, il titolo è diventato di 455.18 e di 2086.75, rispettivamente per i pazienti trapiantati e cirrotici.

Nella Figura 7 sottostante si può osservare la distribuzione della risposta umorale a 28 giorni post 2<sup>a</sup>dose

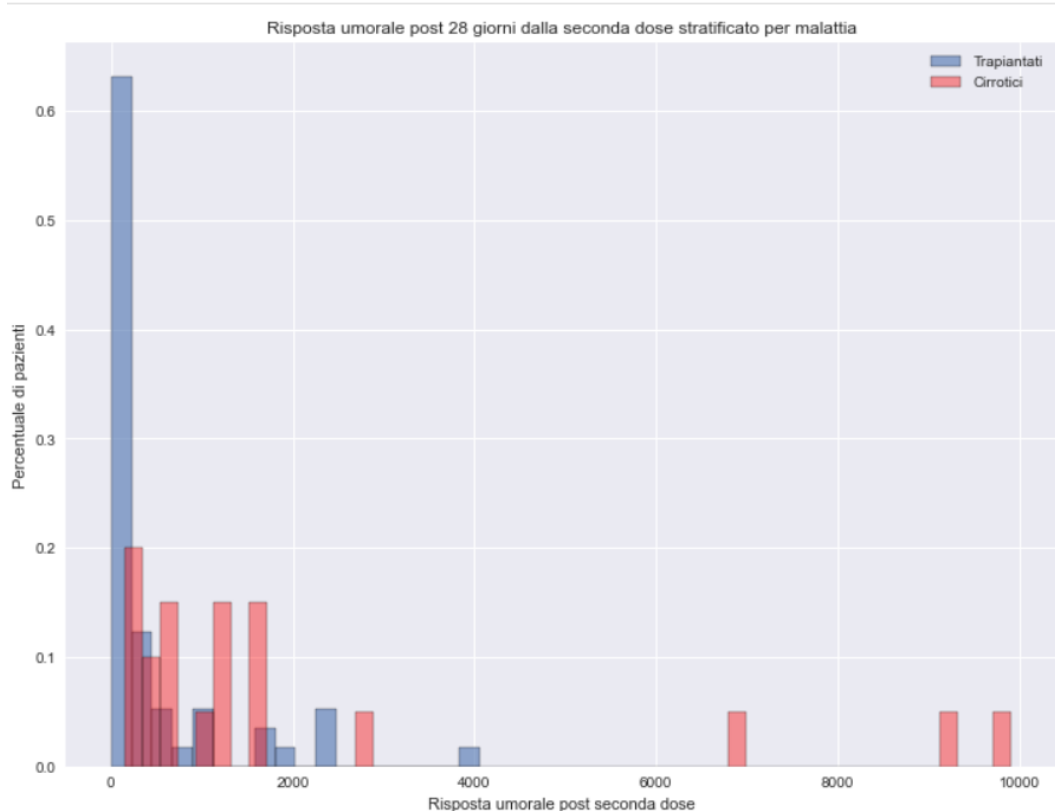


Figura 7

## 2.2) 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose

Il titolo anticorpale medio a 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose, considerando tutto il campione, è risultato di 1118.81 per i pazienti trapiantati e di 701.42 per i pazienti cirrotici. Non considerando i pazienti positivi il titolo è diventato di 312.79 per i trapiantati e di 556.54 per i cirrotici

## 3) Post 3<sup>a</sup> dose

Il titolo anticorpale medio post 3<sup>a</sup> dose, considerando tutto il campione, è risultato di 13824.32 per i pazienti trapiantati e di 19145.75 per i pazienti cirrotici. Non considerando i pazienti positivi il titolo è diventato di 13273.89 per i trapiantati e di 19140.10 per i cirrotici.

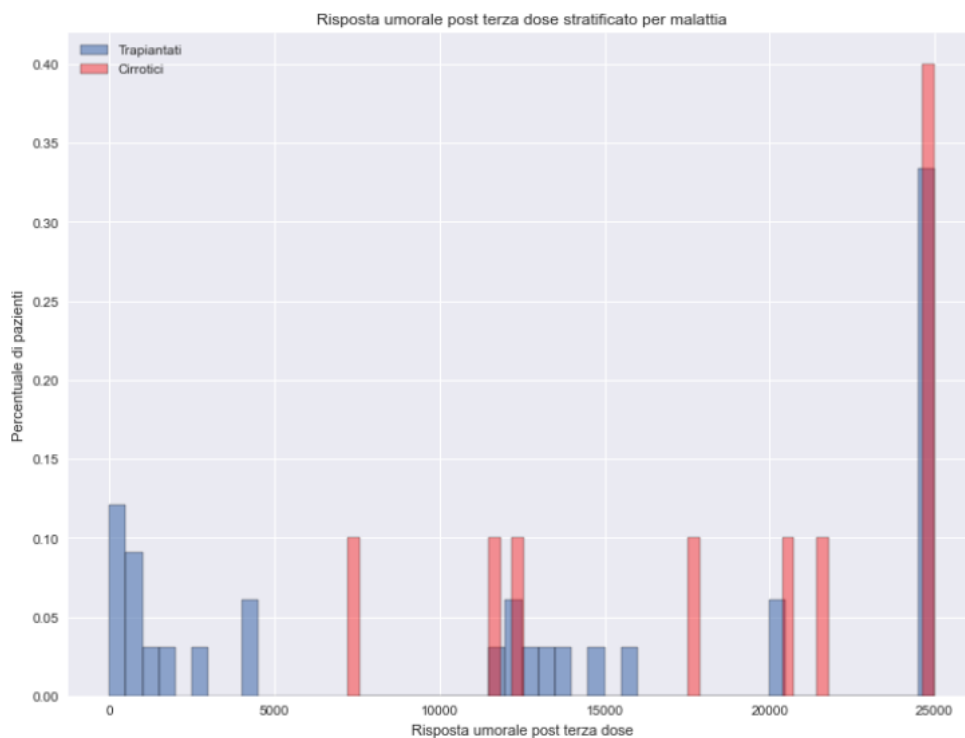


Figura 8

La figura 9 sottostante mostra l'andamento del titolo anticorpale medio nei vari timepoint.

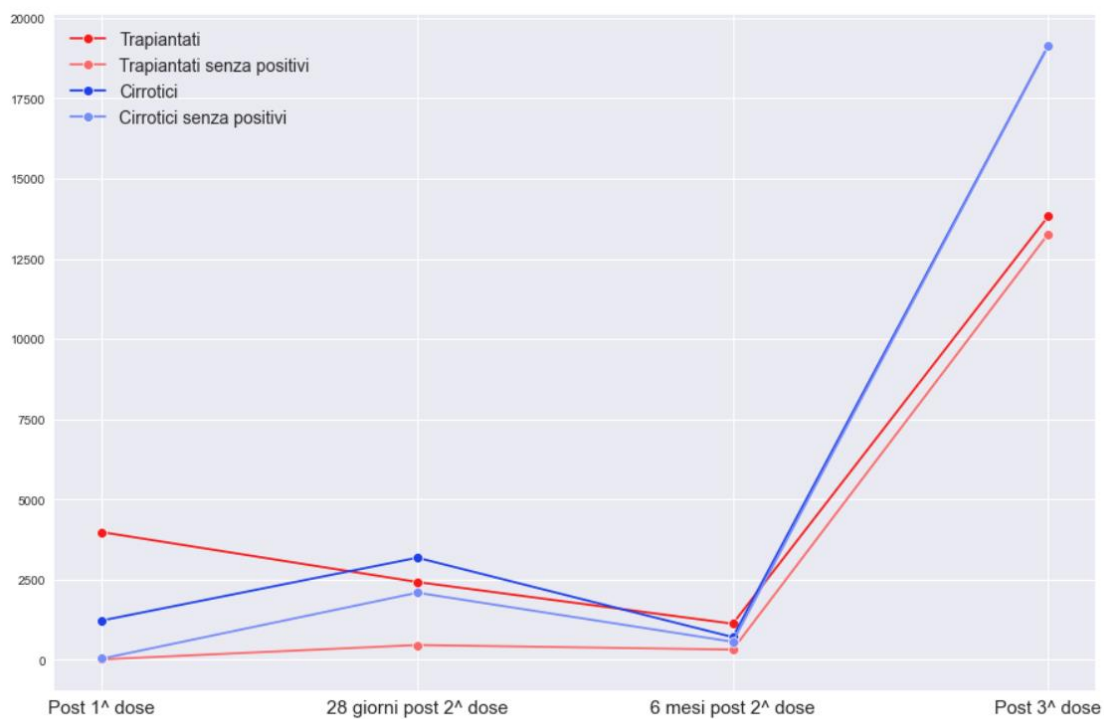


Figura 9

### **5.3 Analisi accoppiate**

Sono state confrontate le coppie di risposte umorali (IgG anti-S) al Baseline e a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, utilizzando il test di Wilcoxon

In entrambe le popolazioni, sia considerando solo la popolazione sieronegativa al baseline, sia anche i pazienti positivi, è stato riscontrato un aumento importante del titolo anticorpale tra i due timepoint considerati (p-value in entrambi i casi <0.001).

### **5.4 Analisi non accoppiate**

Si sono svolte delle analisi non accoppiate tramite il test di Mann Whitney e il test di Fisher al fine di confrontare la risposta tra le popolazioni trapiantata, cirrotica e di controllo.

#### **5.4.1 Trapiantati vs Popolazione sana**

Si sono confrontate le risposte anticorpali medie a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose tra i pazienti trapiantati e la popolazione sana di controllo (titolo anticorpale 9143.55). È risultata esserci una riduzione statisticamente significativa del titolo anticorpale medio nella popolazione trapiantata rispetto ai controlli, sia considerando l'intero campione (2419.48 U/ml), sia considerando solo i pazienti non positivi (455.18 U/ml).

Al timepoint post 3<sup>a</sup> dose è risultato che la percentuale di pazienti trapiantati che non ha contratto l'infezione con un titolo anticorpale inferiore a 14381 è 54.5% (18 pazienti su 33).

Confrontando questo dato con quello della popolazione sana che non ha contratto il virus, dove solamente il 25% ha sviluppato una risposta inferiore a tale valore, è risultato che anche in questo timepoint la differenza tra le due popolazioni è statisticamente significativa.

### **5.4.2 Cirrotici vs Popolazione sana**

Si sono confrontate le risposte anticorpali medie a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose tra i pazienti cirrotici e la popolazione sana di controllo (titolo anticorpale 9143.55 U/ml).

È risultata esserci una riduzione statisticamente significativa del titolo anticorpale medio nella popolazione cirrotica rispetto ai controlli, considerando sia tutta la popolazione cirrotica, sia considerando solo i pazienti che non hanno contratto l'infezione.

Al timepoint post 3<sup>a</sup> dose è risultato che la percentuale di pazienti cirrotici, che non ha contratto l'infezione, con un titolo anticorpale inferiore a 14381 è 30% (3 pazienti su 10).

Confrontando questo dato con quello della popolazione sana che non ha contratto il virus, dove il 25% ha sviluppato una risposta inferiore a tale valore, è risultato che in questo timepoint la differenza tra le due popolazioni non è statisticamente significativa.

### **5.4.3 Trapiantati vs Cirrotici**

Si sono confrontate le risposte anticorpali medie a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose tra i pazienti cirrotici e trapiantati, considerando prima tutto il campione e poi escludendo i positivi.

In entrambi i casi è emerso che il titolo anticorpale medio dei trapiantati (2919.48 e 455.18 rispettivamente nel primo secondo caso) è significativamente più basso rispetto a quella dei cirrotici (3177.86 e 2086.75, rispettivamente nel primo e secondo caso).

La stessa cosa è stata fatta con le risposte media anticorpali post 3<sup>a</sup> dose.

In questo caso, contrariamente a prima, è emerso che non c'è sufficiente evidenza statistica per affermare che la media anticorpale dei trapiantati sia più bassa rispetto alla media dei cirrotici.

#### **5.4.4 Positivi vs Non Positivi**

Si sono confrontati i titoli anticorpali a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup> tra chi ha contratto l'infezione (positivi) e chi no.

Purtroppo per quanto riguarda la popolazione cirrotica questo non è stato possibile poiché il numero dei pazienti positivi è troppo limitato (1 paziente a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e 2 pazienti post 3<sup>a</sup> dose).

Per quanto concerne la popolazione trapiantata la risposta anticorpale media dei pazienti positivi è risultata di 16415.12 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e 16094.88 post 3<sup>a</sup> dose. Il titolo anticorpale medio dei pazienti trapiantati che non hanno contratto il virus è risultato di 455.18 e 13273.89, rispettivamente post 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> dose.

È risultato quindi che la differenza tra le due popolazioni è statisticamente significativa solamente al timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, diversamente da quanto accade post 3<sup>a</sup> dose.

### **5.5 Analisi stratificate**

Si sono andate ad indagare la presenza di eventuali correlazioni tra un eventuale fattore (classe d'età, sesso, terapia immunosoppressiva e comorbidità) e la mancata/ diminuita risposta anticorpale.

Per queste analisi sono stati considerati solo i pazienti che non hanno contratto l'infezione.

#### **5.5.1 Stratificazione per classi d'età**

Inizialmente è stato effettuato un Kruskal Wallis test per confrontare la risposta anticorpale media a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose tra le varie classi d'età.

Essendoci però pochissimi dati per le classi 1 e 4 si è preferito un più classico Mann Whitney test, facendo un confronto tra pazienti trapiantati con età < 60 anni (classe 1 e 2) e pazienti trapiantati con età > 60 anni (classi 3 e 4).

Le risposte medie del primo gruppo (<60 anni) e del secondo gruppo (> 60 anni) sono risultate essere rispettivamente di 457.21 e di 450.4 U/ml.

Si può pertanto concludere che non vi è differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.

La stessa analisi è stata ripetuta per la popolazione cirrotica.

Il titolo anticorpale medio dei pazienti cirrotici con età < 60 anni è di 2618.19, mentre è di 1800.59 nei pazienti cirrotici ultrasessantenni.

La differenza tra i due gruppi è risultata essere non statisticamente significativa.

### **5.5.2 Stratificazione per sesso**

Nella popolazione trapiantata, si sono confrontate le risposte anticorpali medie tra uomini e donne a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup>.

Il titolo anticorpale medio per quanto riguarda gli uomini è di 552.93 e di 13590.26, rispettivamente a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup>. Nella popolazione femminile invece il titolo è di 225.19 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 12641.15 post 3<sup>a</sup> dose.

Sebbene ci siano delle differenze, queste non sono statisticamente significative.

La stessa operazione è stata ripetuta per la popolazione cirrotica.

Il titolo anticorpale medio per quanto riguarda gli uomini è di 2320.14 e di 19327.25, rispettivamente a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup>. Nella popolazione femminile invece il titolo è di 1153.17 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 18391 post 3<sup>a</sup> dose.

In entrambi i timepoint la differenza tra i due sessi non è statisticamente significativa.



### **5.5.3 Stratificazione per comorbidità**

Si è andati a valutare la risposta anticorpale in pazienti trapiantati che presentano almeno una comorbidità e pazienti trapiantati che non ne presentano.

Il titolo anticorpale medio nei pazienti con comorbidità è risultato di 355.14 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 13624.17 post 3<sup>a</sup> dose.

Nei pazienti senza comorbidità la risposta media è di 671.93 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 12573.33 post 3<sup>a</sup> dose.

In entrambi i timepoint la differenza tra i due gruppi non è statisticamente significativa.

La stessa analisi è stata ripetuta anche nella popolazione cirrotica.

La risposta anticorpale media nei pazienti con comorbidità è risultata di 1985.02 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 20398.83 post 3<sup>a</sup> dose.

Nei pazienti senza comorbidità la risposta media è di 2391.94 a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e di 17252 post 3<sup>a</sup> dose

Anche in questo caso la differenza tra pazienti cirrotici con comorbidità e pazienti cirrotici senza non è statisticamente significativa nei timepoint analizzati.

### **5.5.4 Stratificazione per terapia immunosoppressiva**

Si è andati a confrontare, all'interno della popolazione trapiantata, le risposte anticorpali tra pazienti che assumono solamente un farmaco immunosoppressivo e pazienti che ne assumono due o più.

Il titolo anticorpale medio a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose è risultato di 625.96 per i pazienti in monoterapia e di 355.56 per i pazienti in terapia combinata.

Post 3<sup>a</sup> dose invece la risposta anticorpale media è risultata essere di 18817.91 per il primo gruppo e di 10501.88 per il secondo.

In entrambi i timepoint si è osservata una differenza statisticamente significativa: chi assume una terapia immunosoppressiva combinata sviluppa meno anticorpi.

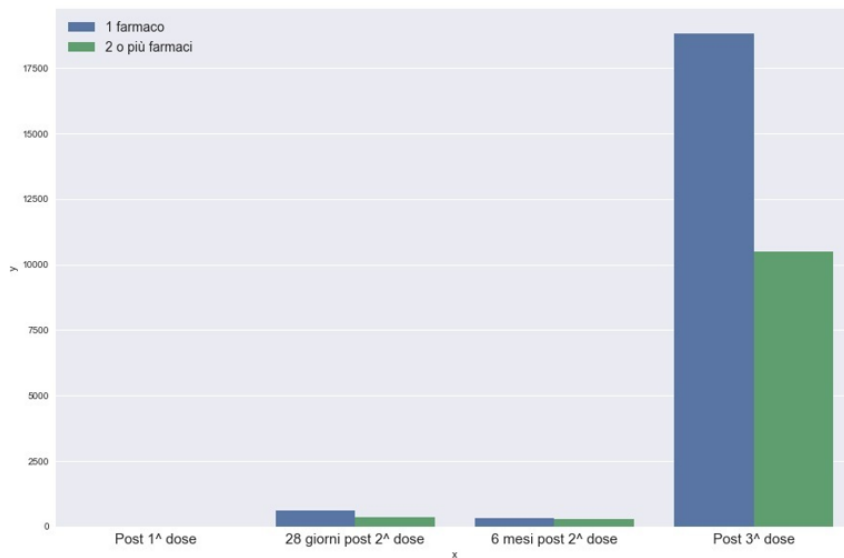


Figura 10

Si è andati poi a valutare se vi fosse una differenza tra chi assume MMF e chi no, indipendentemente dal numero di farmaci assunti.

La risposta anticorpale media a 28 giorni post 2ª dose del primo gruppo è risultata essere di 229.54, mentre del secondo è di 586.81.

Analogamente la risposta media post 3ª dose è risultata di 7209.85 nel primo gruppo e di 17215.51 nel secondo.

La differenza è in entrambi i timepoint statisticamente significativa: l'assunzione di MMF correla con una riduzione del titolo anticorpale medio.

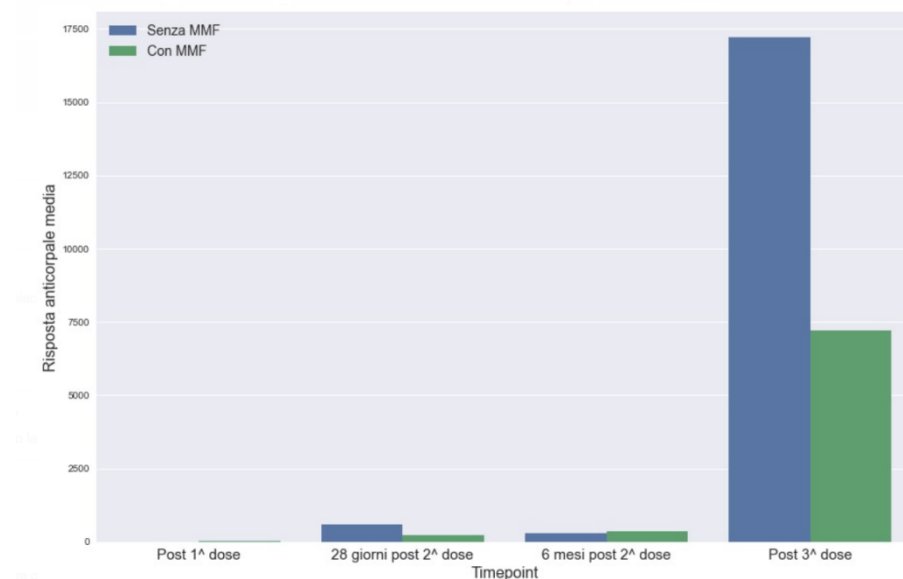


Figura 11

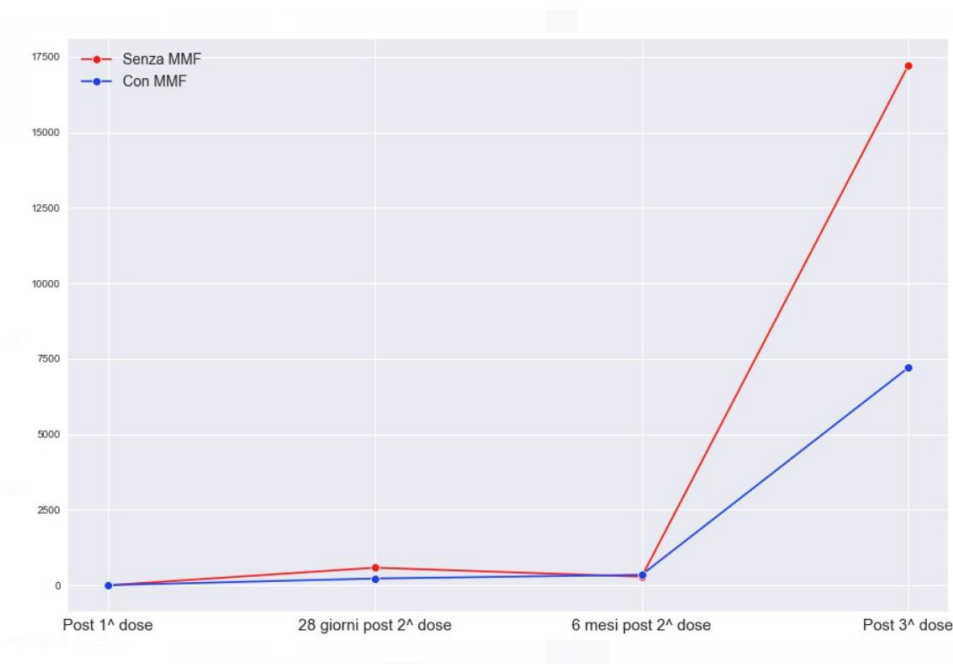


Figura 12

Infine, si è valutata la differenza tra pazienti in terapia combinata, differenziando tra chi assumesse MMF e chi no.

A 28 giorni post 2ª dose la differenza tra i due gruppi (titolo anticorpale medio di 229.54 per chi assume MMF e di 531.99 per chi non lo assume) è statisticamente significativa.

Al contrario, per quanto riguarda il timepoint post 3ª dose la differenza tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa: la media anticorpale del primo gruppo è risultata di 7209.85 e di 15257.02 per il secondo gruppo.

## Capitolo 6: DISCUSSIONE

A conferma degli studi presenti in letteratura <sup>59-61</sup>, dai quali si evince come la popolazione immunocompromessa sviluppi una risposta anticorpale inferiore in seguito alle vaccinazioni contro il SARS-CoV-2, anche in questo studio entrambe le popolazioni analizzate (trapiantanti e cirrotici) hanno sviluppato post 2<sup>a</sup> dose una risposta anticorpale inferiore rispetto alla popolazione sana di controllo.

L'unico dato conosciuto su tale popolazione, presente nel protocollo dello studio, è il titolo anticorpale a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose.

Per capire se la risposta anticorpale fosse diminuita anche in seguito alla 3<sup>a</sup> dose si sono ricercati dati in letteratura. Essendo un argomento molto attuale, sono stati pubblicati finora pochi studi relativi al titolo anticorpale sviluppato post 3<sup>a</sup> dose dalla popolazione sana.

Alcuni articoli sono stati scartati per incompatibilità delle unità di misura, altri per la presenza di cut-off diversi che impedivano la corretta comparazione tra le popolazioni.

Utilizzando i risultati provenienti da uno studio italiano<sup>59</sup> è stato possibile confrontare le percentuali di pazienti cirrotici e trapiantati, che non hanno contratto l'infezione, con titolo anticorpale inferiore a 14381 U/ml. Questo valore corrisponde al 25esimo percentile del titolo anticorpale della popolazione studiata, composta da 1738 lavoratori nell'ambito sanitario che non hanno contratto l'infezione.

Anche in questo caso i cut-off usati nei due studi erano diversi (limite massimo 25000 vs 40000) e, per questo motivo, non è stato possibile confrontare il titolo anticorpale medio e il 75esimo percentile.

È risultato che il 54.5% della popolazione trapiantata (18 pazienti) e il 30% della popolazione cirrotica (3 pazienti) hanno sviluppato un titolo inferiore a 14381.

Sapendo quindi che il 25% della popolazione sana ha sviluppato una risposta inferiore a questo valore, è emerso che la differenza è statisticamente significativa solamente per quanto riguarda i trapiantati.

Il fatto che per la popolazione cirrotica non ci sia una differenza statisticamente significativa può essere dovuto al fatto che:

- Il campione considerato è molto ristretto (10 pazienti) e di conseguenza è difficile ottenere differenze significative;
- I pazienti cirrotici, in seguito alla dose booster, hanno realmente sviluppato una risposta anticorpale simile alla popolazione sana di controllo. Questo sarebbe molto positivo, in quanto sottolineerebbe l'importanza nell'eseguire le dosi di richiamo.

Sono state poi confrontate direttamente le due popolazioni studiate, per capire se la popolazione cirrotica sviluppasse in media più anticorpi rispetto alla popolazione trapiantata.

È emerso che al timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose la differenza tra la popolazione trapiantata e cirrotica è statisticamente significativa: i trapiantati hanno sviluppato in media meno anticorpi.

Al contrario, post 3<sup>a</sup> dose, la popolazione trapiantata ha sempre sviluppato in media meno anticorpi, ma questa differenza non è più statisticamente significativa.

Questa differenza nel risultato può essere però spiegata da due fattori:

- 1) La numerosità del campione in questo timepoint è pari al 57% della popolazione totale.

I pazienti analizzati appartenenti alla popolazione trapiantata sono 41 (57.7% del totale trapiantati), mentre quelli cirrotici solamente 12 (54.4% del totale cirrotici).

Minore è la numerosità del campione, maggiore deve essere la differenza tra le due popolazioni, affinché questa risulti statisticamente significativa.

- 2) Il titolo anticorpale massimo rilevabile dalla strumentazione utilizzata è di 25000: di conseguenza il titolo di tutti i pazienti che hanno sviluppato una risposta maggiore è stato considerato come se fosse esattamente 25000, comportando così un appiattimento dei risultati.

Dato che il titolo medio della popolazione cirrotica è vicino al limite di 25000 è molto probabile che quello reale sia maggiore e che quindi, se si avesse a disposizione il valore reale, la differenza tra le due popolazioni anche in questo timepoint sarebbe statisticamente significativa.

Come si può osservare nella Figura 9 l'andamento del titolo anticorpale vede un incremento tra i timepoint post 1<sup>a</sup> dose e 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, per poi diminuire tra i timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose e aumentare nuovamente, in modo esponenziale, tra i timepoint 6 mesi post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup> dose.

La somministrazione della terza dose booster ha portato quindi allo sviluppo di un'importante risposta anticorpale (titolo anticorpale medio trapiantati 13824.32, cirrotici 19145.75).

Andando a confrontare le risposte anticorpali post 3<sup>a</sup> dose tra i pazienti trapianti positivi e non, è emerso come, differentemente da quanto accade a 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose, non c'è differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.

Non è stato possibile svolgere la medesima analisi per la popolazione cirrotica a causa del numero troppo esiguo di pazienti positivi.

Solo 3 pazienti trapianti sono rimasti sieronegativi durante tutta la durata dello studio. Essendo un campione troppo piccolo è difficile correlare questa mancata risposta con eventuali fattori di rischio.

Rimane però da capire se gli individui che non sono riusciti a sviluppare una risposta umorale dopo tre dosi di vaccino trarrebbero beneficio da ulteriori vaccinazioni.

In assenza di soglie sierologiche, che stabiliscano quale sia la soglia minima di protezione entro la quale il soggetto non sviluppi una malattia grave, resta ancora da definire se la popolazione immunodepressa trarrebbe beneficio da ulteriori vaccinazioni per aumentare la risposta anticorpale e la sieropositività.<sup>61</sup>

È emerso inoltre che la risposta anticorpale, sia nella popolazione trapiantata che in quella cirrotica, non è dipendente dall'età, dal sesso e dalle comorbidità.

Al contrario nella popolazione trapiantata vi è differenza statisticamente significativa, in entrambi i timepoint analizzati (28 giorni post 2<sup>a</sup> dose e post 3<sup>a</sup> dose, tra chi assume come terapia immunosoppressiva un solo farmaco e chi una terapia combinata.

Questa differenza è stata anche osservata, in entrambi i timepoint, dividendo la popolazione trapiantata tra chi assume MMF e chi no, indipendentemente dal numero di farmaci assunti: i primi, infatti, hanno sviluppato in media meno anticorpi.

Infine, tra i pazienti in terapia combinata, è stato fatto un confronto tra chi assume MMF e chi no: è emerso che la differenza tra i due gruppi è statisticamente significativa solamente al timepoint 28 giorni post 2<sup>a</sup> dose.

Al contrario, al timepoint post 3<sup>a</sup> dose, sebbene la differenza tra i due titoli anticorpali medi sia elevata (7209.85 vs 15257.02), questa non è statisticamente significativa.

Anche in questo caso il risultato può essere dovuto ad una minore numerosità del campione in questo timepoint.

### **6.1 Limiti dello studio**

Questo studio ha mostrato i seguenti limiti e criticità:

- Il campione considerato è ristretto e gravato dal fatto che sia diminuito nei vari timepoint, specialmente per quanto riguarda la popolazione cirrotica;
- Questo studio fa parte di uno studio più grande multicentrico, ma i dati analizzati riguardano solo la popolazione patavina (studio monocentrico);
- Assenza di una vera e propria popolazione di controllo;
- La strumentazione utilizzata per calcolare il titolo anticorpale è diversa tra le popolazioni target e le popolazioni di controllo sane;
- La strumentazione utilizzata per calcolare il titolo anticorpale ha come limite superiore > 25000 U/ml.

Questo ha portato ad un appiattimento dei risultati, con conseguente maggior difficoltà nel capire se la differenza tra le due popolazioni confrontate fosse statisticamente significativa.

### **6.2 Prospettive future**

I risultati relativi ai titoli anticorpali post 4<sup>a</sup> dose e alle cellule T sviluppatesi in seguito alla vaccinazione non sono ancora disponibili.

Interessante sarà analizzarli e osservare se è avvenuta una sierconversione nei pazienti rimasti sieronegativi in seguito alle prime tre dosi.

Inoltre, si potrà studiare e analizzare il risultato della somma di tutti i risultati ottenuti dai vari centri satelliti.



## Capitolo 7: CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio ha dimostrato che, in seguito alla seconda dose del vaccino anti-SARS-CoV-2, la popolazione cirrotica e trapiantata ha sviluppato un titolo anticorpale minore rispetto alla popolazione sana di controllo.

Post 3<sup>a</sup> dose, invece, solamente i pazienti trapiantati hanno sviluppato una risposta inferiore rispetto ai controlli.

Inoltre, è emerso come le risposte anticorpali siano più basse nei pazienti trapiantati rispetto ai pazienti con malattia cirrotica: la differenza tra le due popolazioni è statisticamente significativa post 2<sup>a</sup> dose, diversamente da quanto accade post 3<sup>a</sup> dose.

Dall'esecuzione di analisi stratificate, è emerso che non c'è correlazione tra una diminuita/ mancata risposta anticorpale e i seguenti fattori: età, sesso, comorbidità.

Esiste però una correlazione tra il tipo di terapia immunosoppressiva, assunta dalla popolazione trapiantata, e la diminuita risposta anticorpale.

I pazienti che assumono una terapia immunosoppressiva combinata hanno sviluppato in media meno anticorpi rispetto ai pazienti trapiantati in monoterapia.

In particolare, è risultato che l'assunzione del farmaco immunosoppressivo MMF sia responsabile della ridotta risposta anticorpale.

## BIBLIOGRAFIA

1. <https://lab24.ilsole24ore.com/storia-coronavirus/>
2. Santacroce L, Bottalico L, Charitos IA. The Impact of COVID-19 on Italy: A Lesson for the Future. *Int J Occup Environ Med*. 2020 Jul 10;11(3):151-152. doi: 10.34172/ijoem.2020.1984. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32225178; PMCID: PMC7426732.
3. <https://statistichecoronavirus.it/>
4. Perlman S, Netland J: Coronavirus post-SARS: update on replication and pathogenesis, *Nat Rev Microbiol* 7:439-450, 2009.
5. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and SARS-CoV-2. *Turk J Med Sci*. 2020 Apr 21;50(SI-1):549-556. doi: 10.3906/sag-2004-127. PMID: 32293832; PMCID: PMC7195990.
6. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*. 2020 Apr;42(1):3-11. PMID: 32342926.
7. Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.552909
8. Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021;19(7):877-888. doi:10.1080/14787210.2021.1863146
9. [https://www.corriere.it/salute/malattie\\_infettive/20\\_maggio\\_17/coronavirus-che-cosa-indice-rt-che-differenza-c-l-r0-282d6a1e-9811-11ea-ba09-20ae073bed63.shtml](https://www.corriere.it/salute/malattie_infettive/20_maggio_17/coronavirus-che-cosa-indice-rt-che-differenza-c-l-r0-282d6a1e-9811-11ea-ba09-20ae073bed63.shtml).
10. Kim KD, Hwang I, Ku KB, Lee S, Kim SJ, Kim C. Progress and Challenges in the Development of COVID-19 Vaccines and Current Understanding of SARS-CoV-2- Specific Immune Responses. *J Microbiol Biotechnol*. 2020 Aug 28;30(8):1109-1115. doi: 10.4014/jmb.2006.06006. PMID: 32627758.
11. Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*. 2021 Apr;49(2):199-213. doi: 10.1007/s15010-020-01516-2. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32886331; PMCID: PMC7472674.

12. Gavriatopoulou M, Ntanasis-Stathopoulos I, Korompoki E, Fotiou D, Migkou M, Tzanninis IG, Psaltopoulou T, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clin Exp Med*. 2021 May;21(2):167-179. doi: 10.1007/s10238-020-00671-y. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33128197; PMCID: PMC7598940.
13. Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, Sohail MR, Mahmood SF, Ochani R, Hussham Arshad M, Kumar A, Surani S. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med*. 2021 Mar 1;29(1):20-36. PMID: 33664170.
14. Elrobaa IH, New KJ. COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. *Frontiers in Public Health*. 2021;9. doi:10.3389/fpubh.2021.711616
15. Omar AS, Kaddoura R, Orabi B, Hanoura S. Impact of COVID-19 pandemic on liver, liver diseases, and liver transplantation programs in intensive care units. *World Journal of Hepatology*. 2021;13(10):1215-1233. doi:10.4254/wjh.v13.i10.1215
16. <https://www.ilsole24ore.com/art/tutte-varianti-covid-dall-alfa-lambda-sorvegliata-speciale-AEB8mzc>
17. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Current Medical Science*. 2021;41(6):1037-1051. doi:10.1007/s11596-021-2395-1
18. <https://www.iss.it/cov19-omicron-cosa-sappiamo>.
19. Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol*. 2022 May;94(5):1825-1832. doi: 10.1002/jmv.27588. Epub 2022 Jan 23. PMID: 35023191; PMCID: PMC9015557.
20. <https://www.ilmessaggero.it/t/variante-omicron/>.
21. [salute.gov.it/portale](https://salute.gov.it/portale).
22. Sharma A, Balda S, Apreja M, Kataria K, Capalash N, Sharma P. COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;193:1835-1844. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016
23. Raman R, Patel KJ, Ranjan K. Covid-19: Unmasking emerging sars-cov-2 variants, vaccines and therapeutic strategies. *Biomolecules*. 2021;11(7). doi:10.3390/biom11070993

24. Fathizadeh H, Afshar S, Masoudi MR, et al. SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;188:740-750. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.076
25. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS- CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2020.
26. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020.
27. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2020.
28. Khandker SS, Godman B, Jawad MI, et al. A systematic review on covid-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(12). doi:10.3390/vaccines9121387
29. *Malattia Dell'apparato Digerente (Unigastro)*. Edizione 2019-2022.; 2019.
30. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014 May 17;383(9930):1749-61. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24480518.
31. Ganne-Carrié N: Epidemiology of liver cirrhosis. *La Revue du praticien* 2017 67(7):726-730.
32. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L: Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014 June 21; 20(23):7312-7324.
33. Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH: Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: how changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol* 2015 Apr; 62(1S):S121-S130.
34. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L: Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006; 44:217-231.
35. The Korean Association for the Study of the Liver: KASL clinical practice guidelines for liver cirrhosis: Ascites and related complications. *Clinical and Molecular Hepatology* 2018; 24:230-277.
36. Wijdicks EFM: Hepatic Encephalopathy. *N Engl J Med* 2016; 375:1660-1670.

37. Fukui H, Saito H, Ueno Y, Uto H, Obara K, Sakaida I, Shibuya A, Seike M, Nagoshi S, Segawa M, Tsubouchi H, Moriwaki H, Kato A, Hashimoto E, Michitaka K, Murawaki T, Sugano K, Watanabe M, Shimosegawa T: Evidencebased clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2015. *J Gastroenterol* 2016; 51:629-650.
38. Tsoris A, M. C. Use of Child Pugh Score in Liver Disease. *StatPearls Publ.* (2021).
39. Ping Li, Shuo Lin, L. L. Utility of MELD scoring system for assessing the prognosis of acute fatty liver of pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. 72 Reprod. Biol.* (2019).
40. Tranah TH, Kronsten VT, Shawcross DL. Implications and Management of Cirrhosis-Associated Immune Dysfunction Before and After Liver Transplantation. *Liver Transpl.* 2022 Apr;28(4):700-716. doi: 10.1002/lt.26353. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34738724.
41. Albillos A, Martin-Mateos R, Van der Merwe S, Wiest R, Jalan R, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Feb;19(2):112-134. doi: 10.1038/s41575-021-00520-7. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34703031.
42. Téllez L, Martín Mateos RM. COVID-19 and liver disease: An update. *Gastroenterología y Hepatología.* 2020;43(8):472-480. doi:10.1016/j.gastrohep.2020.06.006
43. Marjot T, Moon AM, Cook JA, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: an international registry study. *J Hepatol* 2020.
44. Su F. COVID-19 and Cirrhosis: A Combination We Must Strive to Prevent. *Gastroenterology.* 2021 Nov;161(5):1371-1373. doi: 10.1053/j.gastro.2021.08.037. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34453892; PMCID: PMC8384757.
45. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: liver transplantation. *J Hepatol.* 2016; 64:433-85.
46. Burra p, Giannini EG, Caraceni P, et al Specific issues concerning the management of patients on the waiting list and after liver transplantation. *Liver Int.* 2018 August; 38 (8): 1338-62.
47. Ramkissoon R, Wang XJ. The Impact of COVID-19 in Gastroenterology and Hepatology. *Journal of Clinical Gastroenterology.* 2021;55(9):757-765. doi:10.1097/MCG.0000000000001600

48. Becchetti C, Gschwend SG, Dufour JF, Banz V. Covid-19 in liver transplant recipients: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(17). doi:10.3390/jcm10174015
49. Dumortier J, Duvoux C, Roux O, et al. Covid-19 in liver transplant recipients: the French SOT COVID registry. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2021;45(4). doi:10.1016/j.clinre.2021.101639
50. Webb GJ, Marjot T, Cook JA, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in liver transplant recipients: an international registry study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5(11): 1008-16.
51. Kulkarni A v., Tevethia HV, Premkumar M, et al. Impact of COVID-19 on liver transplant recipients—A systematic review and meta-analysis. *eClinicalMedicine*. 2021;38. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101025
52. Valour F, Conrad A, Ader F, Launay O. Vaccination in adult liver transplantation candidates and recipients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2020 Apr;44(2):126-134. doi: 10.1016/j.clinre.2019.08.007. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31607643.
53. Chong PP, Avery RK. A Comprehensive Review of Immunization Practices in Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Ther* 2017; 39(8): 1581-98.
54. Stucchi RSB, Lopes MH, Kumar D, Manuel O. Vaccine Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation* 2018;102:S72–80.
55. Danziger-Isakov L, Kumar D, Practice AI Co. Vaccination of solid organ transplant candidates and recipients: Guidelines from the American society of transplantation infectious diseases community of practice. *Clinical transplantation* 2019; 33(9): e13563.
56. Harmala S, Parisinos CA, Shallcross L, O'Brien A, Hayward A. Effectiveness of influenza vaccines in adults with chronic liver disease: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2019; 9(9): e031070.
57. Danziger-Isakov L, Kumar D, AST ID Community of Practice. Vaccination of solid organ transplant candidates and recipients: Guidelines from the American society of transplantation infectious diseases community of practice. *Clin Transplant* 2019:e13563.
58. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, Davies EG, Avery R, Tomblyn M, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2014;58:309– 18.

59. Pani A, Romandini A, Schianchi A, et al. Antibody Response to COVID-19 Booster Vaccination in Healthcare Workers. *Frontiers in Immunology*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.872667
60. Eliakim-Raz N, Leibovici-Weisman Y, Stemmer A, Ness A, Awwad M, Ghantous N, Stemmer SM. Antibody Titers Before and After a Third Dose of the SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccine in Adults Aged  $\geq 60$  Years. *JAMA*. 2021 Dec 7;326(21):2203-2204. doi: 10.1001/jama.2021.19885. PMID: 34739043; PMCID: PMC8652594.
61. Shields AM, Faustini SE, Hill HJ, et al. Increased Seroprevalence and Improved Antibody Responses Following Third Primary SARS-CoV-2 Immunisation: An Update From the COV-AD Study. 2022;13:1. doi:10.3389/fimmu.2022.912571

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare l'U.O.C Gastroenterologia, presso la quale ho svolto questo lavoro di tesi, per avermi permesso di frequentare gli ambulatori e di conoscere parte dei pazienti presenti all'interno dello studio.

In particolare, ringrazio Paola per avermi aiutato e supportato durante questi mesi.

Ringrazio la mia famiglia: mia mamma Marisa, mio papà Nicola, mio fratello Erik, mia nonna Mirella e mio zio Marco, perché, nonostante la nostra sia una famiglia poco numerosa, non mi è mai mancato affetto e sostegno, soprattutto durante questi anni non sempre facili di Università.

Ringrazio poi le mie amiche di sempre Vanessa, Federica, Aurora ed Elena perché sono state per me un porto sicuro, dove potevo sempre tornare.

Ringrazio tutti i miei amici dell'Università e quelli conosciuti in Erasmus, specialmente Matteo, con il quale ho condiviso davvero tutto della fantastica esperienza tedesca.

Ringrazio i miei coinquilini Teresa e Gianni, che mi hanno fatto capire come casa possa essere ovunque e che la cosa importante è stare bene assieme.

Ed infine ringrazio Pier per essere stato sempre al mio fianco, per avermi consolato nei momenti più tristi e per aver condiviso con me quelli più belli.