

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE ONCOLOGICHE
E GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Prof. FABIO FARINATI

TESI DI LAUREA

Risposta anticorpale e cellulo-mediata al vaccino a mRNA anti-
SARS-CoV-2 in due coorti di pazienti con trapiantato di fegato o
trapianto di rene

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Burra

Co-relatore: Chiar.mo Prof. Francesco Paolo Russo

Laureanda: Agnolon Clara

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

ABBREVIAZIONI	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT.....	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	9
1.1 Struttura e Immunopatogenesi di SARS-CoV-2.....	9
1.2 COVID-19 nei trapiantati di fegato.....	13
1.2.1 Epatotropismo di SARS-CoV-2	13
1.2.2 Epidemiologia, fattori di rischio e severità dell’infezione	14
1.2.3 Ruolo protettivo degli immunosoppressori.....	16
1.3 COVID-19 nei trapiantati di rene.....	19
1.3.1 Danno tubulo-interstiziale e insufficienza renale acuta	19
1.3.2 Epidemiologia e severità dell’infezione nei pazienti con CKD e trapiantati di rene.....	20
1.4 Impatto della COVID-19 sulle liste d’attesa al trapianto.....	21
1.5 Immunogenicità dei trapiantati al vaccino a mRNA BNT162b2 contro SARS- CoV-2.....	23
1.5.1 Vaccini a mRNA e risposta immunologica indotta negli immunocompetenti.....	23
1.5.2 Efficacia verso le “Variants of Concern”	26
1.5.3 Ridotte risposte anticorpali dei trapiantati di fegato e rene ai vaccini	28
1.5.4 Risposta Th1 nei trapiantati di fegato e rene.....	31
1.6 Efficacia della vaccinazione nei trapiantati.....	31
CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO	33
2.1 Obiettivi primari.....	33

2.1.1	Immunoglobuline anti-Spike e anti-nucleocapside	33
2.1.2	Cellule T produttori IFN- γ e IL-2.....	33
2.2	Obiettivi secondari.....	34
2.2.1	Anticorpi diretti verso altri Coronavirus.....	34
2.2.2	Selettività degli anticorpi verso le varianti di SARS-CoV-2.....	34
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI		35
3.1	Popolazione di studio	35
3.2	Procedure di raccolta e conservazione dei campioni ematici	36
3.3	Analisi del titolo anticorpale.....	36
3.4	IFN- γ / IL-2 FluoroSpot	37
3.5	Analisi statistiche.....	38
CAPITOLO 4: RISULTATI.....		41
4.1	Caratteristiche della popolazione di studio.....	41
4.1.1	Caratteristiche generali	41
4.1.2	Caratteristiche dell'immunosoppressione.....	43
4.1.3	Cause di trapianto nelle due coorti	44
4.2	Analisi integrata delle risposte al vaccino	45
4.3	Valutazione e confronto degli anticorpi nei due gruppi	46
4.3.1	Analisi aggiustate in base all'immunosoppressione	49
4.4	Risposta cellulare: valutazione cellule T produttori IFN- γ / IL-2	50
4.5	Valutazione anticorpi contro le varianti e altri ceppi di Coronavirus	53
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE		57
5.1	Punti di forza e limiti dello studio	61
5.2	Prospettive future e implicazioni cliniche	62
CAPITOLO 6: CONCLUSIONI		65
Bibliografia.....		67

ABBREVIAZIONI

Abs: Anticorpi

ACE2: *Angiotensin-converting enzyme 2*

ADPKD: *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*

AIFA: Associazione Italiana Farmaco

APC: *Antigen Presenting Cell*

ARDS: *Acute Respiratory Distress Syndrome*

AST: Aspartato-amminotransferasi

ATG: *Anti Thymocyte Globulin*

BMI: *Body Mass Index*

BPCO: Broncopneumopatia cronico-ostruttiva

CAID: *Cirrhosis associated immune dysfunction*

CD: *Cluster of Differentiation*

CKD: *Chronic Kidney Disease*

CNI: *Calcineurin inhibitors*

CNT: Centro Nazionale Trapianti

CoV: Coronavirus

COVID-19: *Coronavirus Disease*

DILI: *Drug-Induced Liver Injury*

EASL: *European Association for the Study of the Liver*

EDTA: Acido Etilendiamminotetraacetico

eGFR: *Glomerular Filtration Rate*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESKD: *End stage kidney disease*

GGT: Gamma-Glutamil-Transferasi

HBV: *Hepatitis B Virus*

HCV: *Hepatitis C Virus*

HDV: *Hepatitis D Virus*

IC: Intervallo di confidenza

IFN- γ : Interferone gamma

IgG: Immunoglobuline G

IL-2: Interleuchina 2
IL-6: Interleuchina 6
IL-10: Interleuchina 10
ISS: Istituto Superiore di sanità
KT: *Kidney Transplant recipients*
MALT: *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*
MFI: *Mean Fluorescence Intensity*
MHC: *Major Histocompatibility Complex*
MMF: Micofenolato Mofetile
mTOR: *Mechanistic Target of Rapamycin*
NC: Antigene Nucleocapsidico
NSP1: *SARS-CoV-2 non-structural protein 1*
OMS: Organizzazione Mondiale della sanità
PBC: *Primary biliary cholangitis*
PBS: *Primary sclerosing cholangitis*
PBS : *Phosphate buffered saline*
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PCA: *Principal Component Analysis*
PCR: Proteina C Reattiva
PD-1: *Programmed cell-Death protein*
RAAS: *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*
RBD: *Receptor Binding Domain*
RPM: *Rotations Per Minute*
SFU: *Spot Forming Unit*
TMPRSS2: *Transmembrane protease, serine 2*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α*
UOC: Unità Operativa Complessa
UOSD: Unità Operative Semplici di Dipartimento
VOC: *Variants of Concern*
VOI: *Variants of Interest*

RIASSUNTO

Introduzione:

L'efficacia e l'immunogenicità indotta dal vaccino a mRNA BNT162b2 nei trapiantati, sono state indagate da alcuni studi preliminari che hanno mostrato una minor risposta sia umorale che cellulare in questa popolazione. Tuttavia è necessario confrontare l'entità della risposta immunitaria al vaccino tra trapiantati di fegato e rene per stabilire il ruolo che ha il tipo di organo trapiantato e le diverse terapie immunosoppressive nell'indurre la risposta.

Scopo:

Questo studio multicentrico longitudinale prospettico mira a confrontare le risposte tra trapiantati di fegato e rene verificando che questi ultimi abbiano gli esiti peggiori. Gli *outcomes* principali sono:

- I. Quantificare le IgG contro quattro epitopi della proteina Spike (S) e del nucleocapside (NC) di SARS-CoV-2 prima della prima (T0) e della seconda dose (T1), dopo tre settimane da quest'ultima (T2)
- II. Quantificare le cellule T produttrici IFN- γ e IL-2 dirette contro la proteina Spike

Gli *outcomes* secondari sono:

- I. Valutare i livelli di anticorpi diretti contro gli altri Coronavirus
- II. Valutare la risposta alle principali varianti di SARS-CoV-2

Materiali e metodi:

La popolazione di studio comprende 102 trapiantati: 52 di rene e 50 di fegato (seguiti dall'UOC "Chirurgia dei Trapianti di Rene e Pancreas" e dall'UOSD "trapianto multiviscerale" dell'Azienda Ospedale-Università di Padova). Ogni paziente è stato vaccinato con BNT162b2 tra Marzo e Aprile 2021. Sono stati raccolti campioni di sangue prima della prima dose (T0), 21 giorni dopo la prima dose (T1, eseguito prima della seconda) e infine a 3 settimane dalla seconda dose. A partire dal siero dei pazienti si è eseguita l'analisi quantitativa delle IgG con

LABScreen™ COVID Plus ®. I campioni di PMBC sono stati analizzati invece con *IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays*. Sono state utilizzate equazioni di stima generalizzate per confrontare in ciascun time point i livelli di anticorpi e conta cellulare e analisi di regressione lineare multipla per aggiustare nei due gruppi i risultati in base all'immunosoppressione.

Risultati

Considerando l'incremento di IgG anti-RBD come indicatore della risposta anticorpale complessiva, questo è maggiore nei trapiantati di fegato in T2 rispetto a quelli di rene (la media di MFI è 6056 nei trapiantati di rene e 19617 in quelli di fegato $P < 0.001$). L'89.6% dei trapiantati di fegato ha risposto all'immunizzazione contro solo il 38.0% dei trapiantati di rene (sono considerati "responsivi" pazienti con MFI di almeno +8800). Aggiustando i dati in base all'immunosoppressione la differenza resta significativa ($P < 0.01$). Analogamente i linfociti T produttori *IFN- γ* anti-Spike al T2 sono aumentati maggiormente nei trapiantati di fegato (27.9 vs 10.9 *IFN- γ SFUs/5x10⁵ cellule*, $P = 0.021$), differenza che in questo caso non resta significativa dopo l'aggiustamento in base all'immunosoppressione ($P = 0.31$). Confrontando poi la risposta cellulare tra i responsivi e non responsivi si vede come i primi abbiano più elevati livelli di cellule T *IFN- γ* secernenti (26.2 vs 9.3 *IFN- γ SFUs/5x10⁵ cellule*), dimostrando in parte una correlazione tra le due risposte. Gli anticorpi sviluppati sono efficaci anche contro le varianti di SARS-CoV-2 mentre le risposte anticorpali verso gli altri ceppi virali non sono correlate all'immunizzazione e non hanno differenze significative tra i due gruppi.

Conclusioni

Dallo studio è emerso che i trapiantati di fegato sviluppano, in seguito alla vaccinazione con BNT162b2, risposte sia anticorpali che cellulari migliori dei trapiantati di rene indipendentemente dall'immunosoppressione (che sembra incidere comunque maggiormente sulla risposta cellulare). Questi risultati suggeriscono che il tipo di organo trapiantato è un fattore che intrinsecamente influisce sull'esito della profilassi.

ABSTRACT

Background:

Low immunogenicity induced by BNT162b2 in transplant recipients has already been investigated from other studies. However the antibody and T cell responses after vaccination have never been compared between kidney and liver recipients. This study also want to determine the role of immunosuppression therapy and type of organ transplanted to elicited humoral and cellular vaccine response.

Outcomes:

This multicenter, prospective, observational study has got different aims. Primary outcomes are:

- I. To measure anti-SARS-CoV-2 IgG levels against full Spike, S1, S2, RBD, Nucleocapside antigen. Antibodies will be evaluated at the time of first dose (T0), the time of second dose (T1) and finally after three weeks from second injection (T2).
- II. To quantify IFN- γ / IL-2 T cells reactive against Spike.

Secondary outcomes are:

- III. To evaluate antibodies' levels against non-SARS-CoV-2 Coronaviruses.
- IV. To evaluate humoral vaccine responses to mains variants.

Materials and Methods:

The study population included 102 transplant recipients: 50 liver and 52 kidney recipients followed by “Multivisceral Transplant Unit-Gastroenterology” and “Kidney and Pancreas Transplantation Unit” in University Hospital of Padua. Every patients received BNT162b2 vaccine between March and April 2021. Blood samples were collected at T0, T1 and T2. Using LABScreen™ COVID Plus®, we measured IgG against epitopes of SARS-CoV-2, variants, and common Coronavirus in serum of patients. We quantified IFN- γ /IL-2 T cells from PBMCs with IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays. Generalized estimating equations were used

to compare at each time points the proportions of antibody responders, MFI levels and the spot counts of FluoroSpot. Multivariable generalized linear models were used to adjust for the differences in immunosuppression between two groups.

Results

We considered RBD IgG against RBD as surrogate marker of all other antibodies response. In liver transplant recipients these IgG increased significantly more than in kidney recipients (mean MFI is 6056 in KT and 19617 in LT $P < 0.001$). At T2 89.6% of LT are “Responder” despite only 38.0% of KT. (MFI threshold for positivity: +8800). After adjustment these differences between LT and KT remained significant. ($P < 0.01$) Likewise anti-Spike T2/IFN- γ -producing T cells increased significantly more in LT (27.9 vs 10.9 IFN- γ SFUs / 5×10^5 cells, $P = 0.021$), a difference that not remained significant after adjustments ($P = 0.31$). Comparing cellular responses between “responders” and non-responders, we see that responders have higher levels of IFN- γ secreting T cells (26.2 vs 9.3 IFN- γ SFUs / 5×10^5 cells). Elicited antibodies recognized all variants but with lower strength than Wild Type. Antibody levels against other Coronavirus are not related with vaccination.

Conclusion

Liver transplant recipients develop stronger humoral and cellular responses to SARS-CoV-2 vaccine (BNT162b2) than kidney transplant recipients, a phenomenon that is not completely explained by different immunosuppressive therapy. These results suggest that the type of organ transplanted is a factor that influenced both humoral and cellular vaccine responses.

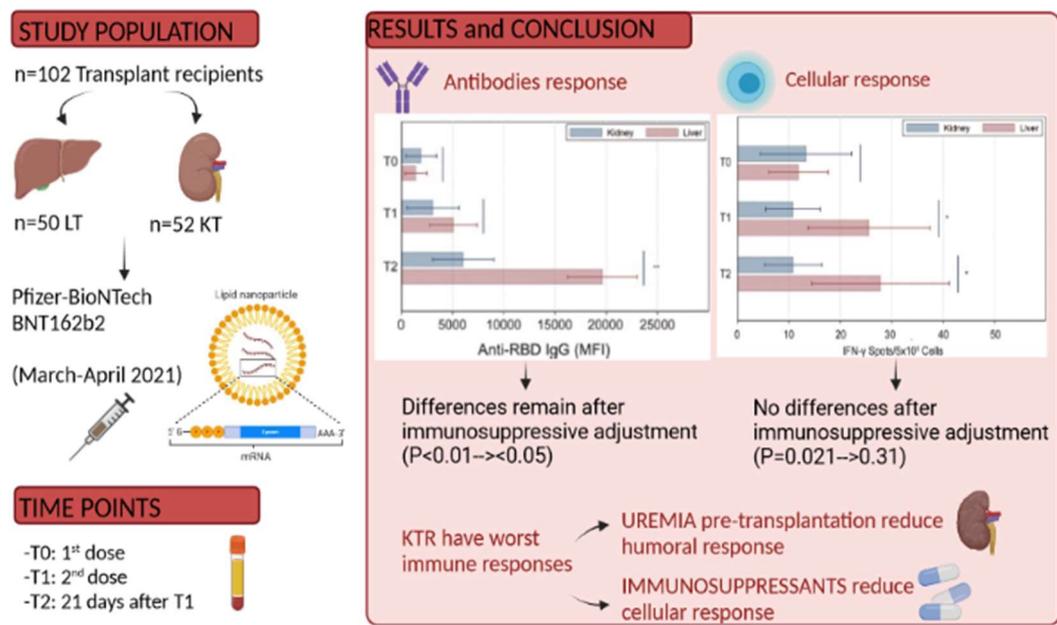


Figura 1: Graphical Abstract

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Struttura e Immunopatogenesi di SARS-CoV-2

SARS-CoV-2, è un virus con *Envelope* a singolo filamento positivo di RNA, appartenente alla famiglia dei *Coronaviridae* e responsabile della più recente pandemia, dichiarata dall'OMS l'11 marzo 2020. Il suo RNA codifica per 15 proteine non strutturali deputate alla replicazione e alla trascrizione dell'RNA virale; per 8 proteine accessorie e infine per 4 proteine strutturali: proteine della membrana, del nucleocapside, dell'*Envelope* e la proteina Spike.

La proteina Spike è un trimero i cui monomeri sono formati da due subunità: S1 e S2. La prima subunità contiene il *Receptor Binding Domain* (RBD) il quale entra in contatto diretto con i recettori ACE2 umani per l'ingresso del virus nelle cellule. L'S2 è fondamentale per la fusione della membrana del virus con quella cellulare. Le subunità di Spike hanno quindi un ruolo cruciale non solo nell'instaurare l'infezione, ma anche nel determinare il tropismo del virus verso molteplici tessuti. ACE2, target di Spike, è infatti situato non solo sulla membrana degli pneumociti di tipo II (cellula più coinvolta) ma anche nell'endotelio, negli epatociti, nei colangiociti, nelle cellule della mucosa intestinale, nelle cellule tubulari renali e molte altre. Le mutazioni di RBD che caratterizzano le differenti varianti di SARS-CoV-2 garantiscono una maggior affinità con ACE-2 rendendo conto dell'aumento della trasmissibilità di alcune *Variants of Concern* (VOC).

Conseguentemente all'interazione RBD-ACE-2 il virus entra nella cellula e alcune proteasi tra cui TMPRSS2 proteolizzano le Spike e l'*Envelope* rilasciando l'RNA virale all'interno delle cellule infettate. Si scatena in risposta a questo meccanismo un processo infiammatorio (inizialmente solo localizzato), un'attivazione endoteliale e una risposta citochinica incontrollata [1].

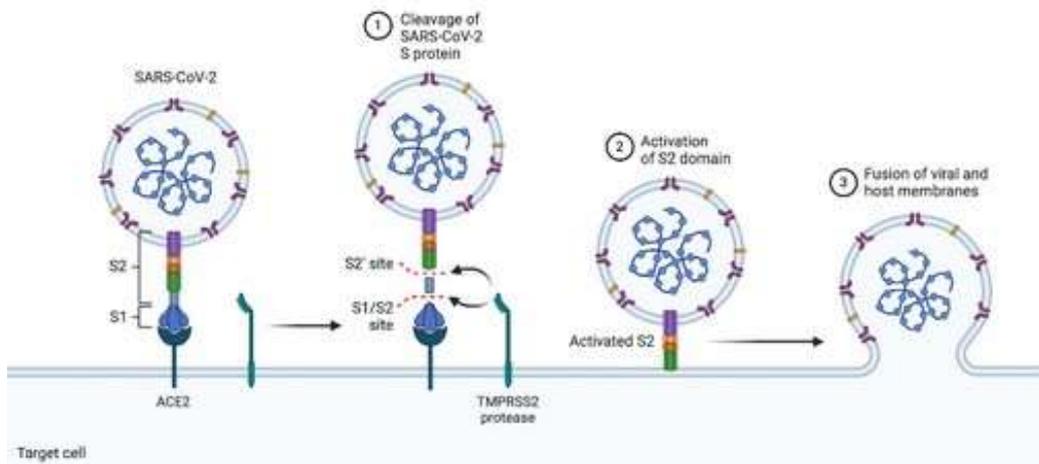


Figura 2: Meccanismo di ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule

Più nello specifico, dal punto di vista immunologico, il virus tenta inizialmente di evadere il sistema immunitario dell'ospite attraverso l'inibizione della produzione linfocitaria di IFN- γ e l'aumento di citochine inibitorie quali IL-10 e PD1. Questo garantisce una rapida replicazione virale. Nella fase acuta dell'infezione c'è anche linfopenia con riduzione marcata di cellule T CD4+ e CD8+ dovuta all'effetto citotossico diretto di SARS-CoV-2 e sostenuta poi dalla prolungata infiammazione che ha effetto di *downregulation* sui linfociti T. A questo si aggiunge l'inibizione del sistema di presentazione antigenica di MHC I e II che comporta riduzione dell'attivazione delle cellule T, le quali assumono principalmente un profilo inibitorio Th2. A questa prima fase "immunosoppressiva", che ha lo scopo di favorire una viremia incontrollata, segue una fase di "iperinfiammazione" causata dalla viremia stessa. Questa provoca infatti l'incremento di numerose citochine, chemochine e proteine di fase acuta tra cui IL-1, IL-6, TNF- α , PCR, ferritina. Questa "*cytokine storm*" richiama neutrofili, macrofagi e mastociti soprattutto a livello polmonare dove gli pneumociti di tipo II sono i primi ad essere danneggiati. Conseguono una mancata produzione di surfattante e perdita dell'integrità della membrana alveolo-capillare che portano ad edema e fibrosi polmonare e ARDS.

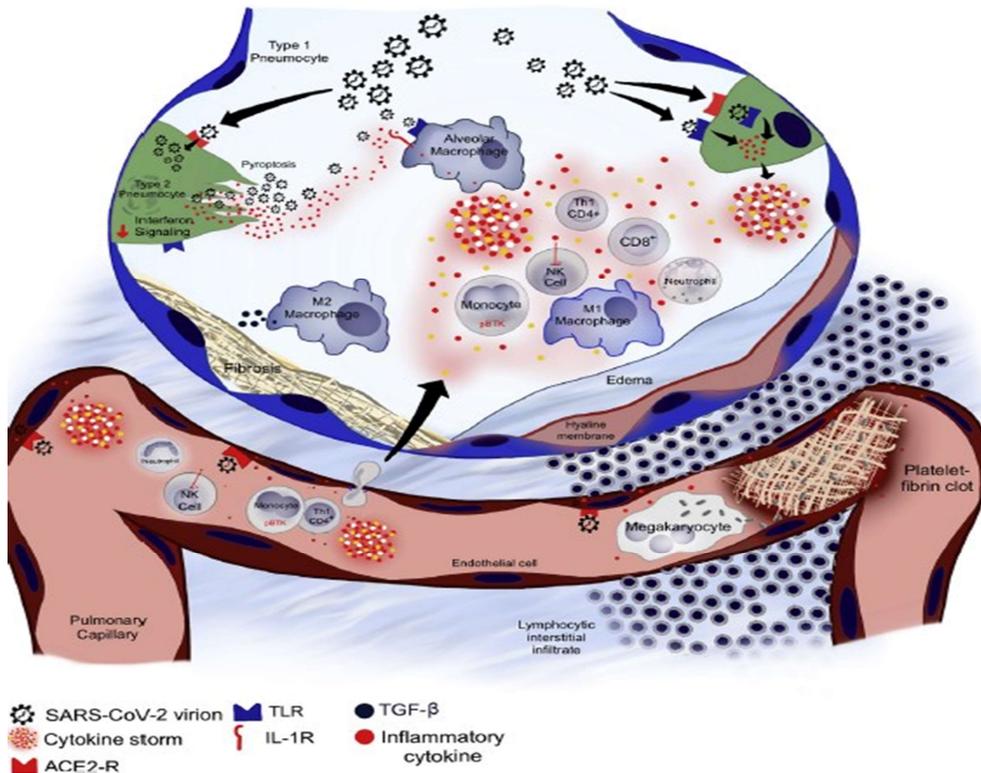


Figura 3: Patogenesi del danno polmonare da SARS-CoV-2: il virus infetta gli pneumociti II che producono citochine richiamanti leucociti. Aumenta la permeabilità dei capillari dove si formano microtrombi. L'esito è edema e fibrosi polmonare.

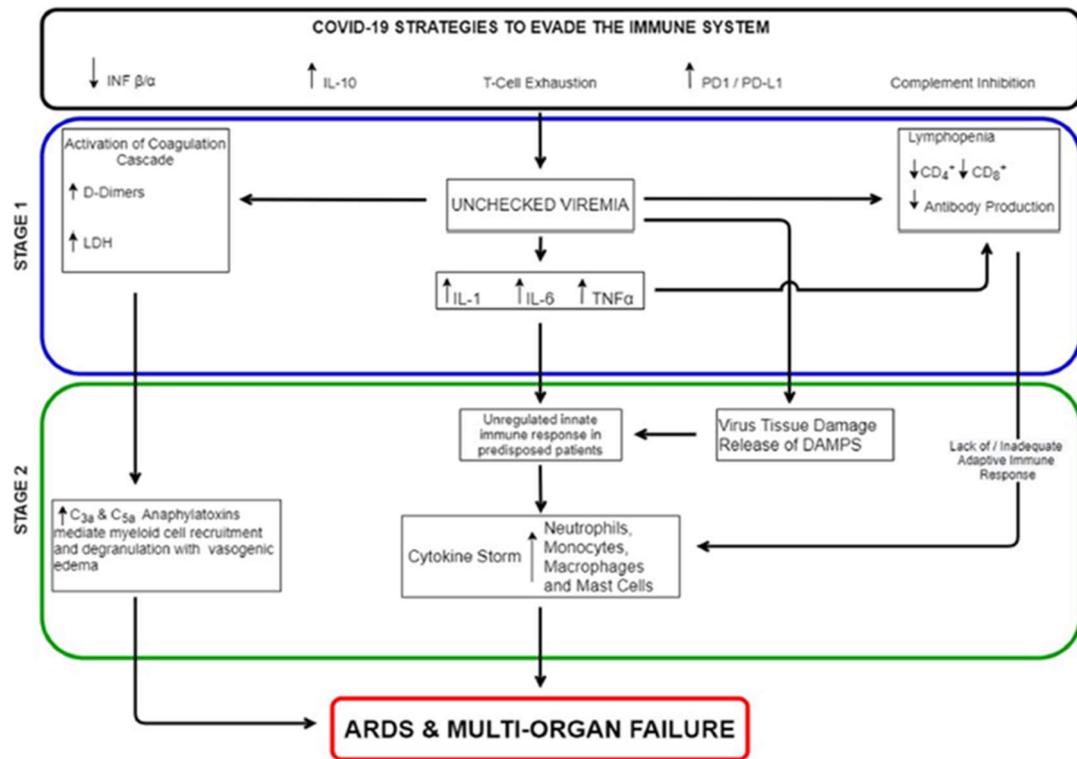


Figura 4: Fasi immunopatogenetiche dell'infezione di SARS-CoV-2

giorno. I *targets* anticorpali sono principalmente S1 (soprattutto RBD) ed S2 e questi anticorpi, poiché impediscono l'ingresso del virus nella cellula sono definiti "neutralizzanti". Le immunoglobuline dirette verso le proteine non strutturali hanno invece un ruolo minoritario e hanno scarse capacità neutralizzanti.

L'eterogeneità della risposta umorale all'infezione e la sua scarsa durata sono i punti critici dell'efficacia immunitaria nel prevenire effetti gravi dell'infezione e una futura re-infezione.

Una precoce risposta cellulare mediata dalle cellule T riuscirebbe a prevenire l'infezione, ma nella maggior parte dei pazienti francamente sintomatici c'è linfopenia e l'espansione delle cellule T è rallentata. Questo favorisce una maggior iperinflammazione portando quindi ad un circolo vizioso che alimenta la *cytokine storm*. L'entità della risposta cellulare sembra essere inversamente proporzionale alle concentrazioni di IL-6 e altre citochine.

In conclusione lo sbilanciamento tra un'esagerata risposta immunitaria innata e ridotta e inefficace risposta adattativa creano un danno tissutale che si somma al danno diretto del virus citopatico SARS-CoV-2. [2] [3] [4] [5]

1.2 COVID-19 nei trapiantati di fegato

1.2.1 Epatotropismo di SARS-CoV-2

I sintomi della COVID-19 riferiti dai trapiantati di fegato sono simili a quelli della popolazione generale: i principali sono febbre, astenia, tosse. Sono tuttavia maggiormente rappresentati anche sintomi gastrointestinali quali vomito diarrea, dolore addominale (nel 30% circa dei trapiantati contro 12% dei non trapiantati). Il virus è in grado infatti di infettare e replicare negli enterociti (che hanno un'elevata espressione di ACE-2) e riesce a persistere nel loro interno anche per molti mesi dopo l'infezione.

Meno certa è la capacità di replicazione all'interno degli epatociti. ACE-2 è scarsamente presente negli epatociti mentre è più espresso nei colangiociti. Tuttavia nella popolazione generale, come nei trapiantati di fegato si riscontrano alterazioni

degli indici di epatocitolisi oltre che di colestasi, segni di un possibile danno epatico conseguente all'infezione.

Si ha infatti un rialzo moderato delle transaminasi (soprattutto AST, sopra il cut-off di 1-2 volte) associato anche a modesto incremento di GGT che sembrano essere transitorie e indipendenti dalla pregressa funzionalità epatica.

Il danno epatico da SARS-CoV-2 ha eziologia tutt'ora non del tutto chiara ma si pensa che più fattori siano responsabili. Per citarne alcuni, i principali sono: esagerata risposta infiammatoria, trombosi, danno virale diretto. I reperti istologici riportati da biopsie epatiche mostrano steatosi microvescicolare, infiammazione lobulare e portale e trombosi microvascolare, quadro anatomo-patologico aspecifico che in parte è simile a quello di una *Drug-Induced liver injury* (DILI). [6] Spesso il rialzo delle transaminasi si verifica in pazienti che hanno elevati livelli di PCR e IL-6. Tuttavia mentre i livelli di queste citochine sono correlate a forme severe di malattia, le transaminasi hanno significato prognostico incerto: non è chiaro se il rialzo degli enzimi epatici sia associato ad un aumento di mortalità. Certo è il fatto che nei trapiantati di fegato non c'è un maggior rialzo delle transaminasi rispetto ai sani né maggior rischio di rigetto in conseguenza all'infezione. [7]

1.2.2 Epidemiologia, fattori di rischio e severità dell'infezione

A distanza di due anni dall'inizio della pandemia in Italia si contano in totale 16.915.301 casi e 164.846 decessi per COVID-19. La *positivity rate* (cioè il rapporto tra la percentuale di positivi al test antigenico o molecolare rispetto al totale di test effettuati) si attesta attorno al 14.57%. (dati riferiti a maggio 2022). Attualmente la *mortality rate* o (*case fatality rate*) si attesta a meno dell'1% mentre durante la prima ondata (marzo 2020) era circa del 15-22%. [8] [9]

Dal momento che la risposta immunitaria dei trapiantati, per via dell'immunosoppressione, è subottimale si pensava che questi soggetti fossero maggiormente vulnerabili a forme severe di COVID-19, come per altre infezioni. I

dati epidemiologici suggeriscono al contrario che i trapiantati di fegato, pur avendo tassi di incidenza più elevati, hanno forme severe di infezione (tali che richiedano ammissione in terapia intensiva, intubazione e ventilazione meccanica) nonché tassi di mortalità paragonabili o addirittura inferiori alla popolazione generale. La mortalità riferita alla prima ondata oscilla infatti, a seconda degli studi considerati, tra 12 e 25%. [7] [10] [11]. Il maggior numero di diagnosi di COVID-19 nei trapiantati di fegato può in parte essere spiegata dai monitoraggi serrati a cui devono sottoporsi questi soggetti, alla frequenza più assidua degli ambienti ospedalieri (possibili zone di contagio).

Dato che i tassi di ospedalizzazione e la mortalità per COVID-19 sono paragonabili popolazione generale, l'immunosoppressione dovuta al trapianto e il trapianto di fegato stesso non costituiscono fattori di rischio per forme severe di malattia.

Al contrario, come per i non trapiantati, sono fattori di rischio l'età avanzata, l'obesità, ipertensione arteriosa, diabete mellito, insufficienza renale cronica, BPCO, cardiopatia ischemica. L'obesità e la sindrome metabolica favoriscono la *cytokine storm* in due modi: elevati livelli di acidi grassi ematici stimolano il rilascio di interleuchine; la produzione di leptina da parte degli adipociti porta a incremento di IFN- γ . [2] I pazienti diabetici hanno tipicamente disfunzioni del sistema immunitario che li rendono maggiormente suscettibili alle infezioni in generale ed è evidente anche per SARS-CoV-2. Il virus interferisce inoltre con il sistema renina-angiotensina-aldosterone in quanto sfrutta ACE-2 per il suo ingresso e impedisce che questo enzima converta l'Angiotensina I in 1-9 avente ruolo anti-infiammatorio. I soggetti con ipertensione essenziale che hanno iperattivazione del RAAS sembrano per questo motivo più a rischio di morte per Coronavirus. [12] Per i diversi meccanismi sopraelencati le comorbidità dei pazienti quindi determinano in gran parte la severità della COVID-19.

Anche alcune caratteristiche riguardanti il trapianto possono però influire sulla severità dell'infezione. I pazienti con trapianto recente (da meno di un anno) sviluppano sintomi più lievi verosimilmente a causa dei dosaggi più elevati di immunosoppressori. [10] Il tipo di organo trapiantato è rilevante: i trapiantati di fegato sembrano avere minor incidenza e mortalità per COVID-19 rispetto ai

trapiantati di cuore, polmone e rene. [13] Infine il fattore più controverso e dibattuto riguarda l'immunosoppressione, tematica che verrà approfondita nel paragrafo successivo.

Il trapianto di fegato quindi non costituisce un fattore di rischio indipendente per maggiori complicanze ed *exitus* per COVID-19 ma eventuali forme gravi di malattia sono imputabili invece alle comorbidità specifiche dei singoli pazienti.

1.2.3 Ruolo protettivo degli immunosoppressori

A causa dell'immunosoppressione i trapiantati hanno maggior incidenza di infezioni soprattutto virali (in primis da Epstein-Barr, Citomegalovirus, virus influenzali) e di neoplasie. A differenza dei virus citati però, i meccanismi di danno di SARS-CoV-2 sono solo in parte dovuti al virus stesso: come visto, l'iperinfiammazione e la de-regolazione del sistema immunitario giocano un ruolo chiave. La terapia immunosoppressiva avrebbe quindi il vantaggio di limitare i danni legati alle cellule immunitarie. Tuttavia è ancora dibattuto un'eventuale effetto negativo sulla diffusione virale e se ci sono differenze tra i vari farmaci.

Le terapie immunosoppressive utilizzate nel trapianto di fegato agiscono su differenti vie di segnale per la proliferazione e attivazione dei linfociti T. Si contano cinque diverse categorie di farmaci a seconda del meccanismo d'azione specifico: corticosteroidi, inibitori della Calcineurina, inibitori della sintesi delle purine, inibitori di mTOR, anticorpi monoclonali verso CD3 e CD25. I corticosteroidi hanno azione antinfiammatoria e immunosoppressiva riducendo l'attività dei macrofagi e dei linfociti T. Vengono prescritti principalmente nel primo periodo post-trapianto e sospesi entro 3 mesi. Gli inibitori della calcineurina sono invece Tacrolimus e Ciclosporina, farmaci che agiscono a livello di un enzima citoplasmatico dei linfociti T bloccando la trascrizione e produzione di IL-2. Questa è la categoria di immunosoppressori più usata nei trapianti. Gli immunosoppressori antimetaboliti comprendono invece Azatioprina, un analogo purinico che inibisce la sintesi di DNA nei linfociti T (non più molto usato) e Micofenolato Mofetile (MMF), farmaco che inibisce la sintesi delle guanine nei linfociti T e B. Questo è spesso usato in combinazione con altri immunosoppressori come Tacrolimus e

Ciclosporina per ridurre i dosaggi. Gli inibitori di mTOR sono i farmaci di più recente introduzione: Sirolimus ed Everolimus. Questi inibiscono il signalling mediato da IL-2 necessario per la progressione dei linfociti T alla fase S del ciclo cellulare. Gli anticorpi antilinfocitari infine sono utilizzati invece nel primo periodo post-trapianto per indurre l'immunosoppressione e in caso di rigetto acuto; hanno come target il recettore CD3 o il recettore per IL-2 nei linfociti (Basiliximab). [14] Attualmente le linee guida EASL suggeriscono in generale di non ridurre l'immunosoppressione nei trapiantati di fegato positivi a SARS-CoV-2 ma sono state evidenziate differenze (non ancora universalmente confermate) negli effetti dei vari immunosoppressori. [15]

I farmaci che sembrano legati ad una riduzione nella severità dell'infezione sono soprattutto gli inibitori della Calcineurina e gli inibitori di mTOR, ma sono prevalentemente questi ultimi ad essere associati a riduzione della mortalità. [16]

La pathway di mTOR, coinvolta in processi cellulari fondamentali come metabolismo, replicazione, sintesi proteica, apoptosi e regolazione immunitaria, viene sfruttata da molti virus a RNA. Nel caso specifico di SARS-CoV-2 il virus attiva la via a vari livelli in modo da sfruttare l'apparato di trascrizione della cellula infettata e aumentare la sintesi proteica virale. La via di mTOR viene inoltre attivata dall'IL-6 prodotta durante la *cytokine storm* con scopo di amplificare il rilascio di citochine. Per questi motivi e vista la ridotta mortalità per COVID-19 nei trapiantati che fanno uso di mTORi, è stato addirittura suggerito da alcuni studiosi l'uso terapeutico di Everolimus e Sirolimus nelle forme gravi di COVID-19. [16] [17] [18]

I CNIs invece hanno un duplice ruolo protettivo: inibiscono la replicazione virale e riducono la risposta immunitaria. La replicazione e la diffusione del virus è ostacolata con diversi meccanismi. Il principale è legato al legame con la Ciclofilina A, isomerasi citoplasmatica umana alla quale si lega la ciclosporina per inibire la Calcineurina. La Ciclofilina e un recettore di membrana (CD147) interagiscono con NSP1, proteina non strutturale di SARS-CoV-2 importante per garantire la replicazione virale e la sintesi delle proteine virali. I CNIs inibiscono inoltre la proteasi TMPRSS2 con cui interagisce il virus per liberare l'RNA da replicare. Infine questi immunosoppressori sembrano frenare il rilascio di citochine da parte

dei linfociti T riducendo il signalling di NF-kB e quindi la produzione di IL-2. L'uso di Tacrolimus e Ciclosporina sembrano quindi essere protettivi verso forme severe di COVID-19. [18] [19] [20] [21] [22]

Anche i corticosteroidi hanno effetti positivi avendo azione antinfiammatoria che contrasta la tempesta citochinica. Riducono inoltre l'attivazione macrofagica. Attualmente le linee guida AIFA raccomandano di prescrivere soprattutto Desametasone (anche se in realtà altri corticosteroidi hanno mostrato i medesimi benefici) solo in pazienti con severità della COVID-19 tale da richiedere supplementazione di ossigeno. È sconsigliato l'uso degli steroidi in qualunque paziente positivo al virus in quanto sembra aumentare la durata della viremia e favorire sovrainfezioni batteriche. Oltre a ciò i corticosteroidi sono gravati da importanti effetti collaterali quali ipertensione, iperglicemia, osteoporosi e il loro uso va quindi riservato solo a quei pazienti in cui è evidente un beneficio. I pazienti trapiantati in terapia con steroidi beneficiano dell'effetto antinfiammatorio e sembrano essere protetti da forme severe di infezione. [23]

L'unica categoria di immunosoppressori che aumenta il rischio di forme severe di COVID-19 è quella degli antimetaboliti. Questi agiscono sopprimendo in maniera rilevante la proliferazione dei linfociti T e B. Il MMF, in particolare a dosaggi superiori a 1000 mg/die è considerato fattore di rischio per complicanze dell'infezione. Questo si deve ad un effetto sinergico del farmaco con SARS-CoV-2 nell'indurre linfopenia e trombocitopenia. In un paziente con COVID-19 in terapia con questo farmaco si potrebbe quindi considerarne la riduzione o addirittura la sospensione. [18] [11]

In definitiva non andrebbero ridotte o sospese le terapie immunosoppressive nei trapiantati con COVID-19 (che risultano anzi avere un ruolo protettivo) tranne nei casi in cui il paziente abbia severe linfopenie o sovrainfezioni batteriche; se il paziente assume MMF si può valutarne la riduzione o sostituzione con un altro agente immunosoppressivo. È necessario comunque monitorare sempre i livelli di farmaco nel sangue soprattutto se al paziente vengono somministrati farmaci per COVID-19, quali ad esempio Idrossiclorochina, inibitori delle proteasi, Remdesivir, che potrebbero avere interazioni con gli immunosoppressori. Nonostante sia stato ipotizzato l'uso terapeutico di alcuni immunosoppressori

(soprattutto mTORi) per la COVID-19 nessuno studio ha tutt'ora confermato questo uso. [11] [17]

1.3 COVID-19 nei trapiantati di rene

1.3.1 Danno tubulo-interstiziale e insufficienza renale acuta

L'insufficienza renale acuta, testimoniata da un rialzo della creatinina plasmatica, ma anche da proteinuria, è evidenziata in circa il 27% dei pazienti con COVID-19. Si sviluppa soprattutto in pazienti con età avanzata, ipertensione o che hanno già riduzione della funzionalità renale. [24]

I principali riscontri anatomico-patologici renali al microscopio ottico consistono in un danno epiteliale tubulare acuto, atrofia tubulare, perdita dell'orletto a spazzola, vacuolizzazione cellulare. Si ha inoltre, a livello tubulo-interstiziale, importante infiltrazione leucocitaria e nei capillari peri-tubulari aggregati di eritrociti. Aumentando la risoluzione con l'uso di microscopio elettronico si apprezzano proteine nucleari di SARS-CoV-2 nel citoplasma dell'epitelio tubulare prossimale e danno ai podociti. All'immunofluorescenza si riscontrano infine depositi di proteine del complemento: C5b-9.

Il meccanismo di danno renale sembra essere, alla luce dei riscontri anatomico-patologici, multifattoriale: si combina il danno virale diretto con un danno indiretto causato dalla risposta immunitaria, dal complemento e dall'ipossia. ACE-2 è espresso a livello tubulare renale, soprattutto nel tubulo contorto prossimale; il virus essendo citopatico, crea un danno diretto all'epitelio tubulare durante la replicazione. Questo è testimoniato dal riscontro con microscopio elettronico di proteine del nucleocapside virale e particelle simil-virali in queste cellule. In particolare sembra che il virus colpisca primariamente i podociti alterando la membrana di filtrazione glomerulare. Questo trova conferma dal riscontro in molti pazienti (44% dei pazienti ospedalizzati) di proteinuria [25]. I glomeruli sembrano invece maggiormente preservati in quanto è minore l'espressione di ACE-2 a questo livello.

SARS-CoV-2 inoltre richiama a livello tubulo-interstiziale elevati livelli di macrofagi che producono citochine pro-infiammatorie. Altro meccanismo contribuente al deterioramento della funzionalità renale è legato all'iperattivazione della via alternativa del complemento: il complesso C5b-9 attivato si deposita nell'orletto a spazzola dell'epitelio tubulare danneggiandolo. Il riscontro dei danni renali descritti è più frequente in soggetti con forme severe o fatali di COVID-19 oppure in pazienti con pregressa riduzione della funzione renale. Questi pazienti non solo sono a rischio di peggioramento dell'eGFR, ma anche di avere forme severe di COVID-19. [24] [25] [26]

1.3.2 Epidemiologia e severità dell'infezione nei pazienti con CKD e trapiantati di rene

L'aver una *Chronic Kidney Disease* è un fattore di rischio indipendente per ricovero e morte intraospedaliera per SARS-CoV-2. In aggiunta i nefropatici sono affetti anche da ipertensione secondaria e spesso da patologie cardiovascolari, altri fattori di rischio per aumentato *exitus* per COVID-19. L'incidenza di morte intraospedaliera in questi pazienti è del 50% contro 9% nei pazienti senza CKD. Più del 20% dei pazienti deceduti per COVID-19 aveva una disfunzione renale cronica; è la terza comorbidità più comune nei pazienti deceduti, preceduta solo da ipertensione arteriosa e diabete mellito. [26] Tanto più la CKD è severa e i livelli di creatinina ematica elevati tanto più è il rischio di forme gravi di infezione tali da richiedere la terapia intensiva. Più frequentemente dei sani questi pazienti hanno elevati livelli di leucociti, citochine pro-infiammatorie, ridotti di linfociti e piastrine con conseguenti anomalie della coagulazione.

Per quanto riguarda i pazienti trapiantati di rene la *mortality rate* è del 25-28%, lievemente maggiore rispetto a quella della popolazione generale. I sintomi iniziali sono uguali a quelli dei pazienti non trapiantati: febbre, mialgia, tosse, dispnea ma più del 50% dei trapiantati di rene infettati dal virus sviluppa polmonite bilaterale.

I peggiori *outcomes* di questi pazienti sono da attribuire non solo alla terapia immunosoppressiva cronica, ma soprattutto alle comorbidità che spesso sono

presenti in questi pazienti. Se è verosimile che la terapia immunosoppressiva potrebbe prevenire, come per i trapiantati di fegato, forme gravi di COVID-19, è vero anche che i trapiantati di rene hanno più di frequente induzione all'immunosoppressione (con immunoglobuline anti-timociti) e dosaggi immunosoppressivi più elevati. In questi soggetti è quindi indicato bilanciare la dose di questi farmaci in modo tale da proteggere da un eventuale rigetto e giovare dell'effetto anti-infiammatorio ma ridurre la probabilità di infezione severa. È bene sottolineare anche che rispetto ai trapiantati di fegato, quelli di rene hanno un maggior numero di altri fattori di rischio per infezione severa come ipertensione e patologie cardiovascolari. [25] [26] [27] [28]

1.4 Impatto della COVID-19 sulle liste d'attesa al trapianto

Oltre ai danni diretti che la pandemia ha provocato in termini di aumento di mortalità e morbilità, la diffusione del virus ha causato anche danni collaterali interrompendo la gestione clinica di molti pazienti con malattie croniche. In molti casi si è ricorsi alla telemedicina e all'assistenza a distanza ma, soprattutto nel corso della prima ondata, garantire la continuità delle cure ai pazienti è stato problematico.

Emblematico è il settore dei trapianti: la gestione delle liste d'attesa, la valutazione dei candidati e dei donatori, gli interventi di trapianto e il successivo follow-up dei pazienti richiedono risorse e infrastrutture che soprattutto nella prima ondata erano state dirottate alla gestione dell'emergenza pandemica. Tanto più una regione è stata colpita duramente dall'infezione tanto più l'attività di trapianto ne ha risentito. Le terapie intensive erano dedicate in prima linea alla cura dei pazienti affetti da SARS-CoV-2. Il personale medico-infermieristico (già limitato perché più esposto all'infezione) veniva sfruttato maggiormente per la gestione dei pazienti COVID e le operazioni di trapianto di fegato non urgenti sono state interrotte o ridotte prioritizzando pazienti con insufficienza epatica acuta, MELD superiore a 25-30 o con *Acute Chronic Liver Failure*. Inoltre le principali linee guida sconsigliavano

l'uso di organi da pazienti con infezione da SARS-CoV-2 recente (< di 1 mese) limitando così il numero di organi disponibili. [11] [29]

Consultando i dati del Centro Nazionale Trapianti (CNT) si vede come i trapianti totali nel 2019 sono stati 3451 da donatore cadavere e 363 da donatore vivente mentre nel 2020 si assiste ad una riduzione del -9,2 % da donatore cadavere (in tutto 2333 trapianti) e del -19,4% da donatore vivente (304 trapianti). Nelle prime settimane della prima e seconda ondata (marzo e novembre 2020) il numero di trapianti ha toccato valori minimi con 29-33 trapianti/ settimana contro un valore medio di 70-100 trapianti/settimana nell'era pre-COVID.

Considerando nello specifico i trapianti di fegato nel 2020, in Italia si sono registrati 1182 trapianti a fronte dei 1277 dell'anno precedente ma, aspetto positivo è stato l'aumento degli interventi *split-liver* che hanno subito un aumento del 26,7 %.

Per quanto riguarda le liste d'attesa nel 2020 si è vista una riduzione del -2,68% dei pazienti presenti in lista. L'impatto è stato differente a seconda dei vari organi: per quanto riguarda il trapianto di fegato e cuore gli andamenti sono rimasti pressoché invariati, mentre le liste più colpite sono state quelle del trapianto di rene. Il tempo medio di attesa in lista per i trapianti di fegato è stato di un anno e sei mesi nel 2020, simile a quello del 2019 (1,55 anni); anche *l'Intention To Treat* è rimasto stabile con 2536.

Per quanto riguarda il rene nel 2020 invece i trapianti effettuati sono stati 1.907. Nel dettaglio: 1.623 da donatore deceduto e 284 da donatore vivente. Per entrambe le tipologie si è registrata una flessione rispetto al 2019 (-10%). Il numero di nuovi ingressi in lista ha subito una flessione significativa con -24% di pazienti e la mortalità in lista ha subito un incremento del +0,8%. Questo è spiegabile in parte per un aumento della mortalità per SARS-CoV-2 in questi pazienti fragili. [29] [30] La miglior conoscenza di SARS-CoV-2 e lo sviluppo di vaccini, il consolidamento di nuovi approcci nella gestione dei trapiantati e l'esperienza maturata nel corso del 2020 hanno permesso di avere nel 2021 numeri di trapianti maggiori e paragonabili a quelli pre-pandemici. Gli interventi totali effettuati in Italia sono stati infatti 3778, valore che, escludendo il 2017 (3950) e il 2019 (3813) è il più alto registrato dagli anni Novanta. Il numero di trapianti di fegato è il maggiore degli ultimi trent'anni

con 1376 operazioni. I trapianti di rene sono stati invece 2051, solo lievemente più bassi degli anni pre-pandemici (nel 2019 2137 trapianti). [30]

Considerando in generale anche l'attività di trapianto al di fuori dell'Italia si è visto che i paesi più colpiti dalla pandemia (con *case fatality rate* maggiore del 3,4%) erano quelli con numeri più bassi di pazienti aggiunti in lista e numeri più bassi di trapianti effettuati. Interessante però è il fatto che i paesi meno colpiti erano quelli con mortalità in lista più elevata. Questo paradosso è dovuto probabilmente alla paura dei pazienti di recarsi in ospedale per ricevere le cure o alla malagestione della malattia cronica per cui il paziente è in lista. [27]

Le linee guida del CNT nel corso della prima ondata sconsigliavano il trapianto di organi da donatori positivi al Coronavirus. In realtà si è visto che il rischio di trasmissibilità di SARS-CoV-2 attraverso la donazione di organi di pazienti non deceduti per COVID-19 è quasi nullo. Oggi quindi è consentito il trapianto da donatori con anamnesi positiva per SARS-CoV-2 con specifiche condizioni: gli organi del donatore deceduto possono essere prelevati dopo almeno 14 giorni dalla guarigione virologica mentre il donatore vivente può essere avviato alla donazione dopo 14 giorni dalla negatività di tampone molecolare naso-faringeo. [31]

1.5 Immunogenicità dei trapiantati al vaccino a mRNA contro SARS-CoV-2

1.5.1 Vaccini a mRNA e risposta immunologica indotta negli immunocompetenti

Tra i vaccini approvati contro SARS-CoV-2 quelli a mRNA (BNT162b2 e mRNA-1273) sono stati sviluppati con la tecnologia più innovativa.

Sono costituiti da un RNA messaggero che codifica per la proteina Spike e che viene modificato in laboratorio sostituendo il nucleoside Uridina con 1-metil-pseudouridina. Il messaggero è rivestito da un doppio strato di quattro diverse nanoparticelle lipidiche: colesterolo, fosfolipidi, lipidi adesivi a molecole di

polietilene glicole e lipidi ionizzabili con carica positiva. Questi ultimi si legano all'mRNA, essendo carico negativamente, stabilizzandolo.

I primi esperimenti sull'uso dell'mRNA sono in realtà di vecchia data: risalgono al 1987 quando Robert Malone ha avuto l'intuizione di racchiudere un filamento di mRNA in goccioline lipidiche; iniettandolo in cellule *in vitro* queste erano in grado di produrre la proteina codificata dal messaggero. Questa scoperta, che potenzialmente permetteva di considerare l'uso dell'RNA proprio come un farmaco, è stata sperimentata in molti settori: dai vaccini per l'influenza e il Citomegalovirus all'ambito oncologico per codificare anticorpi diretti contro proteine tumorali. Fino allo scoppio della pandemia però la tecnologia a mRNA non è mai stata largamente applicata dal punto di vista clinico, tralasciando gli aspetti economici, a causa soprattutto di problemi circa la stabilità della molecola *in vivo*. In primis, una volta iniettato intramuscolo, l'mRNA veniva rapidamente degradato dalle ribonucleasi ematiche; in secondo luogo dopo l'ingresso della molecola nella cellula si ha l'attivazione dei *Toll Like Receptor* che scatenano la risposta immunitaria innata compromettendo la traduzione dell'mRNA. [32] Il superamento di queste problematiche si ha con la modifica delle regioni regolatorie dell'mRNA, l'uso della Pseudouridina (anziché l'Uridina) e di uno specifico rivestimento lipidico. La modifica del nucleoside consente, oltre a garantire una maggior traduzione proteica, di evitare che il sistema immunitario reagisca contro l'mRNA in modo che possa introdursi nelle cellule. L'uso delle nanoparticelle lipidiche invece garantisce che la molecola sia trasferita alle cellule proteggendola dagli enzimi litici ematici. [33]

Il vaccino BNT162b2 prodotto da BioNTech-Pfizer ha un mRNA modificato codificante per più regioni della proteina Spike tra cui anche RBD.

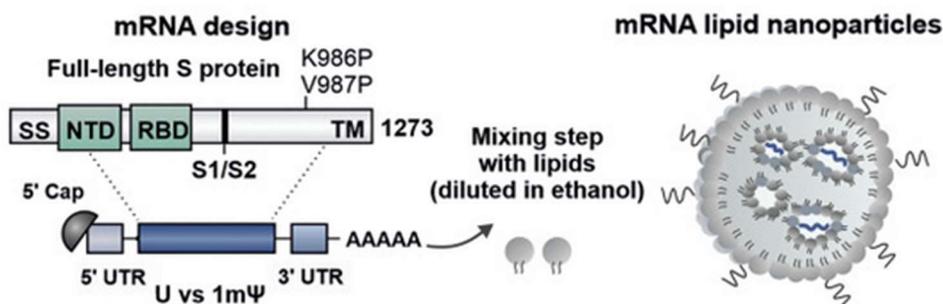


Figura 6: Struttura del vaccino a mRNA di Pfizer BioNTech

In seguito all'iniezione intramuscolare si ha una risposta infiammatoria locale che porta al reclutamento nel sito di iniezione di APC. Queste migrano nei linfonodi dove presentano gli antigeni del vaccino ai linfociti T e B. Segue, nei centri germinativi, la maturazione e l'ipermutazione somatica dei linfociti B che acquisiscono specificità verso Spike. Dopo cicli di espansione clonale, le cellule B acquisiscono affinità sempre maggiore a Spike e si differenziano in plasmacellule e B memoria per garantire la durata della risposta anticorpale. L'espansione dei linfociti T sembra invece essere dovuta alla produzione di IFN-I che viene ampiamente stimolata dai vaccini a mRNA. [34]

L'efficacia e sicurezza di BNT162b2 sono state testate da un ampio studio sperimentale controllato randomizzato comprendente 43448 partecipanti sani o con condizioni cliniche stabili. L'efficacia dopo dodici giorni dalla sola prima dose ammonta a 52% mentre, dopo la seconda, sale al 95%. Questa è un'efficacia a breve termine che considera solo i primi due mesi dalla somministrazione. [35] Già dopo 90 giorni dall'iniezione della seconda dose il rischio di infezione sale gradualmente. [36] Dopo la somministrazione della terza dose booster a distanza di sei mesi dalla seconda l'efficacia nel prevenire l'infezione ritorna ad essere circa il 95%. [37] Considerando più nello specifico i livelli di anticorpi neutralizzanti prodotti dopo due settimane dalla seconda dose, sono stati riportati range ematici tra 3920 e 18289 U/ml (contro 602 U/ml nei pazienti guariti dall'infezione; sono considerate protettivi per l'infezione livelli di almeno 100-200 U/ml).

Per quanto riguarda la sicurezza il più comune effetto avverso riportato è il dolore nel sito di iniezione generalmente modesto e destinato a scomparire nel giro di 1-2 giorni. Per quanto riguarda gli effetti avversi sistemici, questi sono più comuni nei soggetti giovani e dopo la seconda rispetto alla prima dose e comprendono astenia e cefalea. Effetti avversi severi (aritmie, miocarditi, parestesie) si sono registrati solo nel 2% dei pazienti dopo entrambe le dosi. [36] Anche dopo la terza dose l'effetto avverso più frequente è stato il dolore nel punto di iniezione e danni severi si sono registrati solo nello 0,5% dei casi. [37]

In seguito alla vaccinazione si ha la stimolazione anche della risposta immunitaria cellulare. Nella maggior parte dei soggetti vaccinati aumentano già dopo la prima dose i linfociti T CD4+ e T CD8+ diretti contro RBD. I T CD4+, a differenza dei CD8+, vengono prodotti in correlazione con i livelli di IgG anti-RBD. Entrambe le classi di linfociti sono polarizzate in senso Th1 producendo quindi citochine pro-infiammatorie come IL-2 e soprattutto IFN- γ . Questo ha la funzione, insieme agli interferoni di tipo I, di prevenire la replicazione di SARS-CoV-2. La risposta cellulare ha quindi un ruolo complementare a quello degli anticorpi anti-RBD e limita la replicazione e diffusione virale. Non è del tutto chiaro il ruolo protettivo dei linfociti T ma sembra che potrebbero garantire una memoria immunologica più duratura ed efficace anche dopo scomparsa degli anticorpi limitando la severità dell'infezione. [38]

1.5.2 Efficacia verso le “Variants of Concern”

Le varianti di SARS-CoV-2 sono classificate in *Variants of concern* (VOC) e *Variants of Interest* (VOI). Le prime sono le principali e si definiscono tali se hanno aumentata trasmissibilità o virulenza, resistono all'immunizzazione post-vaccinale o sfuggono ai test di rilevamento diagnostico. Rientrano in questa categoria la variante Alfa (emersa in Gran Bretagna a Settembre 2020), la Beta (sudafricana, Ottobre 2020), la Delta (Dicembre 2020 in India), Gamma (emersa a Gennaio 2021) e infine Omicron (la più recente, riscontrata a Novembre 2021). Tutte queste varianti sono accomunate dall'aver sviluppato mutazioni a livello della proteina S. La variante Alfa è caratterizzata da due mutazioni principali: la sostituzione dell'Asparagina in posizione 501 con la Tirosina (N501Y) che conferisce maggior affinità dell'RBD ad ACE-2; e la sostituzione di Prolina in 681 con Istidina (P681H) causa maggior trasmissibilità della variante. Queste mutazioni non sembrano tuttavia compromettere l'efficacia dei vaccini che si attesta a 86,3%. Le varianti Beta e Gamma invece hanno acquisito molte più mutazioni rispetto ad Alfa e condividono alcune mutazioni del dominio RBD: la sostituzione della Lisina con Asparagina in posizione 417 (K417N), la Glutammina con la Lisina in 484 (E484K) e infine Asparagina con Tirosina in 501 (N501Y). La variante Gamma sembra

tuttavia maggiormente resistente all'immunizzazione indotta dal vaccino, la cui efficacia è ridotta di sei volte. La risposta neutralizzante indotta dal vaccino è invece 3-5 volte meno efficace contro la variante Delta. Questa è caratterizzata da sostituzione L452R che sembra conferire anche capacità di eludere la risposta dei linfociti T citotossici. In particolare sono quattro le mutazioni del dominio RBD che sembrano ridurre la capacità neutralizzante degli anticorpi: E484K (in Beta, Gamma e Omicron) N501Y e K417N (in Alfa, Beta, Gamma e Omicron), L452R (tipica di Delta). Queste mutazioni hanno un impatto differente sull'efficacia dei vaccini: N501Y non compromette eccessivamente il potere neutralizzante degli anticorpi, E484K e L452R riducono invece in maniera più importante l'efficacia dei vaccini.

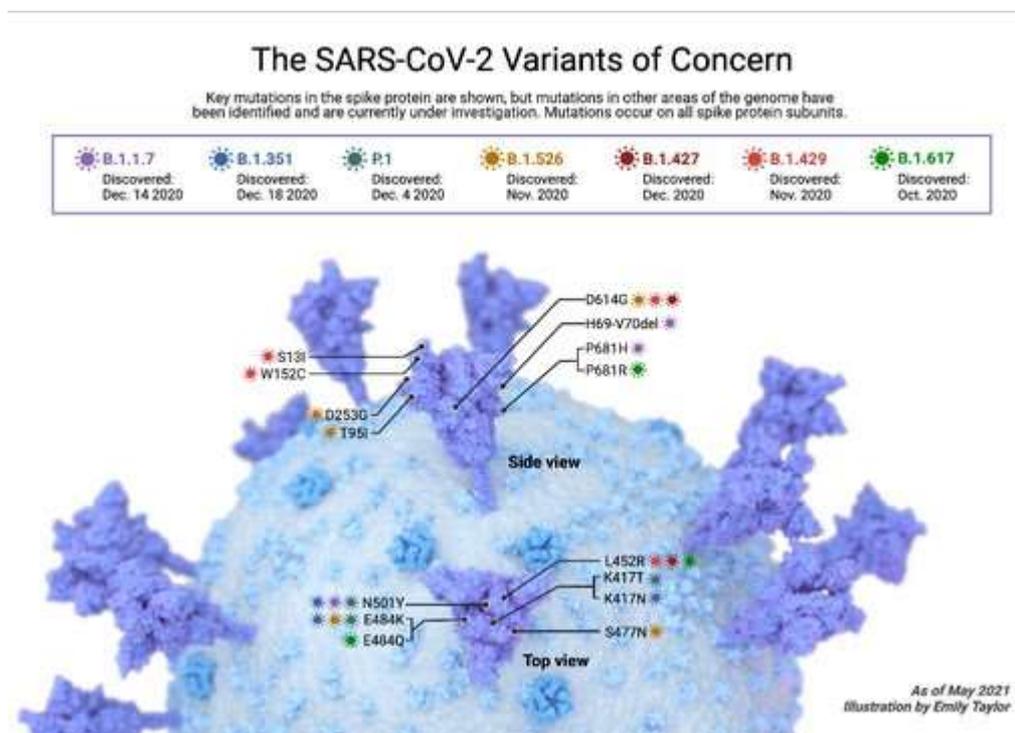


Figura 7: Mutazioni presenti nelle principali VOC

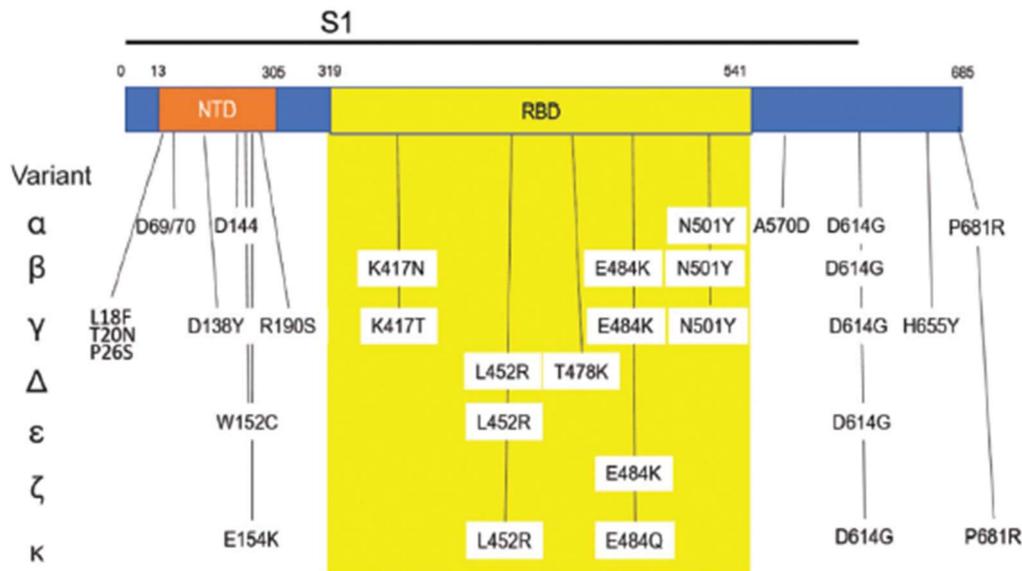


Figura 8: Mutazioni delle principali VOC e VOI

Le mutazioni di Omicron rendono il virus in grado di evadere il sistema immunitario. È stata evidenziata infatti una scarsa capacità da parte degli anticorpi neutralizzanti sviluppati con due dosi vaccino di eliminare Omicron ma la risposta mediata dai T CD8+ citotossici sembra essere invece egualmente efficace. La terza dose stimola livelli di anticorpi neutralizzanti che sembrano essere sufficientemente protettivi anche contro Omicron.

L'efficacia dei vaccini nel prevenire l'infezione delle VOC sembra quindi essere minore ma non è chiaro se questa riduzione sia interamente a causa delle mutazioni sviluppate dalle varianti o se sia imputabile alla perdita di efficacia intrinseca dei vaccini a distanza di sei mesi dall'inoculazione. Ciò nonostante è sicuro invece che i vaccini restano protettivi verso forme severe di malattia: i vaccinati non solo hanno minor rischio di ospedalizzazione e malattia grave ma anche la trasmissibilità delle VOC è ridotta rispetto ai non vaccinati. [39] [40] [41]

1.5.3 Ridotte risposte anticorpali dei trapiantati di fegato e rene ai vaccini

La maggior parte degli studi inizialmente eseguiti sul vaccino BNT162b2 escludevano dai loro protocolli gli immunocompromessi o i soggetti in terapia

immunosoppressiva. Sulla base dell'esperienza derivante da altre profilassi vaccinali, è accertato che i trapiantati sviluppano titoli anticorpali inferiori rispetto alla popolazione generale ma nessun vaccino ha dimostrato aumentare il rischio di rigetto d'organo. [42]

Molti studi confermano che l'efficacia di BNT162b2 è inferiore nei trapiantati: meno del 20% circa raggiunge i livelli di IgG anti-RBD minimi di positività che si attestano a 0.8 U/ml (100-200 U/ml è invece il valore considerato per avere una risposta anticorpale neutralizzante). [43] [44] [45]

I dati sono tuttavia estremamente variabili in base agli studi e al tipo d'organo considerato. I trapiantati di cuore hanno percentuali di sieroconversione tra 18.2 e 62%, quelli di polmone tra 10 e 47.4. I trapiantati di rene hanno gli esiti peggiori con livelli di sieroconversione tra 6,2-66%; quelli di fegato hanno percentuali di sieroconversione migliore che oscillano tra 37.5% e 80 %. [44] [46] [47] [42] [48] [49]

Per quanto riguarda le profilassi vaccinali nei trapiantati di fegato si sconsiglia in generale la somministrazione di vaccini vivi attenuati (per Varicella zoster virus, febbre gialla, morbillo-parotite-rosolia) e di qualunque vaccino dopo i primi 6 mesi post-trapianto. [50] [51]

L'EASL, in merito alle indicazioni per la vaccinazione contro SARS-CoV-2, sostiene sia da prioritizzarne la somministrazione soprattutto in pazienti con malattia epatica avanzata, cancro epato-biliare e trapiantati di fegato con fattori di rischio per forme severe di malattia. [52] La percentuale di pazienti trapiantati di fegato con sieroconversione non solo è ridotta (come visto tra 37.5-80%) ma i valori medi di anticorpi anti RBD sono inferiori rispetto alla popolazione generale con livelli a 4 mesi di 32 U/ml (852 U/ml nei controlli). [49]

I fattori predittivi il fallimento della risposta terapeutica nei trapiantati di fegato sembrano essere l'età avanzata, una ridotta funzionalità renale (eGFR), ipertensione arteriosa e alcune terapie immunosoppressive. In particolare l'uso, nell'anno antecedente alla vaccinazione, di MMF, di elevate dosi di prednisone e/o di triplice terapia immunosoppressiva sembrano essere deleterie per lo sviluppo di anticorpi. [47] L'uso invece di CNi sembra essere fattore predittivo positivo. [48] [53] Il

Micofenolato, a differenza degli altri immunosoppressori, che agiscono principalmente sui linfociti T, inibisce la produzione di anticorpi da parte delle cellule B. Scarse risposte sono state evidenziate anche nei pazienti trapiantati da meno di un anno probabilmente perché soggetti ad alte dosi di steroidi.

I trapiantati di rene condividono gli stessi predittori soprelencati ai quali si aggiungono come fattori negativi l'uso di Belatacept e terapia dialitica prolungata prima del trapianto.

I trapiantati di rene inoltre sono sottoposti a dosaggi immunosoppressivi maggiori rispetto a quelli di fegato; questo potrebbe in parte spiegare la peggior risposta di questo sottogruppo. [46]

Per implementare la risposta al vaccino bisogna scegliere il timing ottimale: nei neo-trapiantati è preferibile attendere almeno 3 mesi dal trapianto; è inoltre d'obbligo consigliare la somministrazione della dose booster. Non è indicato invece ridurre o sospendere MMF, nonostante alcuni studi suggeriscano che già dopo una settimana dalla sospensione del farmaco gli anticorpi prodotti potrebbero essere uguali alla popolazione non trapiantata. [54] [55]

A partire da settembre 2021 l'ISS ha approvato la somministrazione di una terza dose booster dopo almeno sei mesi dalla seconda dose; indirizzata inizialmente ai soggetti "fragili", è stata successivamente estesa a tutta la popolazione. Nei soggetti con ridotta immunogenicità alle due dosi, la terza dose aumenta il titolo anticorpale fino a quantità paragonabili a quelle raggiunte dopo la seconda dose nei sani [54]. Il 50% dei trapiantati di rene che non aveva risposto alle due dosi ha avuto sierconversione con la terza dose. [56] In conclusione negli immunodepressi è necessario somministrare la dose booster per avere una buona efficacia vaccinale ed è indicato anche monitorare con esami sierologici seriati la risposta umorale. [54]

1.5.4 Risposta Th1 nei trapiantati di fegato e rene

Come visto nel primo paragrafo, un'efficace risposta immunitaria adattativa mediata dai linfociti T limita la severità dell'infezione [4] [5]. In particolare i linfociti T memoria sembrano limitare la durata della malattia e la diffusione virale tramite distruzione delle cellule infettate. Studi condotti su SARS-CoV-1 hanno inoltre dimostrato che i linfociti T memoria persistono nei guariti fino a 11 anni dopo l'infezione. [57].

Con questi presupposti, nonostante il ruolo della risposta cellulare indotta dal vaccino sia ancora dibattuto è verosimile che potrebbe conferire protezione a lungo termine dall'infezione. In particolare potrebbe proteggere dall'infezione quei pazienti in cui la risposta anticorpale B-mediata è lieve o assente.

Mentre negli immunocompetenti sono state rilevate buone risposte cellulari Th1 dirette contro Spike, anche in dipendenza agli elevati livelli di IgG anti-RBD, negli immunosoppressi i dati sono contrastanti.

Secondo alcuni studi la percentuale di pazienti trapiantati in cui si è riscontrata risposta T CD4+ e CD8+ è paragonabile alla popolazione generale (80-90%) ma l'entità di risposta e la produzione citochinica sono ridotte nei trapiantati di fegato. [48] In questi pazienti sembra ridotta soprattutto la produzione e la funzionalità dei linfociti T CD8+ mentre i T CD4+ vengono prodotti in maniera paragonabile alla popolazione generale. Anche i linfociti T CD4+ -memoria sono ampiamente prodotti dai trapiantati e proprio questi potrebbero garantire memoria immunologica. [58]

Per quanto riguarda i trapiantati di rene: i linfociti T CD4+ sembrano essere prodotti in quantità uguali ai sani mentre i T CD8+ diretti contro Spike si contano solo nel 5% dei trapiantati di rene. [59]

È stato visto che alcuni trapiantati, nonostante non avessero livelli di anticorpi considerati positivi, avevano una buona risposta cellulare: in questi pazienti i linfociti T giocano un ruolo fondamentale.

1.6 Efficacia della vaccinazione nei trapiantati

I livelli anticorpali non sono gli unici determinanti dell'efficacia della vaccinazione. Come visto nel paragrafo precedente le cellule T potrebbero compensare le ridotte immunoglobuline e garantire comunque protezione. Nonostante la scarsa immunogenicità al vaccino nei trapiantati, gli anticorpi prodotti e i linfociti T sono infatti comunque sufficienti a ridurre significativamente il rischio di morte per COVID-19. [60]

Le due dosi riducono dell'87% il rischio di *exitus* a causa di SARS-CoV-2, inoltre diminuiscono del 64% il rischio di infezione e del 58% il rischio di infezione sintomatica. [61]

Dati inglesi indicano che la *mortality rate* nei pazienti trapiantati infettati dal virus scende a 7,7 %. [62]

Secondo i registri del CNT (dati risalenti ad ottobre 2021) il 79,6% di tutti i trapiantati ha ricevuto due dosi, quasi la metà ha ricevuto anche la terza dose. Monitorando i numeri di infezioni nei trapiantati vaccinati e non emerge che il rischio per i trapiantati vaccinati di contrarre l'infezione è 4,7 volte minore rispetto ai non vaccinati (tasso di incidenza 0,056 per mille tra i trapiantati vaccinati e 0,264 per mille nei non vaccinati). [63]

Questi numeri confermano che, a discapito della ridotta immunogenicità, la somministrazione del vaccino è protettiva anche nei trapiantati soprattutto nei confronti di danni gravi di SARS-CoV-2.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLO STUDIO

2.1 Obiettivi primari

Questa tesi sperimentale si inserisce all'interno di uno studio osservazionale longitudinale prospettico il cui scopo principale consiste nel verificare l'immunogenicità al vaccino BNT162b2 in due coorti di trapiantati di fegato e rene. Lo studio mira a confrontare le risposte nelle due popolazioni di trapiantati verificando l'ipotesi che i trapiantati di rene sviluppino risposte peggiori. Inoltre si analizzeranno i risultati in base alle differenti terapie immunosoppressive e si determinerà il ruolo che ha il tipo di organo trapiantato nell'indurre la risposta immunologica.

2.1.1 Immunoglobuline anti-Spike e anti-nucleocapside

Uno degli *outcomes* principali dello studio è la quantificazione e comparazione nei due gruppi degli anticorpi diretti contro tutta la proteina Spike e contro quattro epitopi di SARS-CoV-2: subunità S1, subunità S2, RBD e antigene nucleocapsidico. Le IgG saranno quantificate ed espresse in termini di *Mean Fluorescent Intensity (MFI)*. Verrà valutato l'andamento dei livelli anticorpali, sia nei trapiantati di fegato che di rene, considerando il momento prima della prima dose (T0), prima della seconda dose (T1) e dopo tre settimane dalla seconda dose (T2).

Si vuole stabilire anche, in base all'incremento degli anticorpi in T2 rispetto a T0, la percentuale di pazienti "responsivi" alla vaccinazione nei due gruppi.

2.1.2 Cellule T produttrici IFN- γ e IL-2

Il secondo obiettivo primario consiste nel confrontare l'entità della risposta cellulare dei due gruppi di trapiantati quantificando i linfociti T attivi contro Spike

con produzione di IFN- γ e IL-2. La misurazione è stata eseguita, come per gli anticorpi, a T0, T1, T2. La quantificazione delle cellule T producenti citochine è espressa in termini di *IFN- γ o IL-2 Spot forming units (SFUs)/5x10⁵ cellule*.

2.2 Obiettivi secondari

2.2.1 Anticorpi diretti verso altri Coronavirus

Esistono in tutto sette ceppi di Coronavirus umani. Quattro di questi (HCoV 229E, NL63, OC43, HKU1) sono endemici, colpiscono le alte vie respiratorie dando corizza. Sono considerati responsabili del 10-30% dei raffreddori comuni. I restanti tre ceppi sono responsabili invece di sindromi respiratorie e polmoniti atipiche severe e comprendono, oltre a SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 e MERS-CoV. [64]

Obiettivo secondario dello studio è valutare se a T0, T1, T2 si ha lo sviluppo di Ig o la variazione dei livelli di anticorpi diretti verso gli altri tipi di Coronavirus. In questo modo si cercherà di stabilire se la vaccinazione sia protettiva anche verso gli altri sei ceppi.

2.2.2 Selettività degli anticorpi verso le varianti di SARS-CoV-2

Il secondo obiettivo secondario consiste nel valutare se le IgG anti-RBD risultano efficaci contro alcune VOC (Alpha, Beta, Delta, Gamma) e alcune VOI (Epsilon, Kappa, Zeta). Si intende così stabilire la selettività degli anticorpi verso le principali varianti circolanti (ad esclusione di Omicron) in modo da determinare se l'efficacia del vaccino sia valida anche verso queste varianti.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione di studio

La popolazione esaminata da questo studio longitudinale prospettico consta di 102 pazienti: 52 trapiantati di rene e 50 trapiantati di fegato seguiti in *follow-up* presso l'UOC "Chirurgia dei Trapianti di Rene e Pancreas" e l'UOSD "Gastroenterologia-Trapianti Multiviscerali" dell'Azienda Ospedale-Università di Padova.

Dopo approvazione del protocollo di studio, sono stati inclusi nella ricerca, previa firma del consenso informato, solo pazienti trapiantati di fegato e rene maggiorenni, senza infezione di SARS-CoV-2 in atto.

Ad ogni paziente sono state somministrate due dosi di vaccino a mRNA contro COVID-19 (BNT162b2) prodotto dalle aziende Pfizer-BioNTech. L'inoculazione del vaccino è avvenuta tra Marzo e Aprile 2021 e la raccolta dei campioni di sangue da analizzare è avvenuta al momento della prima dose (T0), prima della seconda dose (T1) e dopo ventun giorni dalla seconda dose (T2).

Prima della vaccinazione tutti i pazienti sono stati visitati e dopo la somministrazione sono stati monitorati per trenta minuti per valutare eventuali effetti avversi precoci. A tre mesi dalla prima dose sono stati interrogati circa eventuali eventi avversi correlati alla vaccinazione. È stato inoltre chiesto se avessero sviluppato sintomi compatibili con infezione da SARS-CoV-2.

Sono state raccolte per ogni paziente, (tramite consultazione delle cartelle cliniche cartacee o presenti su "Galileo Health") caratteristiche cliniche e terapeutiche.

Per ogni paziente si sono valutate le seguenti variabili al T0: età (in anni), sesso, mesi dal trapianto, BMI (kg/m^2), pregressa infezione da SARS-CoV-2, eventuale terapia di induzione (sia per i trapiantati di fegato che di rene si è indagato l'uso di Basiliximab, globuline anti-Timociti) terapia immunosoppressiva (Tacrolimus, Ciclosporina, inibitori di mTOR, MMF, Steroidi), dose di MMF (mg/die), livelli ematici di farmaco al momento del prelievo (ng/ml), storia di rigetto, eziologia del

danno renale (malattia glomerulare, rene policistico, nefrite, nefroangiosclerosi, vasculite sistemica, altro danno renale) ed epatico (cirrosi alcolica, HBV+-HDV, HCV, HBV+HCV, alcolica+HCV, colangite biliare o sclerosante primitiva, dismetabolica o criptogenica). Le variabili continue sono state espresse con media \pm deviazione standard, le variabili categoriche sono state riportate con valori percentuali considerando un intervallo di confidenza del 95%.

3.2 Procedure di raccolta e conservazione dei campioni ematici

I campioni ematici sono stati raccolti in provette sterili nei tre timing descritti. Per ogni paziente si sono raccolte provette con sodio citrato per la valutazione del siero e una provetta viola contenente EDTA per valutare le PBMCs.

I campioni sono stati centrifugati per circa 15 minuti a 1300 RCF per separare il siero che è stato poi aliquotato in provette Eppendorf. Queste sono state conservate a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Le PBMCs sono state isolate dal *buffy coat* ottenuto dalle provette con EDTA mediante separazione su gradiente. Più nello specifico il campione di sangue è stato diluito con un ugual volume di tampone fosfato (PBS) 1X, stratificato lentamente su una soluzione di Hystopaque 1077 (Sigma-Aldrich) nel rapporto 2:1 e centrifugato a 2000 RPM per 30 min a temperatura ambiente. L'anello linfomonocitario presente nell'interfaccia Hystopaque-plasma è stato quindi raccolto e lavato con PBS 1X (rapporto 1:1). Dopo centrifugazione a 1500 RPM per 10 min ed eliminazione del surnatante, il pellet cellulare è stato raccolto e opportunamente conservato in azoto liquido fino al momento delle analisi.

3.3 Analisi del titolo anticorpale

L'analisi delle IgG dirette contro l'intera proteina Spike, S1, S2, RBD, NC sono state eseguite con One Lambda (LABScreenTM COVID Plus[®]) seguendo la procedura fornita dal produttore. Questa tecnica, che consente saggi immunoenzimatici semiquantitativi, sfrutta microsferi contenenti i cinque antigeni di SARS-CoV-2 sulle quali viene poi incubato il siero del paziente. Gli anticorpi

leganti gli antigeni sono riconosciuti da IgG leganti fluoroforo analizzati con Luminex FLEXMAP 3D®.

LABScreen™ COVID Plus® consente di analizzare anche antigeni specifici per Coronavirus stagionali, MERS e SARS-CoV-1 che sono quindi stati valutati con la medesima tecnica.

Le VOC e le VOI sono state valutate anch'esse con One Lambda (LABScreen™ COVID Plus®) ma utilizzando differenti microsfele.

3.4 IFN- γ / IL-2 FluoroSpot

La produzione delle citochine IL-2 e IFN- γ da parte delle cellule mononucleate del sangue è stata analizzata mediante tecnologia FluoroSpot® (Mabtech). Il test FluoroSpot® consente la misurazione simultanea di diverse citochine secrete a livello di ogni singola cellula. In FluoroSpot viene applicato un principio di analisi ELISA a sandwich. Nello specifico, 500000 PBMC sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti precedentemente rivestiti da anticorpi specifici anti IL-2 e anti- IFN- γ . Le cellule sono state quindi stimulate con peptidi tipici di SARS-CoV-2 (comprendenti alcune regioni di Spike, l'intera proteina NC e M). Le cellule stimulate producono citochine che vengono legate dagli anticorpi presenti sulla piastra. La successiva incubazione con anticorpi legati a tag ne permette la rilevazione. La piastra è stata quindi analizzata in un lettore ELISA con filtri adatti. Il segnale viene rilevato a *spot* che rappresentano le singole cellule secernenti le specifiche citochine (le cosiddette *Spots Forming Units*).

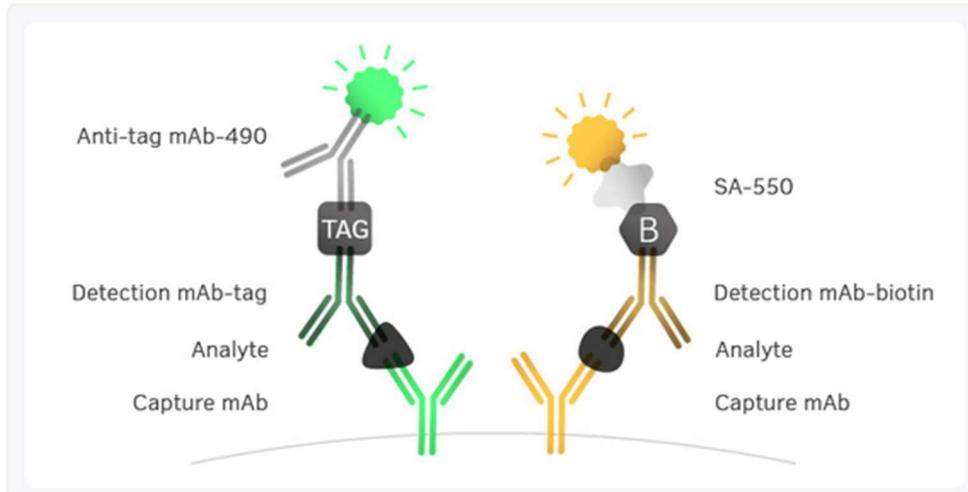


Figura 9: Meccanismo di FluoroSpot. Gli analiti che vengono catturati dagli anticorpi nei pozzetti sono le citochine prodotte dai linfociti T attivati. Il complesso antigene-anticorpo è riconosciuto da anticorpi con tag o biotina.

3.5 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando i software Stata 17.0 e R 4.1.1 considerando come statisticamente significativo un valore di $P < 0.05$.

Le variabili continue sono state confrontate tra trapiantati di fegato e di rene usando il test non parametrico di Mann-Whitney a due code, le variabili categoriche con un altro test non parametrico a due code: il test esatto di Fisher.

Per determinare gli obiettivi primari e secondari si sono usate equazioni di stime generalizzate per confrontare ad ogni *time points*: i livelli di MFI anti-RBD, di SFUs dei linfociti T IFN- γ secernenti e infine per valutare la proporzione di pazienti con valori di anticorpi tali da essere considerati responsivi.

Per valutare l'impatto della terapia immunosoppressiva, solo nel sottogruppo di pazienti in terapia con Tacrolimus, si sono confrontati (unicamente in T2) con analisi di regressione lineare multipla i livelli di MFI anti-RBD e di SFUs dei linfociti T-IFN- γ prima e dopo aggiustamento per terapia di induzione, livelli di Tacrolimus, uso di MMF e steroide (variabili indicatrici). La percentuale di pazienti responsivi è stata sottoposta a distribuzione di Bernoulli, i livelli di MFI sono stati normalizzati con distribuzione gamma e infine la conta linfocitaria è stata valutata

con regressione binomiale negativa. Per tutti i modelli di regressione è stato utilizzato *Huber Sandwich Estimator* per il calcolo della varianza.

Si è eseguita un'analisi delle componenti principali (PCA) e si sono utilizzati grafici di punteggio e caricamento (*Biplots*) per valutare la variabilità dei risultati.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione di studio

4.1.1 Caratteristiche generali

Tutti i 102 soggetti hanno ricevuto le due vaccinazioni, nessun trapiantato di fegato e due di rene avevano riferito pregressa infezione da SARS-CoV-2. Durante i successivi sei mesi di follow-up post-vaccinazione un solo trapiantato di fegato ha sviluppato infezione da SARS-CoV-2. L'età media dei trapiantati è 60.7 anni (± 9.9) ma i trapiantati di rene sono significativamente più giovani di quelli di fegato (57.5 ± 10.8 anni contro 64.0 ± 7.7 anni $P=0.001$). Il periodo trascorso in media dal trapianto è di circa 10 anni (senza differenze significative tra i due gruppi). In Tabella 1 sono riportate in maggior dettaglio le caratteristiche generali dei pazienti.

Tabella 1: Caratteristiche generali delle due coorti di trapiantati

Characteristics	Overall (n=102)		Kidney (n=52)		Liver (n=50)		P value
Age at time of 1 st dose (yrs)	n=102	60.7 \pm 9.9	n=52	57.5 \pm 10.8	n=50	64.0 \pm 7.7	<u>0.001</u>
Gender (%M)	--	71 (69.6%)	--	34 (65.4%)	--	37 (74.0%)	0.393
Previous COVID-19	--	2 (2.0%)	--	2 (3.8%)	--	0	0.495
Months elapsed since transplantation	n=102	125.6 \pm 154.1	n= 52	110.5 \pm 79.0	n=50	141.4 \pm 204.9	0.959

BMI (Kg/m ²)	n=77	25.2 ± 4.6	n=52	24.6 ± 4.1	n=25	26.3 ± 5.4	0.140
Donor Type (%living)	--	9 (8.8%)	--	9 (17.3%)	--	0	<u>0.003</u>
Previous Cancer	--	37 (36.3%)	--	18 (34.6%)	--	19 (38.0%)	0.837
Autoimmu ne disease	--	1 (1.0%)	--	0	--	1 (2.0%)	0.490

4.1.2 Caratteristiche dell'immunosoppressione

Tabella II: Terapie immunosoppressive dei pazienti delle due coorti. (P significativo se <0.05)

IMMUNOSU PPRESSANT	Overall (n=102)		Kidney (n=52)		Liver (n=50)		P value
No Induction Therapy	--	39 (38.2%)	--	9 (17.3%)	--	30 (60.0%)	<0.001
ATG	--	30 (29.4%)	--	30 (57.7%)	--	0	--
Basiliximab	--	33 (32.4%)	--	13 (25.0%)	--	20 (40.0%)	---
Tacrolimus	--	84 (82.4%)	--	46 (88.5%)	--	38% (76.0%)	0.123
Cyclosporine	--	13 (12.7%)	--	6 (11.5%)	--	7 (14.0%)	0.773
mTOR- inhibitor	--	24 (23.5%)	--	9 (17.3%)	--	15 (30.0%)	0.164
MMF	--	57 (55.9%)	--	41 (78.8%)	--	16 (32.0%)	<0.001
Steroids	--	43 (42.2%)	--	40 (76.9)	--	3 (6.0%)	<0.001
Tacrolimus trough levels (ng/ml)	84	5.2 ± 2.0	46	6.2 ± 1.4	38	3.9 ± 1.80	<0.001
Cyclosporine trough levels (ng/ml)	14	111.1 ± 116.9	6	80.0 ± 9.7	8	134.4 ± 154.4	1.000
mTOR inhibitor trough levels (ng/ml)	9	4.1 ± 1.2	7	3.7 ± 0.9	2	5.6 ± 0.6	0.111
MMF dosage (mg/die)	58	834.3 ± 556.4	42	741.2 ± 298.1	16	1078.8 ± 919.5	0.349

History of treatment for rejection	--	5 (4.9%)	--	0	5	5 (10.0%)	<u>0.025</u>
------------------------------------	----	----------	----	---	---	-----------	--------------

L'induzione all'immunosoppressione è avvenuta prevalentemente nei trapiantati di rene, mentre il 60.0% di trapiantati di fegato non ha ricevuto induzione. L'uso di MMF e Steroidi è prevalente nei trapiantati di rene (rispettivamente il 78.8% dei trapiantati di rene e il 32.0 % dei trapiantati di fegato; 76.9 % dei trapiantati di rene e 6.0 % di fegato). Infine, nei pazienti in terapia con Tacrolimus, i livelli ematici a T0 erano significativamente superiori nei trapiantati di rene: 6.2 ng/ml±1.4 contro 3.9 ng/ml±1.8 (Tabella 2).

4.1.3 Cause di trapianto nelle due coorti

Tabella III: Eziologia del trapianto d'organo nelle due coorti

CAUSE OF TRANSPLANT	Overall (n=102)	Kidney (n=52)	Liver (n=50)
Glomerular disease	9 (17.3%)	9 (17.3%)	0
ADPKD	15 (28.8%)	15 (28.8 %)	0
Other congenital/Pyelonephritis/ Interstitial nephritis	6 (11.5%)	6 (11.5%)	0
Nephroangiosclerosis	4 (7.7%)	4 (7.7%)	0
Systemic Vasculitis	1 (1.9%)	1 (1.9%)	0
Other cause of ESKD	17 (32.7%)	17 (32.7%)	0
Alcoholic cirrhosis	11 (22.0%)	0	11 (22.0%)
HBV +/-HDV	12 (24.0%)	0	12 (24.0%)
HCV cirrhosis	14 (28.0%)	0	14 (28.0%)
HBV+HCV cirrhosis	2 (4.0%)	0	2 (4.0%)
Alcoholic+ HCV and/or HBV +/- HDV	3 (6.0%)	0	3 (6.0%)
PBC or PSC	5 (10.0%)	0	5 (10.0%)
Cryptogenic or dysmetabolic cirrhosis	3 (6.0%)	0	3 (6.0%)

Nella coorte dei trapiantati di rene, escludendo le “altre cause di insufficienza renale terminale”, la principale causa che ha condotto a trapianto è stata la malattia del rene policistico autosomico dominante (28.8 %), seguita dalle malattie glomerulari (17.3%). Le principali eziologie di danno epatico nei trapiantati di fegato sono state

invece: cirrosi HCV correlata (28.0%); cirrosi HBV±HDV (24.0%) e cirrosi esotossica (22.0%). La Tabella 3 riporta tutte le cause di trapianto dei pazienti delle due coorti.

4.2 Analisi integrata delle risposte al vaccino

Per valutare i determinanti principali della risposta immunitaria al vaccino è stata eseguita un'analisi delle componenti principali (PCA) integrando i valori di anticorpi contro SARS-CoV-2, VOC, altri Coronavirus e cellule T in T2. Dall'analisi PCA emerge che la variabilità dei risultati dipende da cinque componenti principali (che spiegano nell'ordine il 67.7%, 1'8.7%, 5.6%, 3.8% e 3.5% di variabilità) e prevalentemente da due di queste che sono rappresentate come asse x e y del *biplot* (in figura 4.1A). Il grafico rappresenta con frecce arancioni gli anticorpi anti-SARS-CoV-2, con frecce gialle i saggi verso gli altri Coronavirus, le blu rappresentano i saggi di Fluorospot.

La prima componente principale, che spiega il 67.7% di variabilità (asse x), è correlata principalmente ai livelli di anticorpi contro SARS-CoV-2, ma in parte anche al tipo di organo trapiantato (l'ellisse rosso rappresenta i trapiantati di fegato, il blu quelli di rene). La seconda dimensione, che spiega l'8,7% della variabilità (asse y) è correlata alle frecce gialle (anticorpi verso gli altri Coronavirus). Non c'è correlazione tra le IgG dirette contro SARS-CoV-2 e contro gli altri Coronavirus (in Figura 4.1A si può vedere infatti che le frecce gialle e arancioni sono perpendicolari tra loro) e andranno quindi analizzate indipendentemente. Anche la risposta cellulare è stata valutata separatamente rispetto agli anticorpi in quanto la PCA ha mostrato che le cellule T proiettano in dimensioni differenti (Dim5 e 3 in figura 4.1B). La correlazione con i livelli di IgG anti SARS-CoV-2 è quindi parziale

(in figura 4.1A le frecce blu non sono perpendicolari né parallele alle arancioni).

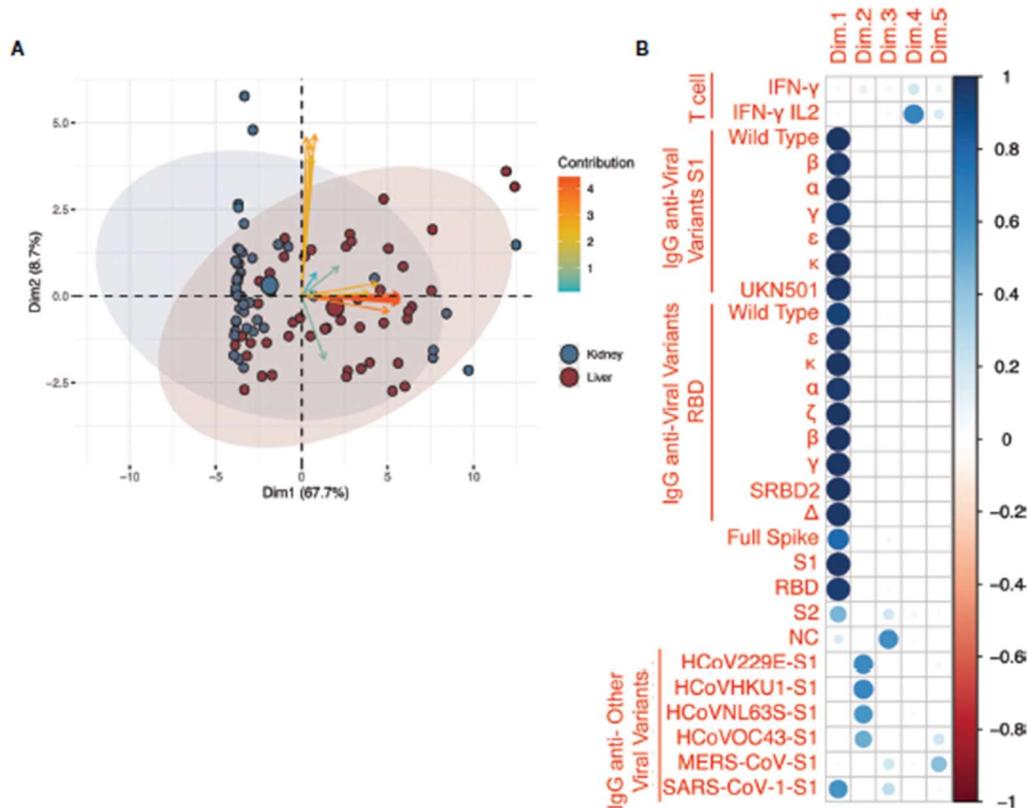


Figura 10 PCA: in 1A gli assi sono le due variabili principali; frecce blu=saggi di Fluorospot, frecce arancioni=Abs anti SARS-CoV-2, frecce gialle=Abs contro altri CoV; in 1B è rappresentata la correlazione tra le 5 componenti principali e le variabili ottenute con i saggi.

I livelli di anticorpi diretti contro Spike sono i principali determinanti di tutta la variabilità dei risultati e in particolare si possono considerare gli anticorpi anti-RBD come rappresentativi di tutti gli anticorpi anti-SARS-CoV-2, essendo quelli con la più elevata capacità neutralizzante e che influiscono maggiormente su Dim1.

4.3 Valutazione e confronto degli anticorpi nei due gruppi

I livelli di IgG dirette contro gli epitopi della proteina S (intera proteina S, S1, S2, RBD) sono eterogenei: in alcuni trapiantati sono incrementati in T2 mentre in altri non si è assistito ad un aumento rispetto a T0. Al contrario, nessun trapiantato ha avuto un incremento delle IgG anti-NC dopo la vaccinazione. Questo riscontro è dovuto al fatto che l'antigene NC non è incluso nella sequenza del vaccino a mRNA

quindi un incremento di IgG anti-NC è da attribuire solo all'infezione da SARS-CoV-2. Valutando a tal proposito la sierologia a T0 si è riscontrato che cinque trapiantati di rene e cinque di fegato avevano avuto pregressa infezione a loro non nota. Considerando in particolare i livelli MFI di IgG anti-RBD che, come visto dall'analisi PCA, sono rappresentativi di tutta la risposta anticorpale, si nota che a T0 non ci sono differenze significative tra le due coorti. Solo nei trapiantati di fegato si è visto un incremento significativo di IgG anti-RBD già in T1. In T2 in entrambi i gruppi l'aumento di questi anticorpi rispetto a T0 è stato significativo ma sono aumentati in maniera significativamente maggiore nei trapiantati di fegato rispetto a quelli di rene [MFI -14037 (IC 95%=-9999/-18076; $P<0.001$)] . I livelli medi di MFI di IgG anti-RBD a T2 sono tre volte maggiori nei trapiantati di fegato: la media di MFI è infatti 6056 nei trapiantati di rene e 19617 nei trapiantati di fegato ($P<0.001$).

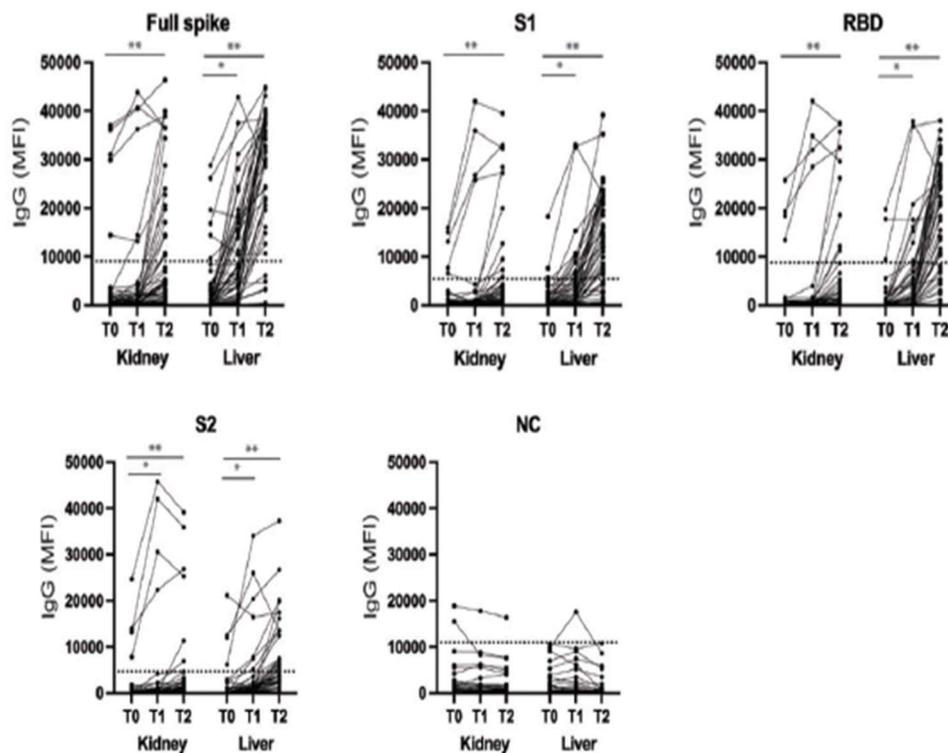


Figura 11: Risposte sierologiche individuali dei trapiantati ai cinque antigeni di SARS-CoV-2. Il livello di MFI da considerarsi positivo è segnalato con la linea tratteggiata. * $P<0.05$, ** $P<0.001$

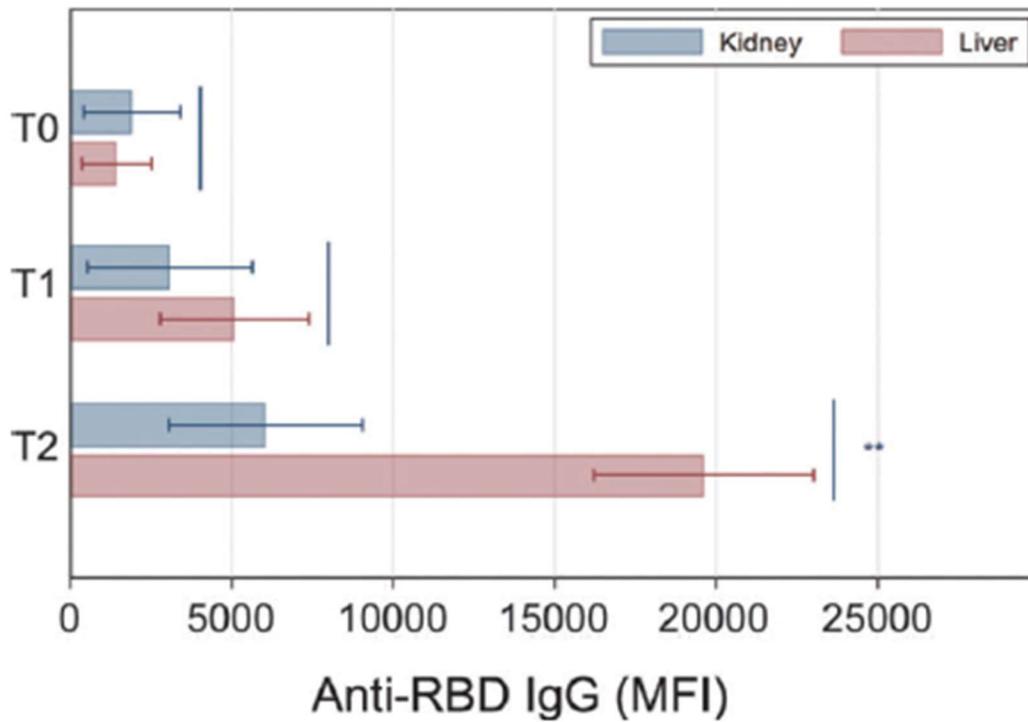


Figura 12: Livelli di IgG anti-RBD a confronto tra trapiantati di rene (blu) e fegato (rosso). Le linee orizzontali rappresentano intervallo di confidenza del 95%. $**P < 0.01$

I pazienti sono stati poi suddivisi in base ai livelli di IgG anti-RBD in “Responsivi” o “non Responsivi”. Il *cut-off* di riferimento (fornito dai produttori di One Lambda) per classificare i soggetti come “Responsivi” consiste in una MFI di almeno 8800.

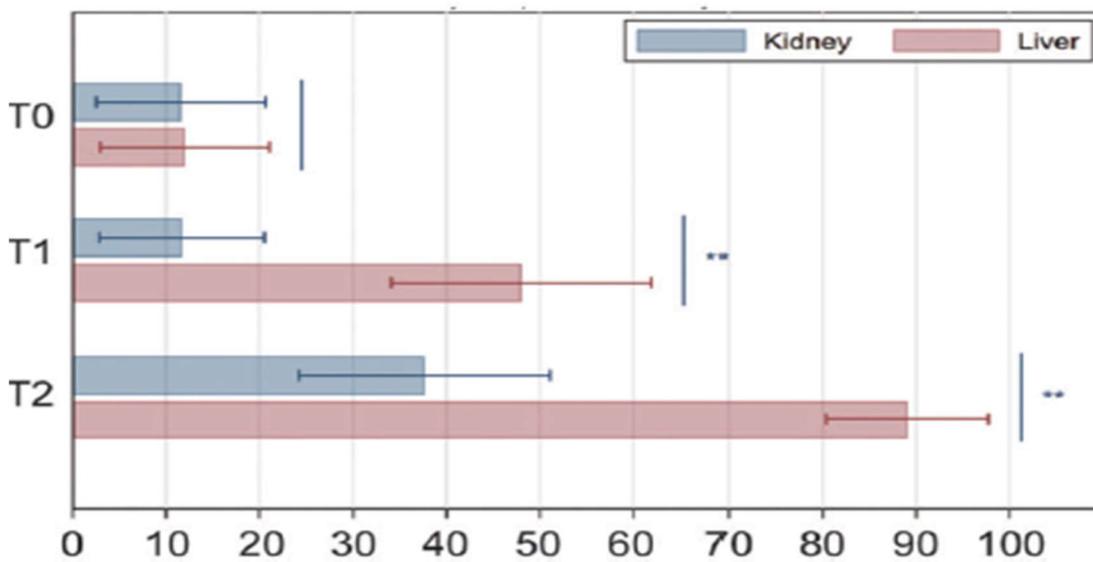


Figura 13: Percentuale di pazienti responsivi alla vaccinazione (MFI per la responsività ≥ 8800). Le linee orizzontali indicano un intervallo di confidenza del 95%. $**P < 0.001$

La percentuale di responsivi è minore nei trapiantati di rene sia considerando T1 che T2, la differenza nella percentuale di responsivi tra i due gruppi di trapiantati è significativa già in T1. Considerando T2 l'89.6% dei trapiantati di fegato ha risposto contro solo il 38.0% di trapiantati di rene ($P < 0.01$).

Risultati simili si sono riscontrati anche per gli anticorpi verso altri epitopi della proteina S.

4.3.1 Analisi aggiustate in base all'immunosoppressione

I trapiantati di rene hanno dosaggi maggiori di immunosoppressione e più di frequente terapia di induzione ($P < 0.001$). Per eliminare questo possibile fattore confondente si sono ripetute le analisi considerando in T2 solo i trapiantati che assumono Tacrolimus (84 pazienti). In questo modo si vuole valutare come varia la differenza di MFI nei due gruppi di trapiantati ricevanti lo stesso tipo di immunosoppressione. I dati sono stati aggiustati in base ai livelli ematici di Tacrolimus, terapia di induzione, uso di MMF o steroidi. Con analisi di regressione lineare multipla si sono confrontati (dopo normalizzazione con distribuzione gamma) i livelli di MFI in questo sottogruppo. Le analisi mostrano che, pur attenuandosi la differenza di MFI in T2 tra trapiantati di fegato e di rene, la differenza resta sostanziale e significativa (P senza aggiustamento < 0.01 , con aggiustamento < 0.05).

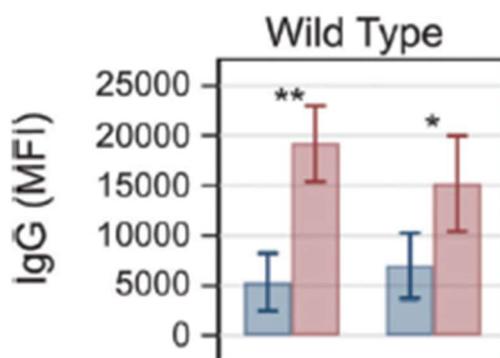


Figura 14: Analisi di IgG anti-RBD (contro il virus di Whuan) a T2 nei pazienti in terapia con Tacrolimus. I dati sono stati aggiustati per terapia di induzione, livelli ematici di Tacrolimus, uso di MMF o steroidi. (IC=95% * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$) Le colonne di destra rappresentano i livelli di MFI nei trapiantati di fegato (rosso) e rene (blu) dopo l'aggiustamento, le colonne di sinistra i risultati "crudi".

4.4 Risposta cellulare: valutazione cellule T produttrici IFN- γ / IL-2

Il secondo obiettivo primario dello studio consiste nel confrontare, tra le due coorti, le risposte cellulo-mediate al vaccino considerando ciascun *time points*. Dopo la vaccinazione le cellule T secernenti IFN- γ non sono aumentate in maniera significativa nei trapiantati di rene: confrontando T1 rispetto a T0 con equazioni di stima generalizzate P risulta 0.51; valutando T2 rispetto a T0 P permane maggiore di 0.05 (P=0.59). Considerando invece i trapiantati di fegato, già dopo la prima dose l'aumento di cellule è considerevole (T1 rispetto a T0 P=0.010; T2 rispetto T0 P=0.017). L'entità di cellule T ottenuta con FluoroSpot in T0 è ridotta in entrambi i trapiantati; in T1 è rispettivamente di 25.6 e 10.8 *SFUs/5x10⁵ cellule* nei trapiantati di fegato e rene (P=0.025). In T2 il numero di cellule T reattive è invece di 27.9 nei trapiantati di fegato e 10.9 in quelli di rene (P=0.021). La differenza nei due gruppi è significativa: il numero di cellule T reattive nei trapiantati di fegato è superiore a quello dei trapiantati di rene sia dopo la prima, che dopo la seconda dose.

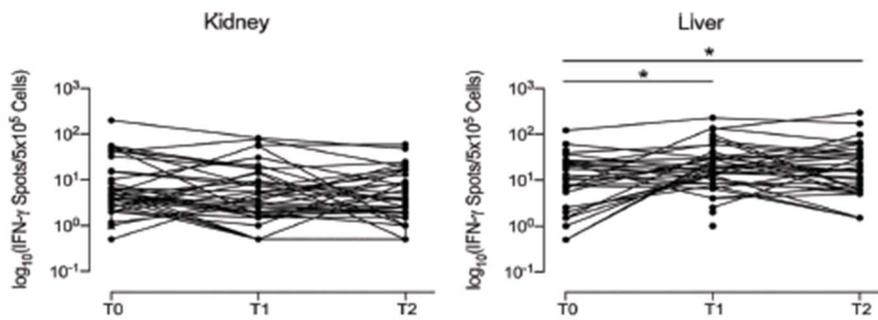


Figura 15: Risposte cellulari individuali dei trapiantati: linfociti T reattivi contro Spike (secernenti IFN- γ). Nei KT: T1 vs T0 P=0.51, T2 vs T0 P=0.59; nei LT T1 vs T0 P=0.01, T2 vs T0 P=0.017. *P<0.05.

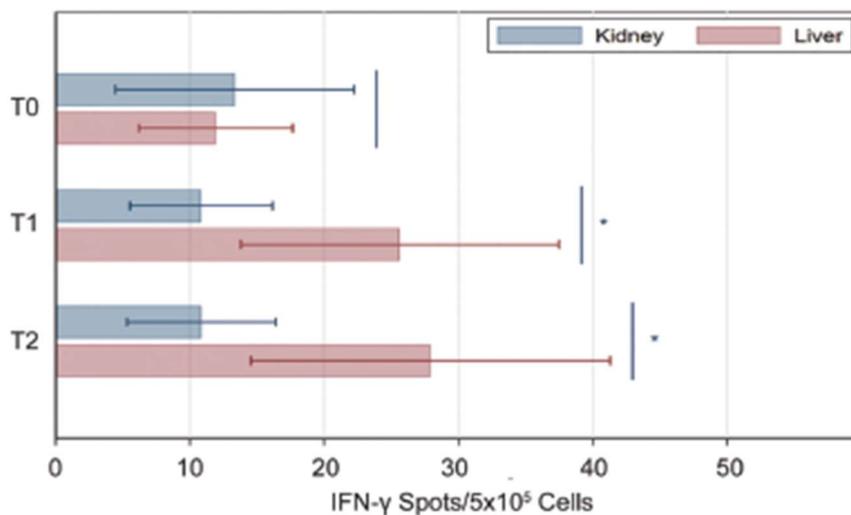


Figura 16: Numero di cellule T secernenti IFN- γ contro Spike nei trapiantati di fegato (rosso) e rene (blu). In T1 25.6 nei LT vs 10.8 SFUs/500000 cellule nei KT ($P=0.025$); in T2 27.9 vs 10.9 SFUs/500000 cellule ($P=0.021$). IC=95% * $P<0.05$.

Anche nel caso della risposta cellulare si è deciso di aggiustare i dati in base ai livelli ematici di Tacrolimus, terapia di induzione, uso di MMF o steroidi. Si sono quindi considerati anche in questo caso solo i pazienti in terapia con Tacrolimus. Le cellule T reattive contro Spike in T2 restano comunque più numerose nei trapiantati di fegato ma la differenza con i trapiantati di rene perde significatività statistica. ($P=0.31$)

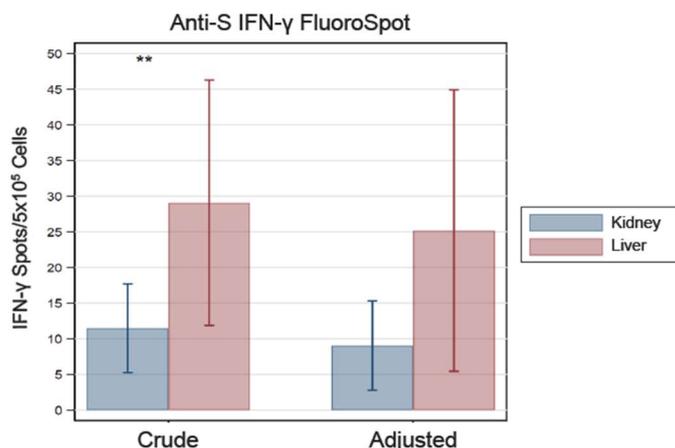


Figura 17: Livelli di cellule T reattive (IFN- γ +) in T2 nei trapiantati di fegato (rosso) e rene (blu) in terapia con Tacrolimus. Dati aggiustati in base ai livelli ematici di Tacrolimus, uso di MMF e steroide, terapia di induzione. Le linee orizzontali rappresentano IC=95% ** $P < 0.01$

Si sono poi comparate le cellule T secernenti IFN- γ sviluppate dai soggetti con livelli di anticorpi responsivi (MFI di IgG anti-RBD ≥ 8800) e quelle dei non responsivi. In questo caso i trapiantati non sono stati suddivisi in base all'organo trapiantato ma sono stati valutati come un unico gruppo e suddivisi unicamente in base alla responsività. Le analisi mostrano che i trapiantati responsivi hanno un aumento più rilevante di linfociti T reattivi in T2 rispetto ai non responsivi: 26.2 contro 9.3 SFUs/5x10⁵ cellule. (P=0.010) Figura 4.9 Confronto dei livelli di cellule T tra trapiantati con livelli di IgG anti-RBD considerati responsivi [(MFI

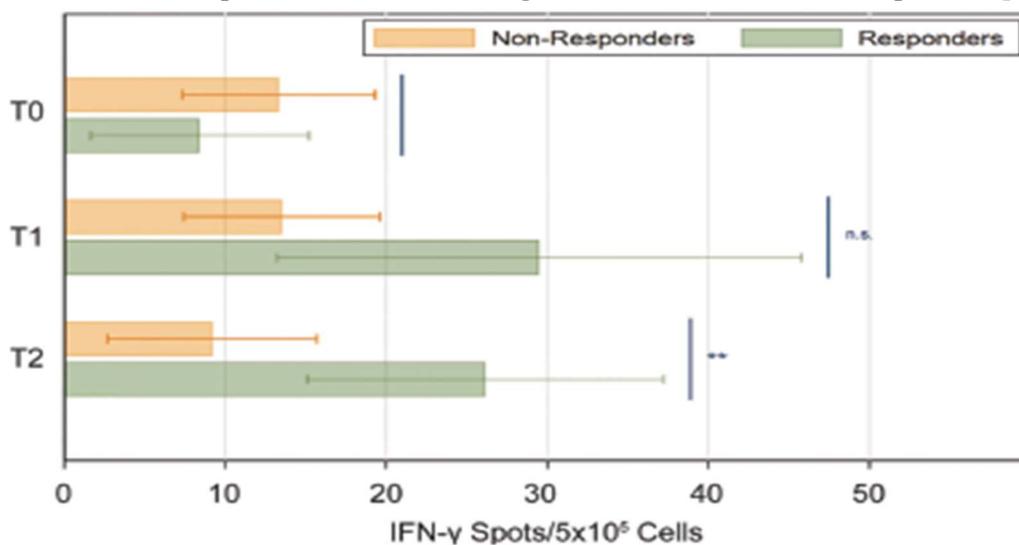


Figura 18: Confronto fra SFUs tra pazienti con livelli di Abs anti-RBD considerati responsivi (MFI ≥ 8800) n.s. = non significativo, ** $P < 0.01$, IC=95%

almeno di 8800) verde] e non responsivi (giallo). Le linee orizzontali rappresentano IC=95%. n.s.= non significativo **P<0.01

Relativamente alle cellule T secernenti IL-2 contro Spike, queste risultano ridotte in ambedue le categorie di trapiantati e sia prima che dopo la vaccinazione. Il medesimo riscontro si ha in merito ai linfociti produttori sia IL-2 che IFN- γ . Pur non essendoci differenze significative tra gli organi, si sono individuati più soggetti con linfociti T IL-2/IFN- γ + tra i trapiantati di fegato.

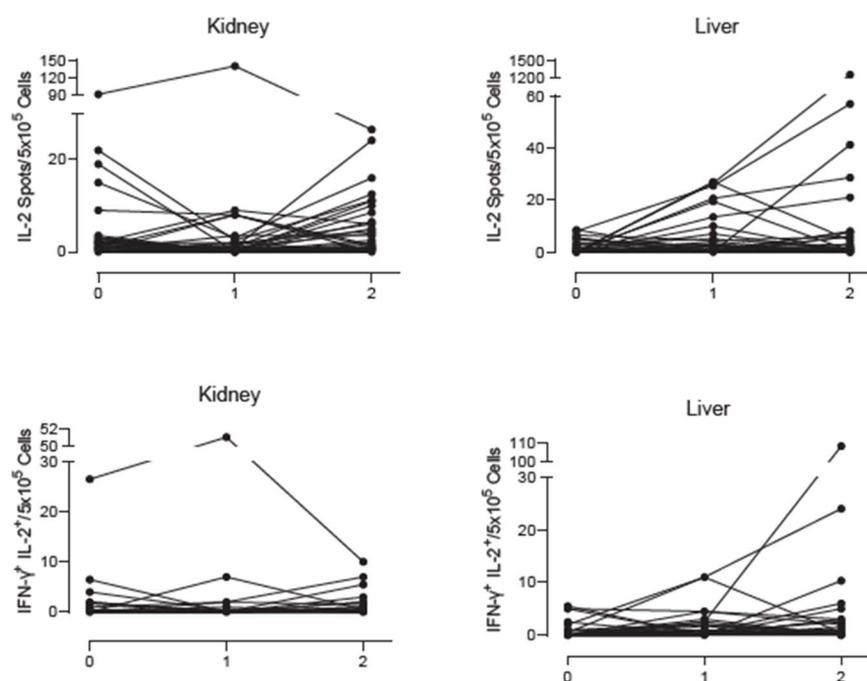


Figura 19: Risposte cellulari individuali dei trapiantati: linfociti T secernenti IL-2 o IL-2 e IFN- γ contro S. La conta di questi linfociti è ridotta (in T0, T1, T2) in entrambi i gruppi. Ci sono però più soggetti con questi linfociti tra i trapiantati di fegato.

Non si sono infine individuati linfociti T produttori IL-2 o IFN- γ contro la proteina di membrana o del nucleocapside in nessuno dei due gruppi.

4.5 Valutazione anticorpi contro le varianti e altri ceppi di Coronavirus

Con l'utilizzo di One Lambda è stato possibile valutare in aggiunta anche la specificità degli anticorpi anti-RBD verso le principali VOC e VOI di SARS-CoV-2. In particolare si sono valutate le MFI delle IgG dirette contro specifiche

mutazioni di RBD che caratterizzano alcune varianti di SARS-CoV-2. (VOC: Alpha, Beta, Delta, Gamma; VOI: Epsilon, Kappa, Zeta). Le analisi sono state ripetute, come descritto nel sottoparagrafo 4.3.1 per la forma *Wild Type*, aggiustando i dati in base all'immunosoppressione e considerando solo i pazienti in Tacrolimus. I risultati evidenziano che, come per il virus di Wuhan, i trapiantati di rene hanno livelli di MFI inferiori per tutte le varianti rispetto ai trapiantati di fegato. Questa differenza persiste anche dopo aggiustamento per quasi tutte le varianti (ad eccezione di Kappa).

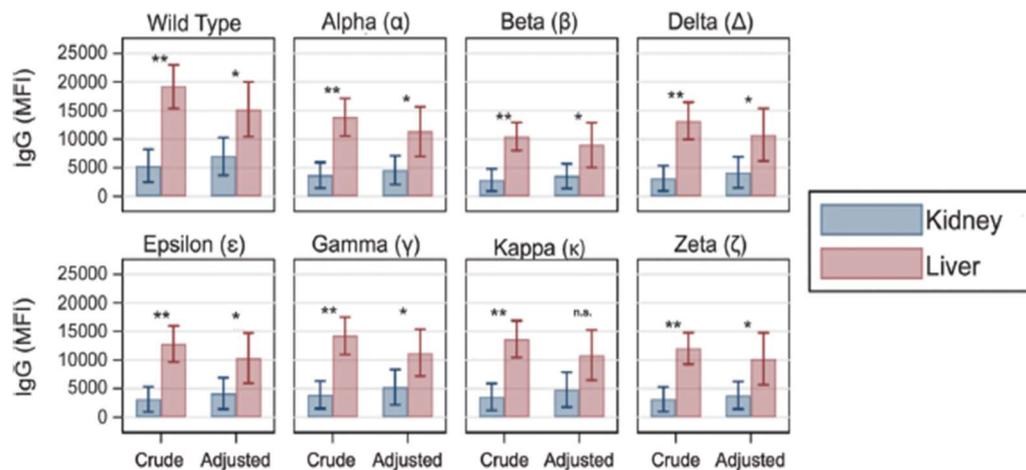


Figura 20: IgG anti-RBD dirette contro alcune varianti nei trapiantati di fegato (rosso) e rene (blu). Le analisi sono presentate anche dopo aggiustamento per livelli ematici di Tacrolimus, uso di MMF e steroidi, terapia di induzione ("Adjusted"). IC=95%. n.s.=non significativo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Gli anticorpi elicitati dal vaccino sono specifici per SARS-CoV-2. Osservando infatti i valori di MFI degli anticorpi diretti verso la proteina S degli altri sette ceppi di Coronavirus (HCoV229E, HKU1, NL63S, OC43, SARS-CoV-1 e MERS-CoV), non ci sono differenze tra i tre *timing* considerati. Non ci sono variazioni significative nemmeno tra i due tipi di trapiantati. In entrambe le coorti la maggior parte dei trapiantati presenta già in T0 elevati livelli di IgG dirette contro i quattro ceppi di Coronavirus responsabili di comuni raffreddori stagionali. Nessun paziente ha anticorpi contro MERS-CoV o SARS-CoV-1. Dunque la vaccinazione non protegge verso altri ceppi virali ma stimola la produzione di IgG dirette esclusivamente verso epitopi di SARS-CoV-2.

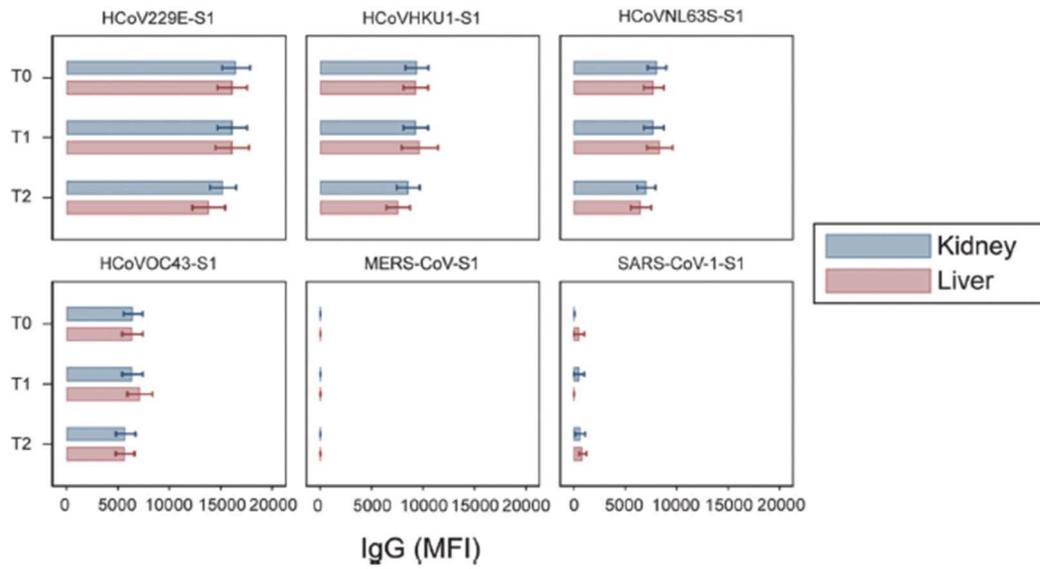


Figura 21: IgG contro la subunità S1 degli altri sei ceppi di Coronavirus. MFI per la positività: HKU1: 11636, NL63S: 6392, OC43: 4888, MERS: 27, SARS-CoV-1: 58. Non variazioni significative T1 o T2 e nemmeno tra le due coorti. Le linee orizzontali rappresentano IC=95%.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

I trapiantati sono una categoria a rischio per scarsa risposta alla vaccinazione contro SARS-CoV-2. La letteratura è concorde nel confermare che l'efficacia del vaccino BNT162b2 è inferiore nei trapiantati rispetto alla popolazione generale con percentuali di sieroconversione dopo due dosi di circa il 20% in meno. Inoltre in questa categoria, i trapiantati di rene sembrano quelli con percentuali più basse, ma non è mai stato eseguito uno studio di comparazione. Questo lavoro, oltre a confermare quanto già riscontrato da altri, si distingue per il confronto tra due coorti di trapiantati con diverso tipo d'organo. L'ipotesi, confermata da questa ricerca, consiste infatti nel sostenere che i trapiantati di rene abbiano immunogenicità al vaccino peggiore dei trapiantati di fegato.

I risultati della nostra ricerca suggeriscono che i trapiantati di fegato hanno avuto un aumento significativo degli anticorpi diretti contro la proteina Spike già con la prima dose mentre i trapiantati di rene solo dopo la seconda. Tale dato si ha per tutte le tipologie di anticorpi anti proteina S senza una particolare selettività verso un epitopo. Valutando i livelli medi di IgG anti-RBD dopo tre settimane dalla seconda dose, questi sono tre volte più elevati nei trapiantati di fegato rispetto ai trapiantati di rene. I trapiantati di fegato hanno avuto quindi un incremento di anticorpi più precoce e di maggior entità rispetto ai trapiantati di rene. Le cause della discrepanza tra le risposte anticorpali delle due coorti sono da ricercare nelle caratteristiche dei pazienti. I fattori predittivi negativi per scarsa risposta anticorpale, noti in letteratura, sono: età avanzata, ridotta funzionalità renale, terapia dialitica prolungata, uso di MMF, steroidi, Belatacept o plurimi farmaci immunosoppressivi. [47] [65] [66] [53] Osservando le caratteristiche generali delle due coorti si può affermare che queste sono omogenee: l'unica differenza significativa consiste nell'età media al momento della prima dose che è minore nei trapiantati di rene. La differenza di età non può tuttavia spiegare la scarsa risposta

dei trapiantati di rene che anzi, avrebbero dovuto sviluppare titoli anticorpali superiori essendo più giovani. Probabilmente se l'età fosse stata maggiore nei trapiantati di rene si sarebbero riscontrate differenze nei livelli anticorpali ancora più marcate nei due gruppi.

Le due coorti differiscono invece nettamente per quanto riguarda la terapia immunosoppressiva. In primis i trapiantati di rene hanno più di frequente terapia di induzione all'immunosoppressione in particolare con globuline anti-timocitarie. Queste vengono utilizzate nell'immediato post-trapianto e agiscono attivando il TNF e inducendo apoptosi dei linfociti T. Determinano non solo deplezione dei linfociti T (soprattutto CD4+) ma anche dei linfociti B naïve e di memoria. Queste alterazioni sono reversibili solitamente entro un anno dalla somministrazione ma, in alcuni pazienti, il sistema immunitario risente anche per molto tempo di questa terapia. [67] [68] [69] [70] L'uso di MMF, farmaco correlato con scarsa risposta alla vaccinazione, è prevalente nei trapiantati di rene rispetto a quelli di fegato (78.8% vs 32%). MMF agisce più marcatamente di altri immunosoppressori riducendo anche i linfociti B e la formazione di anticorpi. [47] [71] [72] Per questi motivi è stato suggerito da alcuni studiosi la temporanea sospensione di questo immunosoppressore durante il periodo della vaccinazione, pratica tuttavia sconsigliata dalle principali società internazionali di trapianto d'organo. [73] [74] Anche l'assunzione di Steroidi è un fattore di rischio per scarsa risposta alla vaccinazione e il loro uso è preponderante nei trapiantati di rene della nostra coorte (76.9% vs 6.0%). [47] Infine i livelli di Tacrolimus ematici riscontrati nella popolazione di questo studio sono significativamente maggiori nei trapiantati di rene (6.2 ± 1.4 ng/ml vs 3.9 ± 1.8 ng/ml). I trapiantati di rene hanno quindi regimi immunosoppressivi maggiormente impattanti sul sistema immunitario e più sfavorevoli per la risposta alle vaccinazioni.

Tuttavia, anche tenendo conto di queste diversità, dopo aggiustamento per i fattori sopracitati, la differenza nei livelli di MFI si riduce ma resta significativa. Le differenti terapie immunosoppressive non spiegano quindi interamente la disparità nella risposta anticorpale delle due coorti che è dunque determinata in parte anche dal tipo di organo trapiantato. La scarsa risposta nei trapiantati di rene potrebbe essere dovuta all'immunodeficienza causata dall'insufficienza renale cronica pre-

trapianto. L'accumulo di tossine uremiche conseguente ad alterata filtrazione glomerulare, l'acidosi metabolica, l'infiammazione cronica che caratterizzano l'insufficienza renale terminale sono responsabili di una precoce senescenza del sistema immunitario. Le alterazioni immunitarie tipiche sono: ridotta funzionalità dei PMN e delle cellule NK, presentazione antigenica deficitaria, linfopenia e ridotta produzione di anticorpi da parte dei linfociti B e soprattutto ridotta funzionalità dei linfociti T CD4+ e CD8+. Questi cambiamenti determinati dall'uremia non sembrano essere reversibili dopo il trapianto di rene. Questo spiega, non solo l'aumentato rischio in questi pazienti di contrarre infezioni, ma anche la ridotta risposta alle vaccinazioni. [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] Anche nei pazienti con disfunzione epatica severa si ha una ridotta funzionalità del sistema immunitario, condizione che prende il nome di *cirrhosis-associated immune dysfunction (CAID)*. La causa principale è determinata dal danno al sistema reticolo-endoteliale e alle cellule di Kupffer. Il danno strutturale a queste cellule provoca riduzione della *clearance* di endotossine e batteri dal sangue. Le cellule non sono più in grado di contrastare la traslocazione batterica intestinale e si instaura così un'infiammazione cronica. È inoltre ridotta la produzione di proteine del complemento essendo compromessa la funzionalità epatica. Anche i pazienti con cirrosi quindi sono più suscettibili ad infezioni e scarsa risposta alle vaccinazioni. La CAID tuttavia è strettamente determinata dalla disfunzione epatica stessa: il grado di disfunzione immunitario dipende dall'eziologia del danno epatico, dalla severità ed estensione del danno. A differenza di quanto accade per i trapiantati di rene, la compromissione immunologica epatica pre-trapianto non determina danni irreversibili al sistema immunitario adattativo: sembra che dopo il trapianto di fegato la disfunzione immunitaria vada verso un lento miglioramento, per quanto possibile vista l'introduzione dei farmaci immunosoppressori. [82]

Per quanto concerne la risposta cellulo-mediata, i livelli di cellule IFN- γ + dirette contro Spike non incrementano in maniera significativa nei trapiantati di rene nemmeno in T2. Nei trapiantati di fegato aumentano già dopo la prima dose. Tra le due coorti quindi la differenza è significativa già in T1, ma non persiste dopo aggiustamento in base all'immunosoppressione. La risposta immunitaria cellulare quindi è più colpita dalle terapie immunosoppressive rispetto alla risposta

anticorpale. La spiegazione di ciò risiede nel fatto che, come visto nel sottoparagrafo 1.2.3, le principali terapie immunosoppressive utilizzate agiscono con meccanismi diversi su differenti vie di segnale per la proliferazione e attivazione dei linfociti T, i quali sono i principali responsabili del riconoscimento degli antigeni del donatore d'organo. È plausibile quindi che le terapie immunosoppressive croniche influenzino maggiormente l'immunità T-mediata rispetto alla produzione di anticorpi. Il tipo di organo trapiantato ha un ruolo meno rilevante sulla risposta cellulare.

È stato riscontrato inoltre che in parte la risposta cellulare dipende dalla sierconversione: i pazienti responsivi avevano infatti SFUs superiori. Alcuni studi riportano il medesimo riscontro confermando una possibile correlazione tra titolo anticorpale ed entità della risposta cellulare. Tuttavia altri studi evidenziano risposte cellulari e umorali discordanti: ci sono trapiantati che hanno avuto solo incremento di anticorpi o viceversa solo di cellule T reattive. [83] [84] [85] [86] Anche nel caso di questo studio alcuni pazienti hanno avuto sierconversione ma non una buona risposta da parte delle cellule T, a testimonianza del fatto che la risposta cellulare non dipende esclusivamente da quella anticorpale. Anche l'analisi delle componenti principali evidenzia una correlazione solo parziale tra le due risposte in quanto le cellule T "proiettano" in dimensioni diverse rispetto agli anticorpi anti-Spike (si veda figura 4.1). I meccanismi con cui le due risposte sono in parte correlate non sono tuttavia chiari e andrebbero quindi studiati più approfonditamente i fattori che influenzano l'una e l'altra risposta.

Non si è riscontrato invece, in nessun *time points* né in ambedue le coorti, aumento di cellule T IL-2+ probabilmente perché lo studio ha considerato solo i primi mesi post-vaccinazione. Altri studi con *end-point* più lunghi hanno mostrato invece aumenti di queste cellule suggerendo che una risposta T IL-2+ si sviluppa più tardivamente di una risposta T IFN- γ +. [87]

Per quanto riguarda la risposta verso le varianti di SARS-CoV-2 come già riportato, in particolare sono quattro le mutazioni del dominio RBD che sembrano ridurre la capacità neutralizzante degli anticorpi: E484K, N501Y e K417N, L452R. [40] I trapiantati hanno sviluppato risposte sierologiche anche verso le principali varianti

con le mutazioni sopracitate. Gli anticorpi elicitati dal vaccino riconoscono tutte le VOC e VOI prese in considerazione anche se con minor forza in confronto alla forma *Wild Type*: si registrano infatti MFI inferiori per tutte le altre forme di SARS-CoV-2. Per tutte le varianti i trapiantati di rene hanno mostrato minori quantità di IgG anti-RBD rispetto ai trapiantati di fegato. L'incremento medio di questi anticorpi nella coorte dei trapiantati di rene è inferiore a + 8800 (considerato il *threshold* per la responsività). In questo gruppo le mutazioni peggiorano ulteriormente la risposta al vaccino rendendolo inefficace nella neutralizzazione delle varianti. Anche dopo aggiustamento secondo il regime immunosoppressivo le risposte restano comunque peggiori in maniera significativa nei trapiantati di rene confermando che il tipo d'organo trapiantato influisce sulla sieroconversione anche nel caso delle varianti di SARS-CoV-2.

La maggior parte dei trapiantati presenta, già in T0, livelli di anticorpi contro i quattro ceppi di Coronavirus stagionali (HCoV 229E, NL63, OC43, HKU1) che superano i livelli minimi di positività. Questo suggerisce che i trapiantati hanno contratto infezione naturale e sviluppato una risposta immunitaria specifica verso questi ceppi, responsabili di comuni raffreddori, già prima della prima dose. Questo risultato conferma il fatto che la presenza di questi Coronavirus è endemica nella popolazione. I restanti due ceppi, SARS-CoV-1 e MERS-CoV, responsabili invece di sindromi respiratorie e polmoniti atipiche severe, non sembrano aver colpito nessun trapiantato. Nessun paziente infatti presenta livelli anticorpali minimi in T0 che indichino pregressa infezione, né si è assistito ad un incremento in T2. In conclusione non si ha nessuna differenza, né nelle due coorti, né tra T0 e T2, tra i livelli di MFI degli anticorpi anti-Spike contro gli altri Coronavirus. Si può concludere quindi che la vaccinazione con BNT162b2 non protegge verso altri ceppi virali ma stimola la produzione di IgG dirette esclusivamente verso epitopi della proteina S di SARS-CoV-2.

5.1 Punti di forza e limiti dello studio

Questo studio osservazionale longitudinale è il primo a confrontare formalmente la risposta immunitaria al vaccino a mRNA tra trapiantati di diverso organo. Il principale punto di forza dello studio consiste nell'analizzare nel dettaglio e in

maniera completa la risposta immunitaria dei trapiantati. È uno studio che considera infatti sia la risposta sierologica che cellulare, discostandosi dalla maggior parte dei lavori che prendono in considerazione solo la valutazione anticorpale. Si sono valutate le IgG dirette contro diversi epitopi della proteina Spike analizzando un'eventuale specificità nell'incremento di anticorpi post-vaccinazione. Si è posta attenzione, visto il problema del grande numero di varianti emergenti, anche sulla risposta immunitaria verso di esse.

La bassa numerosità campionaria e il ridotto tempo di osservazione delle due coorti rappresentano i principali limiti dello studio. Nonostante le coorti avessero caratteristiche omogenee potrebbero esserci fattori confondenti di cui non si è tenuto conto. Non si sono considerate nel dettaglio per esempio eventuali comorbidità dei pazienti. Nelle analisi però si è tenuto conto delle diverse terapie e dei mesi trascorsi dal trapianto che sono paragonabili nelle due coorti. Lo studio non ha inoltre preso in considerazione una coorte di pazienti sani per verificare che la risposta fosse peggiore nei trapiantati rispetto alla popolazione generale. Tuttavia ci sono in letteratura già molteplici studi che confrontano le risposte immunitarie tra trapiantati e non immunosoppressi.

5.2 Prospettive future e implicazioni cliniche

Il tempo di osservazione dei pazienti deve essere prolungato e le analisi ripetute anche dopo inoculazione della dose booster. In questo modo si potrebbe riscontrare, come in altri studi, un incremento nella percentuale dei responsivi sia tra i trapiantati di fegato che di rene. Alcuni studi suggeriscono inoltre una risposta immunitaria diversa nei trapiantati a seconda del vaccino utilizzato: sembra che i vaccini a mRNA siano più efficaci dei vaccini con vettore adenovirale nei pazienti immunosoppressi. Potrebbe essere interessante dunque confrontare anche la somministrazione di vaccini con differente meccanismo d'azione nei trapiantati.

[88]

Questo studio contribuisce a delineare il funzionamento del sistema immunitario nei trapiantati. Comprendere le cause e i meccanismi alla base del deficit anticorpale e cellulare, soprattutto nei trapiantati di rene, permette di cercare nuove strategie per proteggere questa popolazione fragile dall'infezione e implementare

la loro risposta alla vaccinazione. I risultati trovati hanno notevole impatto clinico perché, sapendo che i trapiantati di rene hanno risposte peggiori, questi soggetti dovranno adottare misure di protezione e isolamento maggiori rispetto alla popolazione generale anche da vaccinati. Sicuramente è auspicabile che questi pazienti eseguano la vaccinazione booster ed eventualmente la quarta dose. Anche in seguito a queste tuttavia sarebbe bene monitorare le risposte dei singoli individui e valutarne l'efficacia. [93]

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

I trapiantati di rene sviluppano, in seguito alla vaccinazione con vaccino BNT162b2, risposte sia sierologiche che cellulari ridotte rispetto ai trapiantati di fegato. Mentre la scarsa risposta linfocitaria dei trapiantati di rene dipende in gran parte dalla terapia immunosoppressiva, la differenza nei livelli di anticorpi tra le due coorti è imputabile anche al tipo di organo trapiantato. La disfunzione dell'organo pre-trapianto affligge il sistema immunitario e costituisce un fattore che intrinsecamente influisce sull'esito della profilassi. I trapiantati di fegato, al contrario, hanno risposte sia sierologiche che cellulari al vaccino quantitativamente e qualitativamente superiori. Hanno avuto infatti un incremento di anticorpi e di cellule T reattive più precoce (già con la prima dose) e di maggiore entità. Il sistema immunitario di questa categoria di trapiantati è meno inficiato dalla disfunzione d'organo pre-trapianto e le terapie immunosoppressive sono meno sfavorevoli per la vaccinazione. Quindi in conclusione è necessario, soprattutto nei trapiantati di rene, ricercare strategie per aumentare la produzione di anticorpi post-vaccinazione. È importante tenere in considerazione nella pratica clinica il fatto che la vaccinazione potrebbe non essere protettiva e adottare quindi strategie preventive per evitare che in questi pazienti fragili l'infezione abbia esito fatale.

Bibliografia

- [1] Satarudra Prakash Singh et al. : «Microstructure, pathophysiology, and il therapeutics of COVID-19: A comprehensive review». *J Med Virol*; 93: 275-299
- [2] Francois Henri Jacques, Erik Apedaile: «Immunopathogenesis of COVID-19: Summary and Possible Interventions». *Front Immunol*. 2020 Sep 17; 11
- [3] Joshua N Gustine, Dennis Jones: «Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19» *Am J Pathol* 2021 Jan, 191: 4-17
- [4] Cléa Melenotte et al. : «Immune responses during COVID-19 infection» *Oncoimmunology* 2020 Aug 25, 9
- [5] Ahmet Kursat Azkur et al. : «Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19» *Allergy* 2020 Jul, 75: 1564-1581
- [6] Patrizia Burra, Martina Gambato: «Clinical implications of COVID-19 in patients with chronic liver disease and liver tumor» *Updates Surg*. 2020 Jun, 72: 237-239
- [7] Thomas Marjot et al. : « COVID-19 and liver disease: mechanistic and clinical perspectives» *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021 May, 18: 348-364
- [8] <https://worldhealthorg.shinyapps.io/covid/>
- [9] www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-dashboard.
- [10] Chiara Becchetti et al. : «COVID-19 in an international European liver transplant recipient cohort,» *Gut*. 2020 Oct. 69: 1832-1840.

- [11] Jordi Colmenero et al. : «Epidemiological pattern, incidence, and outcomes of COVID-19 in liver transplant patients,» *J Hepatol*. 2021 Jan, 74: 148-155
- [12] Annalisa Perez et al. «Hypertension, Obesity, and COVID-19: a Collision of Pandemics» *Curr Hypertens Rep* 2021 Jun 29, 23
- [13] Rommel Ramanan «SARS-CoV-2 infection and early mortality of waitlisted and solid organ transplant recipients in England: A national cohort study» *Am J Transplant*. 2020 Nov., 20: 3008-3018
- [14] Filomena Conti , Emmanuel Morelon, Yvon Calmus «Immunosuppressive therapy in liver transplantation» *J Hepatol* 2003 Nov, 39: 664-678
- [15] Tobias Boettler , Thomas Marjot et al. « Impact of COVID-19 on the care of patients with liver disease: EASL-ESCMID position paper after 6 months of the pandemia» *JHEP Rep* 2020 Oct, 2
- [16] Dipesh Kumar Yadav et al., « Immunosuppressants in Liver Transplant Recipients With Coronavirus Disease 2019: Capability or Catastrophe?—A Systematic Review and Meta-Analysis,» *Front Med (Lausanne)*, 2021 Nov 11, 8
- [17] Basil S Karam et al. «mTOR inhibition in COVID-19: A commentary and review of efficacy in RNA viruses,» *J Med Virol* 2021 Apr., 93: 1843-1846
- [18] Sofia Appelberg et al. «Dysregulation in Akt/mTOR/HIF-1 signaling identified by proteo-transcriptomics of SARS-CoV-2 infected cells,» *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec. 9: 1748-1760
- [19] Lorenzo Cavagna et al. «Calcineurin Inhibitor-Based Immunosuppression and COVID-19: Results from a Multidisciplinary

Cohort of Patients in Northern Italy» *Microorganisms* 2020 Jun 30, 8 : 977

- [20] Luca S Belli et al.: «Protective Role of Tacrolimus, Deleterious Role of Age and Comorbidities in Liver Transplant Recipients With Covid-19: Results From the ELITA/ELTR Multi-center European Study» *Gastroenterology* 2021 Mar, 160: 1151-1163
- [21] Quirino Lai et al. «SARS-CoV2 and immunosuppression: a double-edged sword,» *Transpl Infect Dis* 2020 Dec, 22
- [22] Yoshikazu Tanaka , Yuka Sato, Takashi Sasaki «Suppression of Coronavirus Replication by Cyclophilin Inhibitors» *Viruses* 2013 May 22, 5: 1250-60
- [23] AIFA, «Corticosteroidi nella terapia dei pazienti adulti con COVID-19»
- [24] Paolo Cravedi et al.: «COVID-19 and kidney transplantation: Results from the TANGO International Transplant Consortium» *Am J Transplant* 2020 Nov. 20: 3140-3148
- [25] Hua Su et al.: «Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China» *Kidney Int.* 2020 Jul, 98: 219-227
- [26] Bo Diao et al.: «Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection» *Nat Commun* 2021 May 4, n. 12
- [27] Ida Gagliardi et al.: «COVID-19 and the Kidney: From Epidemiology to Clinical Practice» *J Clin Med* 2020 Aug 4, 9
- [28] Evan A Farkash, Allecia M Wilson, Jeffrey M Jentzen: «Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2» *J Am Soc Nephrol* 2020 Aug., 31: 1683-1687

- [29] Francesco Paolo Russo et al. «Global impact of the first wave of COVID-19 on liver transplant centers: A multi-society survey (EASL-ESOT/ELITA-ILTS)» *J Hepatol.* 2022 Feb, 76: 364-370
- [30] <https://www.trapianti.salute.gov.it/trapianti/archivioDatiCnt.jsp>.
- [31] <https://www.trapianti.salute.gov.it/trapianti/archivioNormativaCnt.jsp>
- [32] E. Dolgin: «The tangled history of mRNA vaccines» *Nature* 2021 Sep, 597: 318-324.
- [33] Linde Schoenmaker et al. «mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability» *Int J Pharm* 2021 May 15, 601
- [34] Rein Verbeke et al. «The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case,» *J Control Release* 2021 May, n. 333: 511-520
- [35] Fernando P Polack et al.: «Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine» *N Engl J Med* 2020 Dec 31, 383: 2603-2615.
- [36] Ariel Israel et al. «Elapsed time since BNT162b2 vaccine and risk of SARS-CoV-2 infection: test negative design study» *BMJ*, 2021 Nov., 375
- [37] Edson D Moreira Jr et al. «Safety and Efficacy of a Third Dose of BNT162b2 Covid-19 Vaccine» *N Engl J Med*, 2022 Mar 23, 386: 1910-1921
- [38] Ugur Sahin et al. «COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses» *Nature* 2020 Oct, 586: 594-599
- [39] Sophie M-C Gobeil et al. «Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity» *Science*, 2021, 373.

- [40] Priyal Mistry et al. «SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity,» *Front Immunol*, 2022, 12.
- [41] Desh Deepak Singh, Amna Parveen, Dharmendra Kumar Yadav: «SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines,» *Front Cell Infect Microbiol*, 2021 Dec 14, 11.
- [42] Ayelet Grupper, Helena Katchman: «SARS-CoV-2 Vaccines: Safety and Immunogenicity in Solid Organ Transplant Recipients and Strategies for Improving Vaccine Responses» *Curr Transplant Rep*, 2022 Jan, 9: 35-47
- [43] Brian J Boyarsky et al. «Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients» *JAMA* 2021 Jun 1, 325: 2204-2206
- [44] Dominika Dęborska-Materkowska, Dorota Kamińska et al.: «The Immunology of SARS-CoV-2 Infection and Vaccines in Solid Organ Transplant Recipients» *Viruses*, 2021 Sept 30 ,13:1879
- [45] Pierluigi Toniutto et al. «Past COVID-19 and immunosuppressive regimens affect the long-term response to anti-SARS-CoV-2 vaccination in liver transplant recipients» *J Hepatol*, 2022 Mar 10.
- [46] Ayelet Grupper et al. : «Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus» *Am J Transplant* 2021 Aug, 21: 2719-2726
- [47] Liane Rabinowich et al. «Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients,» *J Hepatol* 2021 Aug,75: 435-438

- [48] Darius F. Ruether et al. «SARS-CoV2-specific Humoral and T-cell Immune Response After Second Vaccination in Liver Cirrhosis and Transplant Patients,» *Clin Gastroenterol Hepatol* 2022 Jan, 20: 162-172
- [49] Pierluigi Toniutto et al. «Past COVID-19 and immunosuppressive regimens affect the long-term response to anti-SARS-CoV-2 vaccination in liver transplant recipients» *J Hepatol*, 2022 Mar, S0168-8278
- [50] Florent Valour, Anne Conrad, Florence Ader, Odile Launay: «Vaccination in adult liver transplantation candidates and recipients» *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2022 April, 24: 126-134
- [51] Pearl P Chong, Robin K Avery «A Comprehensive Review of Immunization Practices in Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell transplant Recipients,» *Clin Ther*, 2017 Aug, 39: 1581-1598
- [52] Markus Cornberg et al. «EASL position paper on the use of COVID-19 vaccines in patients with chronic liver diseases, hepatobiliary cancer and liver transplant recipients,» *J Hepatol* 2021 April, 74: 944-951
- [53] Sergio E Chiarella et al.: Predictors of seroconversion following COVID-19 vaccination, *Annals of Allergy, Asthma Immunology*, 2022 , S1081-1206
- [54] Elena Azzolini et al. «mRNA COVID-19 vaccine booster fosters B- and T-cell responses in immunocompromised patients» *Life Sci Alliance*, 2022 Feb 15, 5.
- [55] Maddalena Giannella, Lígia C Pierrotti, Ilkka Helanterä, Oriol Manuel: «SARS-CoV-2 vaccination in solid-organ transplant recipients: What the clinician needs to know» *Transpl Int* 2021 Oct, 34: 1776-1788

- [56] Sophie Caillard et al.: «Antibody Response to a Fourth Messenger RNA COVID-19 Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Case Series,» *Ann Intern Med* 2022 Mar, 175: 455-456
- [57] Oi-Wing Ng et al.: « Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection,» *Vaccine* 2016 Apr 12, 34: 2008–2014
- [58] Constantin J Thieme et al. «The Magnitude and Functionality of SARS-CoV-2 reactive Cellular and Humoral Immunity in Transplant Population Is Similar to the General Population Despite Immunosuppression» *Transplantation* 2021 Oct, 105: 2156-2164
- [59] Arne Sattler et al.: «Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV-2 BNT162b2 (tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients» *J Clin Invest*, 2021 Jul, 131
- [60] Andrew M Moon et al.: «SARS-CoV-2 Infections Among Patients With Liver Disease and Liver Transplantation Who Received COVID-19 Vaccination,» *Hepatol Commun*, 2022 Apr, 6: 889-897
- [61] Binu V John et al.: «Coronavirus Disease 2019 Vaccination Is Associated With Reduced Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection and Death in Liver Transplant Recipients» *Gastroenterology* 2022 Feb., 162:645-647
- [62] Rommel Ramanan et al. «Two Doses of SARS-CoV-2 Vaccines Reduce Risk of Death Due to COVID-19 in Solid Organ Transplant Recipients: Preliminary Outcomes From a UK Registry Linkage Analysis,» *Transplantation*, 2021 Nov, 105:e263-e264
- [63] <https://www.trapianti.salute.gov.it/trapianti/dettaglioComunicatiNotizieCnt.jsp?lingua=italiano&area=cnt&menu=media&sottomenu=news&id=725>.

- [64] Catharine I Paules, Hilary D Marston, Anthony S Fauci «Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold» *JAMA* 2020 Feb 25, 323: 707-708
- [65] Julian Stumpf et al.: "Humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 vaccination in renal transplant versus dialysis patient: A prospective multicenter observational study using mRNA-1237 or BNT162b2 mRNA vaccine" *The Lancet Regional Health*, 2021, 9:100178.
- [66] Nathalie Chavarot et al.: "Weak antibody response to three doses of mRNA vaccine in kidney transplant recipients treated with belatacept" *Am J Transplant*, 2021 Dec 21: 4043-4051
- [67] Argiris Asderakis et al. "An Analysis of Serological Response and Infection Outcomes Following Oxford-AstraZeneca(AZD1222) and Pfizer-BioNTech (mRNA BNT162b2) SARS-CoV-2 vaccines in Kidney and Kidney Pancreas Transplant", *Transplantation*, 2022 Mar 8
- [68] Georges Mourad 1 , Emmanuel Morelon, Christian Noël, Denis Glotz, Yvon Lebranchu «The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: an update,» *Clinical Transplantation* 2012, 26:E450–E464
- [69] D A Schatz 1 , W J Riley, J H Silverstein, D J Barrett: "Long-Term Immunoregulatory Effects of Therapy with Corticosteroids and Anti-Thymocyte Globulin" *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2008, 11: 269-87
- [70] Ji Hyun Sim, Seung Seok Han "Analysis of Immune Cell Repopulation After Anti-thymocyte Globulin Administration for Steroid-Resistant T-cell-mediated Rejection" *Transplantation Proceedings*, April 2020, 52:759-766

- [71] Lucy Meunier et al.: «Mycophenolate mofetil decreases humoral responses to three doses of SARS-CoV-2 vaccine in liver transplant recipients» *Liver international*, 26 March 2022
- [72] Lucy Meunier et al.: "Mycophenolate mofetil decreases humoral responses to three doses of SARS-CoV-2 vaccine in liver transplant recipients", *Liver International* 2022 Mar 26
- [73] Maddalena Giannella et al. "Evaluation of the Kinetics of Antibody Response to COVID-19 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients: The Prospective Multicenter ORCHESTRA Cohort" *Microorganism* 2022 May 12;10
- [74] <https://www.myast.org/>
- [75] V R Minnaganti, B A Cunha «Infections associated with uremia and dialysis» *Infect Dis Clin North Am* 2001 Jun; 15:385-406
- [76] Claudius Speer et al.: «Early Humoral Responses of Hemodialysis Patients after COVID-19 vaccination with BNT162b2» *Clin J Am Soc Nephrol* 2021 Jul;16:1073-1082
- [77] Matthias Schaier et al.: «The role of age-related T-cell differentiation in patients with renal replacements therapy,» *Immunology and Cell Biology* 2017, 95: 895–905
- [78] S. B. Susan Hartzell et al.: «Kidney Failure Associates With T Cell exhaustion and imbalanced follicular helper T cells» *Frontiers in immunology* 29 Sep 2020, 11
- [79] J-W Yoon, S Gollapudi, M V Pahl, N D Vaziri «Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease» *Kidney International* 2006, 70: 371-376

- [80] Ruud W J Meijers et al. «Uremia-associated immunological aging is stably imprinted in the T cell system and not reversed by kidney transplantation» *Transplant international* 2016, 27: 1272-1274
- [81] G. Cohen: "Immune Dysfunction in Uremia" *Toxins (Basel)* 2020 Jul 5, 12:439
- [82] Agustín Albillos, Margaret Lario , Melchor Álvarez-Mon «Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance» *Journal of hepatology* 2014, 61: 1385–1396
- [83] David Cucchiari et al.: "Cellular and humoral response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients" *American Journal of Transplantation*, 2021, 21:2727-2739
- [84] Ahmad Yanis et al. "Humoral and cellular immune responses to the SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine among a cohort of solid organ transplant recipients and healthy controls" *Transpl Infect Dis* 2022 Feb;24
- [85] Edward E Walsh et al. "Safety and immunogenicity of two RNA-based covid-19 vaccine candidates" *N England Journal*, 2020 Dec 17, 383:2439-2450
- [86] Monica Miele et al. "Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients" *Am J Transplant*, 2021 Aug, 21:2919-2921
- [87] Alexandre Favà et al.: «SARS-CoV-2 specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant recipients» *Am J Transplant* 2021, 21: 2749–2761

- [88] Julian Stumpf et al.: "Humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 vaccination in renal transplant versus dialysis patients: A prospective, multicenterobservational study using mRNA-1273 or BNT162b2 mRNA vaccine" *The Lancet Regional Health* 2021 Oct, 9
- [89] Gili Regev-Yochay et al. «Efficacy of a Fourth Dose of Covid-19 mRNA Vaccine against Omicron» *N Engl J Med* 2022 Apr 386:1377-1380
- [90] Jennifer L Alejo et al. «Antibody Response to a Fourth Dose of a SARS-CoV-2 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients: A Case Series» *Transplantation* 2021 Dec, 105: e280-e281
- [91] Nassim Kamar et al. «Assessment of 4 Doses of SARS-CoV-2 Messenger RNA-Based Vaccine in Recipients of a Solid Organ Transplant,» *JAMA Netw Open*, 2021 Nov.
- [92] Ahmad Yanis et al. "Humoral and cellular immune responses to the SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine among a cohort of solid organ transplant recipients and healthy controls" *Transplant Infection Disease*, 2022 Feb; 24:e13772
- [93] Paolo Cravedi et al. "Differences in Humoral and Cellular Vaccine Responses to SARS-CoV-2 in Kidney and Liver Transplant Recipients" *Frontiers of Immunology* 2022 Apr