

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE – DISCOG**

Direttore: Chiar.mo Prof. Cillo Umberto

U.O.C. GASTROENTEROLOGIA

Direttrice: Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Burra

TESI DI LAUREA

RISPOSTA IMMUNOLOGICA AI VACCINI ANTI SARS- COV-2 IN PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA VIRALE E IMPATTO DEI VACCINI NELLA STORIA NATURALE DI MALATTIA EPATICA

Relatore: Prof. Francesco Paolo Russo

Laureando: Elia Spagnolo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO:

Introduzione: la risposta anticorpale ai vaccini anti Sars-COV-2 dei pazienti con malattia epatica cronica non è del tutto chiara. Il nostro obiettivo era valutare la risposta immunitaria umorale e l'efficacia di due dosi vaccinali anti Sars-COV-2 tra i pazienti con malattia cronica di fegato a diversa eziologia e stadio di malattia. Inoltre abbiamo anche valutato in un gruppo ristretto di pazienti, l'eventuale impatto delle vaccinazioni nella storia naturale della malattia.

Materiali e Metodi: Un totale di 357 pazienti sono stati reclutati in centri clinici di sei paesi europei e 132 volontari sani sono serviti come controlli. Le IgG sieriche (nM), le IgM (nM) e gli anticorpi neutralizzanti (%) contro le proteine spike Wuhan-Hu-1, B.1.617 e B.1.1.529 SARS-CoV-2 sono stati determinati prima della vaccinazione (T0), a 14 giorni (T2) e a 6 mesi (T3) dopo la seconda dose di vaccinazione. I pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione al T2 (n = 212) sono stati stratificati in risposta "bassa" o "alta" in base ai livelli di IgG. I tassi di infezione e la gravità sono stati raccolti durante lo studio.

In un secondo momento, 50 soggetti della coorte di pazienti epatopatici, reclutati nell'Ambulatorio Epatiti di Padova, sono stati analizzati per un follow-up; sono stati contattati telefonicamente per ricercare il tasso di efficacia vaccinale a lungo termine, ed è stata analizzata la loro storia clinica per valutare un eventuale impatto della vaccinazione sulla storia naturale della patologia.

Risultati: I livelli di IgG, IgM e degli anticorpi neutralizzanti Wuhan-Hu-1 sono aumentati significativamente da T0 a T2 nei pazienti vaccinati con BNT162b2 (70,3%), mRNA-1273 (18,9%) o ChAdOx1 (10,8%). Nell'analisi multivariata, età, cirrosi e tipo di vaccino (ChAdOx1 > BNT162b2 > mRNA-1273) sono risultati fattori di rischio di risposta umorale "bassa". Rispetto a Wuhan-Hu-1, i livelli di IgG B.1.617 e di B.1.1.529 erano significativamente più bassi sia a T2 che a T3. Rispetto agli individui sani, i pazienti con malattia cronica di fegato presentavano IgG B.1.1.529 inferiori a T2 senza ulteriori differenze significative. Nessun importante parametro IgG clinico o immunitario associato ai tassi di infezione da SARS-CoV-2 o all'efficacia del vaccino è stato riscontrato.

Nel follow-up della coorte di Padova, sono stati trovati tassi di efficacia vaccinale inferiori rispetto ai dati in letteratura verso le nuove varianti prevalenti; la vaccinazione non ha mostrato un chiaro impatto sulla storia naturale della patologia epatica.

Conclusioni: i pazienti con malattia cronica di fegato e cirrosi mostrano risposta immunitaria inferiore alla vaccinazione anti-Sars-Cov-2, indipendentemente dall'eziologia della malattia. Il tipo di vaccino implica diverse risposte anticorpali che sembrano non associarsi a un'efficacia distinta, sebbene ciò necessiti di convalida in coorti più ampie con una rappresentazione più equilibrata di tutti i vaccini.

ABSTRACT

Background & Aims: The response of patients with chronic liver disease (CLD) to COVID-19 vaccines remains unclear. Our aim was to assess the humoral immune response and efficacy of two-dose COVID-19 vaccines among patients with CLD of different aetiologies and disease stages. In addition, we have also assessed in a small group of patients the potential impact of vaccinations on the natural history of the disease.

Methods: A total of 357 patients were recruited in clinical centres from six European countries, and 132 healthy volunteers served as controls. Serum IgG (nM), IgM (nM), and neutralising antibodies (%) against the Wuhan-Hu-1, B.1.617, and B.1.1.529 SARS-CoV-2 spike proteins were determined before vaccination (T0) and 14 days (T2) and 6 months (T3) after the second dose vaccination. Patients fulfilling inclusion criteria at T2 (n = 212) were stratified into 'low' or 'high' responders according to IgG levels. Infection rates and severity were collected throughout the study. After this study, 50 people from the patients' cohort, recruited in Padova's Viral Hepatitis Clinic, were analyzed for a follow-up study; they were contacted by phone to assess the long-term vaccine efficacy, and their clinical history was checked to look for any impact of vaccination on the underlying chronic liver disease.

Results: Wuhan-Hu-1 IgG, IgM, and neutralisation levels significantly increased from T0 to T2 in patients vaccinated with BNT162b2 (70.3%), mRNA-1273 (18.9%), or ChAdOx1 (10.8%). In multivariate analysis, age, cirrhosis, and type of vaccine (ChAdOx1 > BNT162b2 > mRNA-1273) predicted 'low' humoral response, whereas viral hepatitis and antiviral therapy predicted 'high' humoral response. Compared with Wuhan-Hu-1, B.1.617 and, further, B.1.1.529 IgG levels were significantly lower at both T2 and T3. Compared with healthy individuals, patients with CLD presented with lower B.1.1.529 IgGs at T2 with no additional key differences. No major clinical or immune IgG parameters associated with SARS-CoV-2 infection rates or vaccine efficacy. The follow-up study of Padova's cohort of patients showed lower rates of vaccine efficacy against new prevalent virus variants than those cited in literature; vaccination did not show any sort of impact on the natural history of the underlying chronic liver disease.

Conclusions: Patients with CLD and cirrhosis exhibit lower immune responses to COVID-19 vaccination, irrespective of disease aetiology. The type of vaccine leads to different antibody responses that appear not to associate with distinct efficacy, although this needs validation in larger cohorts with a more balanced representation of all vaccines.

INDICE:

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	4
1.1 SARS-CoV-2	4
1.1.1 L'inizio della pandemia	4
1.1.2 La situazione italiana	4
1.1.3 Generalità coronavirus	5
1.1.4 Modalità di trasmissione	6
1.1.5 Manifestazioni cliniche	6
1.1.6 Le varianti	8
1.1.7 Diagnosi	9
1.1.8 Vaccini	10
1.1.9 Trattamenti	12
1.2 CIRROSI EPATICA	16
1.2.1 Generalità	16
1.2.2 Eziologia	16
1.2.3 Quadro clinico e complicanze	17
1.2.4 Diagnosi e valutazione del paziente cirrotico	18
1.2.5 Deficit immunitario cirrosi-associato	20
1.2.6 Impatto della pandemia	21
1.2.7 COVID-19 e cirrosi	22
1.3 EPATITE B	23
1.3.1 Generalità ed epidemiologia	23
1.3.2 Clinica e diagnosi	24
1.3.3 Trattamento	26
1.3.4 Epatite B e vaccinazioni	26
1.4 EPATITE C	28
1.4.1 Generalità ed epidemiologia	28
1.4.2 Clinica	29
1.4.3 Diagnosi	29
1.4.4 Trattamento	30

1.4.5 Epatite C e vaccinazioni	31
1.5 STEATOSI EPATICA	32
1.5.1 Generalità ed epidemiologia	32
1.5.2 Eziopatogenesi	32
1.5.3 Clinica	33
1.5.4 Diagnosi	33
1.5.5 Trattamento	34
CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO	36
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	37
3.1 DISEGNO DELLO STUDIO	37
3.2 CONTESTO	37
3.3 SELEZIONE DEI PAZIENTI	37
3.4 RACCOLTA DEI DATI	38
3.5 ASPETTI ETICI	39
CAPITOLO 4: ANALISI STATISTICA	41
CAPITOLO 5: RISULTATI	42
5.1 ANALISI DELLA RISPOSTA IMMUNOLOGICA: COORTE DELLO STUDIO MULTICENTRICO	42
5.1.1 Caratteristiche del campione	42
5.1.2 Analisi dati nel breve periodo: T0 – T2 time points	45
5.1.3 Analisi dati nel lungo periodo (T0-T3)	50
5.1.4 Analisi sull'efficacia della vaccinazione tra T2 e T3	53
5.2 FOLLOW-UP COORTE DI PADOVA	56
5.2.1 Caratteristiche del campione	56
5.2.2 Analisi dell'efficacia vaccinale	57
5.2.3 Analisi dell'impatto delle vaccinazioni sull'epatopatia cronica	60

CAPITOLO 6: DISCUSSIONE	63
6.1 FASE DI STUDIO MULTICENTRICO	63
6.2 FASE DI FOLLOW-UP DELLA COORTE DI PADOVA	66
CAPITOLO 7: CONCLUSIONI	70
BIBLIOGRAFIA	72

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 SARS-CoV-2

1.1.1 L'inizio della pandemia

Il 31 dicembre 2019 sono arrivate le prime segnalazioni all'OMS di diversi casi di polmonite severa ad eziologia ignota da parte delle autorità cinesi; i casi erano inizialmente concentrati nella regione di Wuhan, una città da oltre 10 milioni di abitanti, ma già il 14 gennaio 2020 venne registrato il primo caso in Thailandia. Nel frattempo, il patogeno responsabile di questa polmonite è stato identificato e denominato 2019-nCoV (nuovo coronavirus 2019). La Cina ha tentato di contenere il contagio imponendo un lockdown alla città di Wuhan ed annullando tutti i festeggiamenti del capodanno cinese, ma ormai il virus era già troppo diffuso per essere contenuto nei confini nazionali, ed infatti poche settimane dopo, il 30 gennaio 2020, l'OMS ha dichiarato l'emergenza sanitaria di rilevanza internazionale [1]. In pochissimo tempo il virus si è diffuso in tutto il mondo e l'11 marzo 2020 venne dichiarato lo stato di pandemia da parte dell'OMS. Contestualmente, venne cambiata anche la denominazione del Virus, che diventò SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - CoronaVirus - 2), e venne dato un nome anche alla patologia da esso causata: COVID-19 (Coronavirus Disease 2019).

1.1.2 La situazione italiana

L'Italia è stato uno dei primi paesi ad essere colpito dalla pandemia. Il primo caso, infatti, è stato registrato in provincia di Lodi il 20 febbraio 2020, ed il giorno seguente ne sono stati registrati altri 16, distribuiti tra Lombardia e Veneto; tra questi, è stato dichiarato anche il primo decesso ufficiale associato al COVID-19, registrato in provincia di Padova. Le misure di contenimento del virus e di lockdown di comuni e città (denominate "zone rosse") vennero istituite a partire dal 23 febbraio 2020, ma non furono sufficienti a contenere la prima ondata di diffusione del virus: un mese dopo, con il paese interamente in zona rossa con tutte le misure di lockdown attuate, i casi registrati risultarono essere oltre 86.000 con un picco di morti giornaliero del 27 marzo pari a 969. La situazione sembrò migliorare intorno al giugno 2020: il numero di positivi diminuì abbastanza costantemente nei mesi di aprile e maggio rispetto al picco registrato a marzo ed il 23 giugno si registrò il numero più basso di contagi giornalieri dall'inizio della pandemia (113) [1].

Nell'autunno del 2020 si verificò una nuova ondata di contagi, con un picco registrato il 13 novembre di 41.000 nuovi positivi. Nel contesto di questa nuova ondata, a gennaio del 2021, venne identificata

una nuova variante di SARS-CoV-2: si tratta della variante B117, denominata poi “variante inglese” a causa della sua maggiore diffusione iniziale in Gran Bretagna. Verso la metà di dicembre i contagi iniziarono a stabilizzarsi e rimasero più o meno costanti fino a marzo 2021, quando l’Italia venne colpita dalla terza ondata, che diminuì solamente a metà aprile. Tra maggio e giugno aumentarono i contagi dovuti ad una nuova variante del virus, inizialmente denominata Indiana, poi Delta. L’estate 2021 fu caratterizzata da un abbassamento del numero di contagi, con un lieve rialzo ad agosto, ma nel novembre 2021 in Italia venne dichiarata la quarta ondata, con un picco di contagi senza precedenti registrato a gennaio 2022. Questa nuova ondata di contagi fu associata alla variante Omicron, che risultò essere molto più contagiosa delle precedenti; il picco di contagi venne registrato il 18 gennaio 2022, con oltre 212mila nuovi positivi.

Al 16 febbraio 2023, il numero totale di contagiati in Italia ammonta a 25.547.414, mentre i morti ammontano a 187'650. [2]

1.1.3 Generalità coronavirus

I Coronavirus fanno parte della sottofamiglia Coronavirinae della famiglia dei Coronaviridae; la sottofamiglia è composta da 4 generi: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, Deltacoronavirus.

I più rilevanti sono Alpha- e Beta-, i quali infettano esclusivamente i mammiferi (solamente alcuni dei gamma- e delta- hanno possibilità di infettare i mammiferi ma principalmente il loro bersaglio sono gli uccelli). [3]

Si tratta di virus caratterizzati da una proteina fosforilata (N) che compone il nucleocapside che protegge un genoma composto da RNA a singolo filamento a polarità positiva, attorno ai quali si trova un doppio strato fosfolipidico (envelope) che forma una particella sferica o pleomorfa di circa 80-120 nm di diametro. L’envelope presenta solitamente tre proteine di superficie: la glicoproteina S, la più variabile all’interno delle diverse specie di virus, che contiene il Receptor Binding Domain (RBD) responsabile dell’entrata del virus nella cellula ospite; la proteina M (di matrice) più interna e la proteina E (envelope). [4] Il bersaglio della proteina S è, per i principali coronavirus umani, il recettore ACE2, una proteina di membrana espressa in moltissimi distretti del nostro organismo quali polmoni, reni, tratto gastrointestinale, sistema nervoso centrale e sistema cardiocircolatorio, che gioca un ruolo importante nel sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS).

Dei coronavirus di interesse medico, i principali sono sicuramente il SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)-CoV, il MERS (Middle East Respiratory Syndrome)-CoV ed il SARS-CoV-2.

Il primo è stato identificato per la prima volta nel 2002, in Cina, nella provincia di Quangdong, da cui poi si diffuse in oltre 30 nazioni; causò più di 8mila casi nel mondo con 774 decessi, ma dal 2004 non si sono più verificati nuovi casi. Il MERS-CoV invece diede origine ad una epidemia nel settembre del 2012 che colpì principalmente il medio-oriente, infettando 2519 persone in 27 paesi e causando la morte di 866 di esse. La principale causa di morte dovuta all'infezione di questi virus è rappresentata dalla Sindrome da Distress Respiratorio Acuto (ARDS). [5]

Il SARS-CoV-2, responsabile del COVID-19, è un betacoronavirus la cui sequenza genetica è identica per l'80% al SARS-CoV e per il 50% al MERS-CoV. [6]

Le differenze rispetto agli altri due riguardano sicuramente la contagiosità: il SARS-CoV-2 infatti è molto più contagioso degli altri due, con un R_0 stimato di 2.2. [7] L' R_0 è un parametro che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie causate da ciascun individuo in assenza di interventi esterni: un R_0 pari a 2.2 indica che ogni persona infetta ne contagia in media altre 2.2. Ad esso viene solitamente contrapposto il parametro R_t , che invece rappresenta il numero medio di infezioni secondarie dopo l'applicazione di misure atte a contenere il diffondersi della patologia; per contenere la diffusione del patogeno quindi è chiaro che l'obiettivo deve essere quello di fare in modo che l' R_t sia inferiore ad 1.

1.1.4 Modalità di trasmissione

La principale modalità di trasmissione del SARS-CoV-2 è quella diretta (person-to-person) tramite goccioline respiratorie contenenti il virus; tali goccioline possono essere espulse dalla persona infetta tramite starnuti e/o colpi di tosse, e successivamente inalate da persone nelle vicinanze con successiva infezione delle vie respiratorie. [8]

Oltre alla trasmissione diretta è rilevante anche la contaminazione ambientale: il SARS-CoV-2 può rimanere stabile ed infettivo nell'aria per ore, [6] addirittura sulle superfici di plastica per giorni, perciò, toccando superfici infette e successivamente il proprio naso, bocca o occhi si può venire infettati.

1.1.5 Manifestazioni cliniche

Lo spettro delle manifestazioni cliniche associate al COVID-19 è molto ampio: si ha infatti una maggioranza di persone asintomatiche o paucisintomatiche, con un quadro clinico gestibile a livello domiciliare, ma anche un numero non indifferente di persone che invece arrivano ad avere necessità

di ricovero in reparti di terapia intensiva. Tra questi, il rischio maggiore riguarda soprattutto anziani e soggetti con comorbidità importanti come diabete, ipertensione, obesità, malattie cardiovascolari e polmonari.

I sintomi associati al COVID-19 sono svariati, tra i più comuni si annoverano tosse secca, febbre, mialgia, astenia, mal di testa, produzione di espettorato e diarrea. Vengono inoltre riportate comunemente anche anosmia (perdita dell'olfatto) e ageusia (perdita del gusto). Nella forma severa della patologia il sintomo principale è la dispnea, che compare mediamente 8 giorni dopo il contagio. La variante Omicron, diversamente dalle precedenti, causa sintomi prevalentemente legati alle alte vie respiratorie, come mal di gola o rinorrea [9].

In generale, le manifestazioni cliniche da COVID-19 sono divise in polmonari ed extrapolmonari. [10] Tra queste ultime si riscontrano sintomatologie gastrointestinali ed epatiche (di interesse per questo studio), ma anche cardiovascolari, neurologiche, renali, psichiatriche, dermatologiche ed endocrinologiche.

A livello gastrointestinale: i sintomi più comunemente riportati sono diarrea, nausea, anoressia, vomito, dolori addominali e sanguinamenti. [10] Generalmente, sono associati maggiormente alle forme severe di malattia. Il coinvolgimento del tratto gastrointestinale è dovuto al fatto che il recettore ACE2, target della proteina S del virus, è abbondantemente espresso nelle cellule gastriche e in quelle intestinali: legandosi ad esso, il virus genera risposta infiammatoria e conseguente storm citochinico che sta alla base della sintomatologia.

A livello epatico: il recettore ACE2 è presente anche in tale organo, nello specifico a livello dei colangiociti. Anche in questo caso, quindi, il principale fattore di danno riconosciuto nelle forme severe di coinvolgimento epatico è lo storm citochinico generato in risposta all'infezione delle cellule da parte del virus [11]. Altre cause di danno epatico sono il danno epatico farmaco-indotto (DILI), il danno dovuto ad azione citotossica del virus e la disfunzione epatica ischemica in contesto di insufficienza multiorgano, caratteristica delle fasi più severe e spesso terminali del COVID-19. Sono stati riportati casi di innalzamenti dei livelli degli indici di danno epatico (AST, ALT, GGT, ALP) sia in pazienti con sintomatologia moderata di COVID-19 sia in pazienti con forma severa di patologia, che hanno avuto un riscontro di livelli di transaminasi e di bilirubina almeno doppi rispetto ai pazienti

con sintomatologia moderata [12]. È stato inoltre registrato che la preesistenza di patologia epatica rappresenta un fattore di rischio importante per l'ospedalizzazione e la mortalità da COVID-19 [13].

1.1.6 Le varianti

I virus, ed in particolare i virus a RNA come il SARS-CoV-2, sono in costante evoluzione attraverso mutazioni che accorrono al loro genoma, le quali vengono facilitate dalla diffusione del virus stesso e della sua replicazione negli organismi infettati. La maggior parte delle mutazioni non ha un impatto clinico significativo, ma quelle che occorrono a livello della porzione di genoma codificante per la glicoproteina Spike, avendo potenziale di andare ad alterare il Receptor Binding Domain, possono alterare la patogenesi ed il comportamento del virus, in quanto la risposta immunitaria precedentemente acquisita (per infezione naturale o per vaccinazione) perderebbe di efficacia; questo è infatti il motivo per cui i vaccini hanno meno efficacia neutralizzante contro le nuove varianti di virus isolate successivamente alla loro produzione.

Ad oggi le varianti principali sono:

- ALFA: la prima variante emersa, classificata con la sigla B.1.1.7 individuata nel dicembre 2020 in Inghilterra e denominata "variante inglese". È caratterizzata da un'efficacia di trasmissione 1.5 volte maggiore rispetto all'originale SARS-CoV-2.
- BETA: identificata in Sudafrica nel settembre 2020, chiamata inizialmente per questo motivo "variante sudafricana". Classificata con la sigla B.1.351.
- GAMMA: identificata in Giappone e successivamente in Brasile ad inizio 2021, viene classificata con la sigla P.1. Rispetto all'originale SARS-CoV-2 presenta tre mutazioni coinvolte nell'efficacia di legame del virus al recettore ACE2.
- DELTA: identificata per la prima volta in India, classificata con la sigla B.1.617.2.2. Ha un'efficienza di trasmissione stimata tra il 50% ed il 60% superiore rispetto alla variante Alfa, andando a sostituire quest'ultima nel ruolo di variante dominante.
- OMICRON: identificata anch'essa in Sudafrica per la prima volta, a fine novembre 2022. Viene classificata con la sigla B.1.1.529, e risulta molto più contagiosa rispetto alle sue controparti. Per questo motivo, si è diffusa in pochissimo tempo in tutto il mondo, dando origine alla

quarta ondata in Italia, la peggiore dal punto di vista del numero di contagi giornalieri. Nonostante la sua maggiore capacità di diffusione, risulta la variante meno pericolosa, in quanto solitamente la sintomatologia è limitata alle vie aeree superiori. Andando a sequenziare il genoma, si sono notate circa 50 mutazioni rispetto all'originale virus isolato a Wuhan. [14]

1.1.7 Diagnosi

L'unico modo di poter dare certezza di diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 è il riscontro, diretto o indiretto, della presenza del virus all'interno dell'organismo del paziente. Va però considerato il periodo di incubazione del virus (mediamente intorno ai 5 giorni dall'infezione), perché se effettuato troppo presto, il test diagnostico non avrà sufficiente RNA né anticorpi né antigeni in circolo riconoscibili e risulterà quindi negativo.

Per ricercare la presenza di SARS-CoV-2 nell'organismo del paziente ci sono diversi approcci [15]:

- Test molecolari che rilevano la presenza di genoma virale:
Considerati il gold standard diagnostico, funzionano tramite meccanismo Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) che permette la trascrizione inversa del SARS-CoV-2-RNA in cDNA che viene successivamente amplificato e misurato.
- Test antigenici che rilevano la presenza di antigeni virali:
Sono i cosiddetti tamponi "rapidi", contengono come substrato degli anticorpi specifici contro gli antigeni virali del SARS-CoV-2; quando messi in contatto con specifici peptidi delle proteine S o N, si legano e danno un riscontro positivo, in caso contrario il test è negativo. Questi test, tuttavia, hanno forte dipendenza da fattori come lo stadio della malattia e la carica virale nel paziente [16], motivo per cui, quando hanno iniziato ad essere utilizzati, solitamente veniva richiesto un test molecolare di conferma in caso di riscontro positivo.
- Test sierologici che rilevano presenza di IgM e IgG:
Hanno valore solo retrospettivo, non possono quindi essere usati nella fase acuta della malattia ma sono utili per studi di tipo epidemiologico per capire se ad esempio l'immunizzazione da vaccino è avvenuta nel paziente. Generalmente le IgM hanno un picco durante la seconda settimana dall'infezione, mentre le IgG a partire dalla terza [17]. Essendo i vaccini, ad oggi, diretti esclusivamente contro la proteina Spike, è possibile ricercare

anticorpi rivolti verso la proteina N per differenziare l'immunizzazione da vaccino da quella per infezione naturale.

- Amplificazione dell'acido nucleico isotermale:

Si tratta di approcci basati su CRISPR/Cas, PCR digitale e chemiluminescenza, ad oggi utilizzati esclusivamente in ambito di ricerca.

- Tecniche di imaging radiologico:

Prima dello sviluppo dei test diagnostici, la diagnosi era basata su sintomi e su quadri radiologici caratteristici: Rx torace e TC ad alta risoluzione risultavano le metodiche migliori per diagnosticare una polmonite da COVID-19. Alla TC ad alta risoluzione sono riconoscibili opacità bilaterali interstiziali a vetro smerigliato, che garantiscono un'altissima sensibilità (95-100%) ma una limitata specificità. L'Rx torace, invece, ha meno sensibilità. Ad oggi l'imaging rimane una valida opzione per il monitoraggio della malattia, ma ha pochissimo utilizzo a livello diagnostico.

1.1.8 Vaccini

Il target antigenico principale utilizzato nello sviluppo di vaccini anti-SARS-CoV-2 è la proteina S. Essa è composta da 2 subunità: la subunità S2 contiene il RBD ed è quindi responsabile del legame al recettore ACE2, mentre la subunità S1 permette la fusione con la membrana cellulare. Si è visto che di tutte le proteine presenti sulla superficie del virus, la proteina Spike è quella che genera una maggiore risposta da parte del sistema immunitario, con una produzione di anticorpi neutralizzanti molto superiore rispetto ad altre proteine [18].

La prima vaccinazione contro il SARS-CoV-2 è stata eseguita nel Regno Unito l'8 dicembre 2020. L'EMA (Agenzia Europea del Farmaco) ha dato autorizzazione alla somministrazione del vaccino Pfizer-BioNTech per primo, nel dicembre 2020, poi al vaccino Moderna nel gennaio 2021. Successivamente, nel febbraio del 2021 il vaccino Astrazeneca ha ottenuto l'approvazione, ed infine il vaccino Johnson and Johnson.

Ad oggi, 17 ottobre 2023, in Italia sono state somministrate oltre 145 milioni di dosi di vaccino. [19]

Dei vaccini a disposizione, ci sono tre diverse tipologie:

- Vaccini a mRNA:

Sono vaccini che contengono al loro interno molecole di RNA messaggero (mRNA) che codificano per determinati antigeni proteici. L'mRNA è incapsulato all'interno di nanoparticelle lipidiche (LNPs) che garantiscono stabilità, ed il complesso LNP-mRNA viene internalizzato dalla cellula ospite successivamente all'iniezione intramuscolo del vaccino. Una volta nella cellula, l'mRNA funge da stampo per la sintesi della proteina Spike full-length, che sarà poi riconosciuta dal sistema immunitario.

I vaccini a mRNA hanno mostrato numerosi vantaggi rispetto ai precedenti vaccini "tradizionali", sia per sicurezza e costi di produzione, sia per la risposta immunitaria a livello cellulare e anticorpale. Ad oggi i vaccini a mRNA autorizzati sono quelli di Pfizer/BioNTech (BNT162b2) e Moderna (mRNA-1273). Entrambi hanno dimostrato una notevole efficacia nella prevenzione della malattia severa [20] [21].

- Vaccini a vettore virale:

Sono vaccini che sfruttano dei virus ai quali è stato modificato il genoma, inserendo al suo interno geni di codifica per l'antigene o gli antigeni di interesse. Una volta inoculato nel paziente, il virus sfrutterà il complesso traduzionale delle cellule dell'ospite per produrre le proteine codificate nel suo genoma, tra cui l'antigene target inserito.

I virus vettore più usati per la produzione e lo sviluppo di vaccini sono gli adenovirus, i lentivirus ed il vesicular stomatitis virus.

Ci sono due tipologie di questo tipo di vaccini: vaccini a vettore virale non-replicante e vaccini a vettore virale replicante.

I primi sono quelli più utilizzati; oltre all'inserimento del gene codificante per l'antigene target, vengono rimossi geni strutturali fondamentali per la replicazione del virus, che diventano così incapaci di riprodursi. Uno dei maggiori svantaggi di questo tipo di vaccini è che i vettori possono essere parzialmente neutralizzati da una preesistente immunità presente nel paziente, con riduzione quindi dell'efficacia della vaccinazione. Per prevenire questa eventualità l'Università di Oxford ha utilizzato come vettore una versione modificata di un adenovirus di scimpanzé, chiamata ChAdOx1. Da esso nasce quindi il vaccino ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) [22]. Il vaccino Johnson and Johnson (JNJ-78436735), invece, sfrutta come vettore l'adenovirus umano di tipo 26 [23].

- Vaccini basati su proteine:

Questi vaccini vengono prodotti sfruttando la tecnologia del DNA ricombinante. Viene isolato un gene codificante per un antigene di interesse, per poi espanderlo e farlo trascrivere da sistemi di espressione genica che possono essere cellule di lievito, cellule di mammifero o batteriche; successivamente, l'antigene prodotto da questa espressione genica viene purificato ed associato a determinanti adiuvanti per essere poi somministrato come vaccino. L'ospite che riceve questa somministrazione svilupperà così immunità nei confronti di quell'antigene [24].

Molti vaccini sono già stati prodotti utilizzando questa tecnologia, tra cui i vaccini contro Human Papillomavirus (HPV), influenza, epatite B e meningococco B. Fa parte di questo gruppo il vaccino per SARS-CoV-2 prodotto da Novavax, chiamato NVX-CoV2373 [25]; questo tipo di vaccini ha sicuramente forti vantaggi in quanto a sicurezza ed economicità, tuttavia dipendono molto dagli adiuvanti che servono per aumentare la loro immunogenicità.

1.1.9 Trattamenti

Dall'inizio della pandemia la ricerca medica si è impegnata su due fronti: uno è quello della prevenzione, tramite lo sviluppo di vaccini verso questo nuovo virus, l'altro è invece quello della terapia della patologia causata dall'infezione. Per quanto riguarda quest'ultima, nel tempo ci sono stati diverse ipotesi e diversi approcci, e sebbene non sia stata trovata una soluzione definitiva ed univoca per tutti i pazienti, ad oggi sono disponibili diversi approcci terapeutici, che sono classificabili in base al loro target: terapie antivirali e terapie mirate alla sintomatologia del paziente [26].

Tra le terapie antivirali, le principali opzioni studiate sono:

- Inibitori delle polimerasi:

Tra questi il più promettente sembrava essere Remdesivir, un profarmaco nucleotidico il cui prodotto metabolico ha azione inibitrice a livello delle RNA-polimerasi. Sebbene alcuni studi dimostrino un'ottima efficacia rispetto al gruppo di controllo, con riduzione delle ospedalizzazioni fino all'87% [27], altri studi non trovano un'efficacia statisticamente significativa. Si è inoltre visto che l'utilizzo di Remdesivir in associazione ad un altro farmaco, Baricitinib, mostravano risultati maggiori rispetto al solo Remdesivir [28].

Oltre al Remdesivir, un altro farmaco di questa categoria è il Favipiravir, che uno studio ha dimostrato avere efficacia nel ridurre la durata di ricovero di pazienti con sintomatologia

lieve-moderata se associato alla standard supportive care, rispetto a quest'ultima da sola [29].

- Inibitori delle proteasi:

Di questa categoria fanno parte Lopinavir e Ritonavir, studiati in associazione dopo che è stata accertata la loro sicurezza; sono stati condotti più studi riguardo la loro efficacia, che hanno dato risultati negativi [30] [31]. Tuttavia, uno studio di fase 2 mostra che, se utilizzati in associazione a Ribavirina e IFN- β 1b, contribuiscono ad un miglioramento della sintomatologia e ad un accorciamento del tempo di ricovero ospedaliero [32].

- Inibitori delle trascrittasi inverse nucleotidiche e nucleosidiche:

Azvodine, un farmaco utilizzato nel trattamento dell'AIDS, ha avuto ottimi risultati in uno studio condotto in Cina, anche se tale studio riteneva che fosse necessario ripetere l'analisi con un pool più grande di pazienti per avere certezza del suo funzionamento [33].

Oltre ad esso, è stato studiato l'effetto di Molnupinavir in pazienti nei primi stadi dell'infezione, ed è stato riportato un significativo abbassamento del rischio di ospedalizzazione, tanto che anche la Food and Drugs Administration (FDA) ne ha autorizzato l'utilizzo in emergenza per trattare sintomatologia lieve-moderata da COVID-19.

- Inibitori dell'ingresso e dell'uncoating (scapsidamento):

Per "uncoating" si intende la serie di eventi successivi alla penetrazione virale nella cellula infettata che portano alla rimozione totale o parziale del capsido e alla conseguente esposizione del genoma virale.

Amantadina, un farmaco appartenente a questa categoria, inizialmente prodotto come antivirale ma che ha riscontrato efficacia anche nel trattamento del morbo di Parkinson, ha dato risultati promettenti in uno studio che tuttavia aveva arruolato un campione di pazienti troppo ridotto per poter essere significativo [34].

- -Altri antivirali:

Azitromicina, un antibiotico con un vasto range di proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e antivirali, ed Idrossiclorochina, un farmaco antimalarico utilizzato nel trattamento di diverse

condizioni reumatologiche, sono stati a lungo pubblicizzati come possibili rimedi per la patologia da SARS-CoV-2, ma diversi studi con migliaia di pazienti arruolati hanno dimostrato che né da soli né in associazione, questi due farmaci hanno efficacia nel trattare COVID-19. Altri studi suggerivano invece l'utilizzo di IFN- α nelle prime fasi della malattia come opzione terapeutica promettente [35].

Tra le terapie rivolte alla sintomatologia del paziente, le principali opzioni, oggetto di studio negli ultimi anni, sono:

- Somministrazione di plasma "iperimmune":

Si tratta di plasma prelevato da pazienti precedentemente infetti da SARS-CoV-2, che quindi contiene gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario del paziente verso il virus. Questa terapia presenta diverse criticità: la prima è legata alla risposta del ricevente al plasma del donatore, che potrebbe dare possibili reazioni avverse, la seconda è legata al fatto che solamente parte degli anticorpi presenti nel plasma del donatore sono effettivamente neutralizzanti nei confronti del virus; un ulteriore problema riguarda la logistica del rapporto tra disponibilità e richiesta. Sono stati effettuati comunque diversi studi su questa possibilità terapeutica, con risultati a volte contrastanti ma nel complesso non soddisfacenti [36] [37] [38] [39].

- Terapie con anticorpi monoclonali neutralizzanti:

Pensati per superare le criticità del plasma iperimmune, inizialmente si sono rivelati inefficaci a causa della continua comparsa di nuove varianti, per le quali non potevano essere utilizzati, avendo essi una affinità mono-valente. Tuttavia, con il sopravvento della variante Omicron che ora è quella prevalente nei nuovi contagi, l'anticorpo monoclonale Bebtelovimab, diventa un'opzione terapeutica percorribile, dal momento che ha già dimostrato la sua efficacia contro quella variante [40].

- Terapie con JAK-inibitori:

Janus Kinase (JAK) fa parte di una pathway cellulare coinvolta nella produzione di svariate citochine e chemochine pro-infiammatorie, ritrovate a livelli elevati in pazienti affetti da COVID-19. Per questo motivo, gli inibitori di questa pathway, già utilizzati per il trattamento di altre patologie come l'Artrite Reumatoide, la Mielofibrosi e la Policitemia Vera, sono stati

studiati per il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2. Tra i diversi farmaci studiati, Baricitinib è l'unico ad aver prodotto risultati sufficienti a garantire l'approvazione all'utilizzo dall'FDA, ma anche Tofacitinib, Ruxolitinib e Nezulcitinib mostrano risultati preliminari promettenti [26].

- Terapia steroidea:

Inizialmente venne scoraggiato l'utilizzo dei cortisonici in pazienti affetti da COVID-19, in quanto l'azione immunosoppressiva del farmaco poteva causare una diminuita risposta dell'organismo all'infezione in atto. Tuttavia, con la scoperta successiva del ruolo dello storm citochinico causato dalla risposta infiammatoria nella fisiopatologia dei danni causati dall'infezione virale, si è rivalutata la terapia steroidea come mezzo per arginare o prevenire tale evento, con discreto successo. Ad oggi, Desametasone, Budesonide, Ciclesonide e Metilprednisolone mostrano tutti effetti molto promettenti nel trattamento della sintomatologia severa di COVID-19 [26].

- Anticoagulanti e antiaggreganti:

Raccomandati come profilassi in tutti i pazienti ospedalizzati con COVID-19, a meno di controindicazioni assolute, in quanto la patologia causa un forte stato protrombotico nel paziente. Tuttavia, la prescrizione di questi farmaci non va effettuata acriticamente, ma va valutata caso per caso.

- Ossigenoterapia:

Terapia di supporto nei casi severi di patologia, in quanto la dispnea e l'ipossiemia sono sintomatologie prevalenti e possono portare fino all'Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), una condizione ad alta mortalità. Fornire quindi ossigenazione al paziente è fondamentale per prevenire l'aggravarsi del quadro clinico.

1.2 CIRROSI EPATICA

1.2.1 Generalità

La cirrosi epatica rappresenta il punto di arrivo finale comune di diverse patologie epatiche croniche; nonostante le diverse cause possibili, i meccanismi di danno epatico che portano allo sviluppo di cirrosi sono comuni a tutte e comprendono la degenerazione e la necrosi degli epatociti, con successiva fibrosi parenchimale e formazione di noduli rigenerativi che vanno a sostituire tali cellule necrotiche, ed una conseguente perdita di funzionalità epatica [41].

Dal punto di vista epidemiologico, la cirrosi ha riscontrato un aumento della prevalenza rispetto al XX secolo sia negli uomini che nelle donne; uno studio epidemiologico del 2017 stima la prevalenza tra lo 0.3% e lo 0.6% nella popolazione generale [42], ma si ritiene il dato possa essere sottostimato a causa della difficoltà diagnostica relativa alla fase compensata di malattia, che spesso è asintomatica. La mortalità ad un anno associata alla patologia cirrotica spazia dall'1% al 57%, in base alla presentazione o meno di complicanze o eventi che portano a scompenso. Il Global Burden of Disease (GBD) del 2019 relativo alla cirrosi evidenzia come in quell'anno le morti associate a cirrosi epatica siano aumentate del 8.1% rispetto al 2017 [43], dimostrando come essa sia una patologia ancora oggi molto rilevante e di difficile trattamento e gestione.

1.2.2 Eziologia

Come specificato precedentemente, le cause di cirrosi possono essere diverse, alcune più comuni altre invece più rare.

Tra le cause più comuni si riscontrano sicuramente l'alcolismo, la Steatosi Epatica Non Alcolica [NAFLD], e le infezioni croniche da HCV (più prevalente in occidente) e HBV (più prevalente nei paesi orientali).

Tra quelle più rare invece si riscontrano patologie autoimmuni e legate a colestasi (epatite cronica autoimmune, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante), quelle legate a disordini metabolici (emocromatosi, malattia di Wilson, deficit di α 1-antitripsina), cause iatrogene (farmaci epatotossici, lesione chirurgica delle vie biliari) e cause legate a patologie vascolari (Sindrome di Budd-Chiari). A tutti questi vanno sommati poi i casi di cirrosi idiopatica o criptogenetica [41].

1.2.3 Quadro clinico e complicanze [44]

Così come l'eziologia della cirrosi non va a determinare differenze rilevanti riguardo al quadro istologico di patologia cirrotica, anche a livello clinico il risultato è il medesimo. Il paziente cirrotico sarà infatti caratterizzato da livelli variabili di conservazione della funzionalità epatica. È fondamentale distinguere pazienti che mantengono stabile e compensata la loro funzionalità epatica e pazienti che invece perdono la capacità di compensare la perdita di parenchima epatico e iniziano a mostrare le prime complicanze, perché questi ultimi sono pazienti idonei ad essere inseriti nelle liste d'attesa per il trapianto epatico. La sintomatologia della cirrosi compensata è limitata, infatti una buona parte dei pazienti cirrotici sono inizialmente asintomatici; quando presenti, i sintomi associati alla fase compensata della patologia cirrotica sono molto aspecifici: si riscontrano infatti febbre, astenia, prurito, perdita di peso e dolore addominale.

La sintomatologia più grave inizia ad esordire con l'insorgere delle diverse complicanze della cirrosi epatica, molte delle quali fanno capo all'ipertensione portale. Essa è causata da un aumento delle resistenze al flusso ematico all'interno del parenchima epatico, a causa sia dell'aumento della componente fibrotica e all'effetto massa causato dai noduli rigenerativi, sia dalla contrazione delle cellule di Ito che vengono stimulate da vasocostrittori locali. L'ipertensione portale diventa clinicamente significativa quando il gradiente pressorio tra la vena porta e le vene sovraepatiche va a superare i 10-12mmHg.

Le principali conseguenze dell'ipertensione portale sono:

- Formazione di circoli collaterali, attraverso i quali il sangue arriva in vena cava senza passare per il fegato e senza dunque subire la sua funzione detossificante.
- Formazioni di varici esofagee e gastriche, che sono soggette a rottura e possono causare emorragie anche importanti dell'alto tratto gastrointestinale.
- Versamento ascitico, ovvero presenza di liquido in cavità addominale che viene riscontrato in più del 50% dei pazienti nel corso della malattia, e che può complicarsi con peritonite batterica spontanea o sindrome epatorenale.

- Encefalite epatica: il mancato passaggio del sangue attraverso il parenchima epatico, e quindi l'assenza della funzione detossificante normalmente svolta dal fegato, porta ad un accumulo di metaboliti tossici che superano la barriera ematoencefalica andando a causare disturbi neurologici, che si possono manifestare con confusione e disturbi del sonno.
- Splenomegalia: il sangue dalla milza ha più difficoltà a raggiungere il fegato tramite la vena splenica (che è una delle vene che danno origine alla vena porta).
- Trombosi portale, dovuta a stasi del sangue in vena porta.

Altre complicanze della cirrosi epatica sono la degenerazione in carcinoma epatocellulare, l'ipertensione polmonare, la maggior suscettibilità ad infezioni e la coagulopatia.

1.2.4 Diagnosi e valutazione del paziente cirrotico

Il sospetto di cirrosi epatica, data la natura asintomatica della fase compensata della patologia, sorge normalmente nelle fasi più avanzate di malattia, ovvero nel momento in cui iniziano a manifestarsi nel paziente le prime complicanze legate allo scompenso epatico.

La diagnosi di cirrosi è secondaria allo staging della fibrosi epatica, la quale viene classificata in 5 stadi da F0 (assenza di fibrosi) a F4 (cirrosi epatica) in uno score definito METAVIR Scoring System [Tab.1]. Per la definizione di questi stadi il Gold Standard diagnostico è la biopsia epatica; tuttavia si tratta di un esame particolarmente invasivo e costoso, per cui è diventato sempre più comune l'utilizzo di metodiche alternative meno invasive, sia di imaging che di analisi sierologiche. Questi ultimi, generalmente, sono più utili nell'identificare i due estremi del METAVIR Scoring System, ovvero lo stadio con fibrosi assente o minima (F0) e gli stadi di fibrosi avanzata (F3-F4), mentre sono meno accurati nel distinguere le forme precoci o intermedie di fibrosi epatica (F1, F2); l'accuratezza aumenta tuttavia associando ad essi tutti i dati clinici del paziente, generando una precisa probabilità pre-test della presenza di fibrosi [45]. Le metodologie non invasive adottate

Metavir Scoring System for the Assessment of Liver Fibrosis and Cirrhosis	
Level of fibrosis	Score
No fibrosis	F0
Minimal scarring	F1
Positive scarring with extension beyond area containing blood vessels	F2
Bridging fibrosis with connection to other areas of fibrosis	F3
Cirrhosis or advanced liver scarring	F4

Adapted with permission from Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, et al. Diagnosis and management of hepatitis C. Am Fam Physician. 2015;91(12):838.

Tab. 1

Fonte: Smith A, et al. Cirrhosis: Diagnosis and Management. Am Fam Physician. 2019

includono l'elastometria epatica, gli esami ematochimici, l'ecografia addominale, la TC o la RMN, che permettono di valutare la morfologia e le caratteristiche tipiche del fegato cirrotico.

Una volta diagnosticata la cirrosi epatica, gli step successivi comprendono la definizione della causa di malattia e la stratificazione del rischio di sviluppare complicanze. Per quest'ultimo punto, in clinica vengono attualmente utilizzati due score predittivi:

○ Child-Pugh score [Tab 2]:

Si tratta di uno score volto ad identificare lo stadio della patologia cirrotica. Inizialmente fu proposto da Charles G. Child e Jeremiah G. Turcotte nel 1964, poi venne modificato da Pugh et al nel 1973. Ad oggi, comprende al suo interno valori di alcuni test di funzionalità epatica, ovvero bilirubina, albumina e tempo di protrombina o INR (inserito da Pugh sostituendo lo stato nutrizionale del paziente [46]), e l'eventuale presenza o meno di ascite ed encefalopatia epatica.

Ad ognuno di questi parametri viene assegnato un punteggio che va da 1 a 3, con risultato finale un minimo di 5 punti ed un massimo di 15. Sulla base di questo punteggio finale i pazienti vengono divisi in tre classi:

- Child-Pugh A (5-6 punti): la funzione epatica è mantenuta
- Child-Pugh B (7-9 punti): lo scompenso è in fase iniziale, la funzione epatica è moderatamente compromessa
- Child-Pugh C (10-15 punti): la patologia cirrotica non è compensata, la funzione epatica è severamente compromessa. [47]

Chronic Liver Disease Assessment - Child-Pugh Score

Parameters	Score			
	1	2	3	
Albumin	> 35 g/L	28 – 35 g/L	< 28 g/L	
Ascites	Absent	Slight	Moderate	
Bilirubin	< 34.2 µmol/L	34.2 – 51.3 µmol/L	> 51.3 µmol/L	
Encephalopathy	None	Grade 1 – 2	Grade 3 – 4	
PT	Seconds over control	< 4	4 – 6	> 6
	INR	< 1.7	1.7 – 2.3	> 2.3

Tab. 2 Fonte: <https://pcpc.hku.hk/product/child-pugh-score-en/>

Sebbene venga usato quotidianamente nella pratica clinica, questo score non è esente da limitazioni; ad esempio l'encefalopatia epatica e l'ascite non sono parametri oggettivamente

quantificabili, per cui il punteggio relativo è a discrezione del clinico. Per limitare le criticità di questo score, gli viene affiancato il punteggio MELD.

- MELD Score:

Si tratta di uno score basato su un calcolo matematico che va ad includere i valori di bilirubinemia, creatininemia ed INR; permette di predire, con un buon grado di correttezza, la mortalità a 3 mesi nel paziente cirrotico. La formula dell'originale MELD Score è:

$$9.57 \times \log_e (\text{creatinine}) + 3.78 \times \log_e (\text{total bilirubin}) + 11.2 \times \log_e (\text{INR}) + 6.43$$

Negli anni, vista l'utilità di questo score anche nella gestione delle liste di attesa per trapianto di fegato, il MELD Score è stato aggiornato e modificato per includere la sodiemia (MELD-Na Score) in un contesto di sindrome epato-renale, e l'albuminemia (MELD-Albumine Score) per predire la mortalità generale, indipendentemente dalla causa, di pazienti con scompenso cardiaco acuto [48].

1.2.5 Deficit immunitario cirrosi-associato

Il fegato svolge due fondamentali ruoli nella difesa dell'organismo dai patogeni. Il primo è legato alla sua funzione detossificante che espleta grazie al sistema portale che drena il sangue intestinale e lo porta ad attraversare il parenchima epatico dove sono presenti le Antigen Presenting Cells (APCs) che fungono da prima barriera di difesa dai patogeni drenati dall'intestino. Il secondo è invece legato alla produzione da parte delle cellule epatiche di molte molecole fondamentali per la corretta funzionalità della risposta immunitaria sia innata che adattativa.

La perdita della funzionalità epatica nei pazienti cirrotici, assieme ad alcune delle complicanze della patologia, genera quella che viene definita Cirrhosis-Associated Immune Dysfunction (CAID), che comprende sia una condizione di immunodeficienza sia una condizione di infiammazione sistemica [49].

La condizione di immunodeficienza è dovuta ad una serie di fattori [50]:

- Deficit di espressione di CRlg nelle cellule di Kupffer. Le cellule di Kupffer presenti nel fegato normalmente esprimono il recettore CRlg, il quale lega direttamente i batteri Gram + oppure la componente C3b del complemento mediando, tramite essa, la fagocitosi.

- Deficit di produzione di proteine del complemento C3 e C4 dovuto a necrosi degli epatociti responsabili della loro sintesi.
- Deficit di neutrofili sequestrati a livello splenico a causa dell'ipertensione portale che impedisce il flusso sanguigno nella vena splenica causando ristagno di sangue all'interno della milza.
- Deficit linfocitari, sia della componente T che della componente B, sono stati frequentemente riscontrati in pazienti cirrotici. Questo deficit include i linfociti B della memoria CD27+, che sintetizzano meno immunoglobuline, e di conseguenza producono una inferiore risposta alle vaccinazioni ed una maggiore suscettibilità ad infezioni batteriche.

La condizione di infiammazione sistemica caratteristica della CAID è invece legata principalmente alla traslocazione di componenti batteriche dall'intestino al torrente circolatorio (secondaria a disbiosi intestinale), aumento della permeabilità intestinale con perdita della prima barriera contro i patogeni, sia introdotti con l'alimentazione che endogeni, e deficit della componente del sistema immunitario associata alla mucosa intestinale. A queste cause va a sommarsi il rischio non indifferente di peritonite batterica spontanea associato alla presenza di ascite, una delle complicanze più comuni che affligge i pazienti cirrotici [50].

1.2.6 Impatto della pandemia

Così come è stato per molte altre patologie, la pandemia ha avuto un effetto negativo indiretto sui pazienti cirrotici legato al forte impatto che ha avuto sul sistema sanitario. A causa dell'emergenza generata dalla diffusione del virus, infatti, le risorse a disposizione sono state fortemente ridistribuite a favore di servizi di trattamento per i pazienti affetti da COVID-19; conseguentemente, ne hanno sofferto i servizi di monitoraggio, diagnosi e trattamento di altre patologie, incluse quelle epatiche. Si è assistito infatti al rinvio, a volte addirittura all'annullamento, di appuntamenti per effettuare test diagnostici o di monitoraggio della malattia come ecografie, biopsie epatiche o elastometrie. Questo, assieme alla sospensione di programmi preventivi come lo screening per l'HCC, ha portato ad un peggioramento della condizione clinica dei pazienti, sia quelli già diagnosticati che non sono stati monitorati, sia quelli con nuovo riscontro di patologia che non hanno potuto godere dei servizi che solitamente garantiscono una diagnosi precoce e di conseguenza un trattamento più efficace.

1.2.7 COVID-19 e cirrosi

A causa del ruolo del fegato nella risposta immunitaria, e nello specifico dell'esistenza della CAID, sin dal principio della pandemia da SARS-CoV-2 è stata rivolta particolare attenzione ai pazienti con epatopatia cronica, e si è visto come essi, in particolare i pazienti affetti da cirrosi, avessero un rischio maggiore di sviluppare una forma più severa di COVID-19 [51]. Questo è verosimilmente associabile anche alla presenza in molti pazienti cirrotici di comorbidità che predispongono alla malattia severa come diabete, insufficienza renale e cardiaca.

Inoltre, si è visto che la severità della patologia cirrotica preesistente correla direttamente con un aumento della mortalità dovuta a COVID-19; tuttavia, superata la fase acuta della patologia, il tasso di mortalità dei pazienti ritorna in linea con gli altri pazienti cirrotici che non hanno presentato un'infezione di SARS-CoV-2. In questo senso, si è visto che il danno polmonare acuto causato da COVID-19 potenzialmente può scatenare l'Acute on Chronic Liver Failure (ACLF) [52].

1.3 EPATITE B

1.3.1 Generalità ed epidemiologia

L'epatite B è una patologia che rappresenta un grosso problema sanitario a livello globale, causata dal virus Hepatitis B Virus (HBV), un virus a DNA dotato di envelope e classificato all'interno della famiglia Hepadnaviridae. Questo virus venne scoperto gradualmente a partire dalla seconda metà degli anni '60, fin quando non venne visto per la prima volta al microscopio elettronico nel 1970 [53].

In quel momento vennero identificate tre particelle virali nel siero dei pazienti infettati [54]:

- Dane Particle (42nm di diametro)
Consiste nel virione integro, composto da uno strato fosfolipidico esterno che presenta antigeni di superficie (HBs), distinti in Large (L-HBs), Medium (M-HBs) e Small (S-HBs), che va a racchiudere il nucleocapside interno.
- Particelle sferiche (27nm di diametro)
Si tratta dei nucleocapsidi che normalmente formano i core dei virioni, ma si trovano in questo caso senza l'envelope esterno. Sono composti dalle core proteins del virus (HBc), dalla polimerasi virale e dal genoma virale.
- Strutture sferiche e filamentose (22nm di diametro)
Sono solitamente le più numerose ritrovate nel siero, si tratta di particelle sub-virali (SVPs) che non contengono il nucleocapside e sono dunque inerti; si ritiene possano essere materiale in eccesso dell'envelope virale.

Pur essendo un virus a DNA, la sua strategia replicativa è più simile a quella di un retrovirus; il suo corredo genomico, infatti, non viene sintetizzato a partire da uno stampo di DNA, ma sfrutta invece un RNA "pregenomico" da cui viene retro-trascritto un filamento di DNA negativo, dal quale poi viene ricostituito il genoma virale definitivo grazie alla DNA polimerasi DNA-dipendente [44].

La trasmissione del virus da persona a persona può seguire sia un pattern verticale che un pattern orizzontale [55]. Il pattern verticale consiste nella trasmissione del virus dalla madre al neonato durante il parto vaginale, attraverso il contatto del nascituro con i liquidi vaginali infetti della madre; questa modalità di trasmissione rappresenta la principale via di diffusione del virus nel mondo [56]. La trasmissione orizzontale, invece, comprende la trasmissione sessuale, la trasmissione attraverso tagli e graffi, l'utilizzo di droghe che prevede iniezioni con aghi non sterilizzati o tatuaggi e/o piercing

effettuati senza adeguata prevenzione, l'infezione nosocomiale qualora vengano meno le regole di una corretta prevenzione delle infezioni e la trasfusione di sangue infetto.

A livello epidemiologico si distinguono regioni mondiali ad alta prevalenza di infezioni croniche di HBV, nello specifico l'Africa subsahariana e l'estremo Oriente, con prevalenze che vanno dal 5% a più dell'8%, con picchi in alcuni stati di oltre 15%, e regioni a più bassa prevalenza. Tra queste si annoverano gli USA e l'Europa Occidentale, dove la prevalenza si attesta generalmente al di sotto del 2%. Negli anni si è assistito ad una riduzione generale della prevalenza della patologia grazie all'introduzione di programmi di vaccinazione, ma in alcune regioni dove l'accesso a tale servizio è carente (come l'Africa o l'Europa orientale) si è addirittura visto un aumento della prevalenza [57]. Alcuni studi stimano le morti dovute a patologie HBV-correlate essere oltre 1 milione all'anno a livello mondiale [58], dando l'idea della serietà e dell'attualità della patologia.

1.3.2 Clinica e Diagnosi

L'infezione da HBV non si presenta con la stessa storia clinica in tutti i pazienti. La prima distinzione va fatta tra la forma acuta e quella cronica della patologia epatica derivante da essa.

L'epatite acuta si definisce con il riscontro di antigeni virali (HBsAg e HBeAg) nel siero del paziente a seguito della manifestazione di ittero, con il riscontro di elevati livelli sanguigni di transaminasi epatiche, oppure con la manifestazione della sintomatologia associabile a malattia epatica (ad esempio nausea, diarrea, dolore addominale, vomito, cefalea) [59].

In genere l'epatite acuta si manifesta dopo un periodo di incubazione del virus di circa 1-4 mesi, e riguarda circa il 30% degli adulti infettati, il 10% dei bambini sotto i 5 anni e raramente i neonati. Esiste inoltre una forma fulminante di epatite B acuta ad alta mortalità che colpisce circa l'1% degli adulti infetti e descritta solo in pochissimi casi nella popolazione pediatrica [60].

La forma cronica di epatite B, invece, si definisce con la persistenza nel siero degli antigeni virali (HBsAg nello specifico) dell'HBV per più di sei mesi. È caratterizzata da 4 fasi:

- Fase immuno-tollerante:

Caratterizzata da forte replicazione virale, positività agli antigeni nel siero e livelli di transaminasi epatiche sieriche normali o minimamente elevati. Può durare da 20 a 30 anni

nei pazienti infettati alla nascita, mentre nei pazienti infettati per via orizzontale è molto breve o addirittura assente.

- Fase di clearance immunitaria:

Caratterizzata da una riduzione dei livelli sierici di HBV DNA e da un incremento dell'infiammazione epatica. Durante questa fase, che può durare anni, si ha fluttuazione dell'intensità della patologia e danno epatico progressivo.

- Fase inattiva:

Coincide con la sieroconversione da positività ad HbsAg/HBeAg/HBcAg a positività per anticorpi diretti contro quegli antigeni e assenza degli antigeni stessi. A questo solitamente corrispondono una diminuzione progressiva di HBV DNA sierico (indice di replicazione virale) ed una contemporanea diminuzione delle transaminasi sieriche e quindi dell'infiammazione epatica. Il cut-off di HBV DNA sierico, generalmente associato a regressione sia istologica che biochimica dell'infiammazione epatica, è di <2000 UI/ml.

- Fase di riattivazione:

Solitamente associata ad una forte immunodeficienza del paziente, che può essere dovuta sia a cause naturali come l'infezione da HIV, sia a terapie per altre patologie come la chemioterapia o il trapianto di midollo osseo.

La sintomatologia associata ad epatite B cronica è parecchio varia, dalla asintomaticità all'insufficienza epatica terminale. Il sintomo preponderante è l'astenia, associata ad ittero persistente o fluttuante. Sono comuni inoltre sintomatologie extra-epatiche legate alla precipitazione di immunocomplessi HBsAg-Ab, più comunemente artralgie e artriti, mentre più raramente si hanno manifestazioni cutanee, vasculiti generalizzate (poliarterite nodosa) o glomerulonefriti da immunocomplessi. Se la sintomatologia appare a causa della riattivazione dell'infezione in pazienti con uno stato cirrotico ben compensato, è molto probabile lo scompenso epatico e la presentazione di sintomatologia associata a cirrosi scompensata.

1.3.3 Trattamento

Per quanto riguarda la forma acuta di epatite B, nella maggior parte dei casi si tratta di una patologia auto-limitante che il sistema immunitario del paziente riesce a guarire da solo, e che quindi non necessita di terapia antivirale ma solamente di una terapia di sostegno per il management della sintomatologia. Tuttavia, nelle forme severe di epatite acuta e in quelle protratte nel tempo, che quindi indicano una difficoltà del sistema immunitario del paziente nel far fronte all'infezione, è indicata la somministrazione di farmaci antivirali.

Per la fase cronica, invece, la terapia antivirale è necessaria per una risoluzione rapida della fase di clearance e di conseguenza una diminuzione del danno epatico progressivo associato ad essa. Ad oggi sono approvati 7 diversi farmaci per il trattamento dell'epatite B, di cui: 5 analoghi nucleotidici/nucleosidici, interferone standard e interferone pegilato. [61]

L'obiettivo del trattamento è quello di ottenere la sieroconversione del paziente, con l'eliminazione degli antigeni virali sierici e dell'HBV DNA ed il riscontro di anticorpi diretti contro gli antigeni. Ad oggi, tuttavia, non esistono terapie in grado di eradicare completamente il virus, quindi la riattivazione dell'infezione è sempre una possibilità.

1.3.4 Epatite B e vaccinazioni [62]

I primi vaccini contro l'epatite B, disponibili in commercio dal 1982, erano vaccini derivati dal plasma. Il microbiologo americano Maurice Hilleman produsse questi vaccini raccogliendo particelle subvirali di HBsAg (particelle di 22 nm) dal plasma di donatori asintomatici con infezione cronica da HBV. Tali vaccini andarono incontro a diverse problematiche nel tentativo di raggiungere una vasta distribuzione, tra cui i costi di produzione elevati e la mancanza di piani vaccinali in molte nazioni, ma la difficoltà maggiore che affrontarono fu la paura che nacque nelle popolazioni coinvolte riguardo la loro sicurezza da infezioni trasmissibili attraverso il sangue, nello specifico l'infezione da HIV che iniziava ad assumere una forte popolarità in quegli anni. Nonostante tali vaccini avessero superato un gran numero di test di sicurezza, la spinta per cercare metodologie diverse di produzione dei vaccini si fece molto forte e già nel 1986 venne sintetizzato il primo vaccino di seconda generazione, attraverso metodologie di ingegneria genetica, che di lì a poco avrebbe completamente sostituito quello plasma-derivato.

Questa nuova generazione di vaccini sfrutta un lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) modificato geneticamente per produrre la proteina S del virus HBV, quindi presentando l'HbsAg al sistema immunitario e permettendo la formazione di anticorpi anti-HBs per la protezione dal virus.

I vaccini di seconda generazione sono molto immunogenici: è stata dimostrata una induzione di livelli di sieroprotezione superiori al 95% in bambini e giovani adulti sani, anche se questa poi scendeva parzialmente oltre i 40 anni per arrivare intorno al 60-70% negli over-60. Per far fronte a questa criticità è possibile utilizzare dei vaccini di nuova generazione, derivati da cellule mammifere invece che da lieviti, che hanno la capacità di esprimere anche antigeni pre-S1 e pre-S2 e quindi di garantire maggior immunogenicità, ma purtroppo, a causa dei costi elevati, non possono ancora essere inseriti nei programmi di vaccinazione della popolazione generale.

Grazie all'abbattimento dei costi della produzione dei vaccini anti-HBV di seconda generazione, all'implementazione di piani per la vaccinazione della popolazione generale in 190 nazioni, ed al supporto di associazioni come la Global Alliance for Vaccination and Immunization (GAVI), che aiuta nella distribuzione di vaccini nelle zone più povere del mondo, si è raggiunta nel 2022 la copertura, con 3 dosi vaccinali, dell'84% della popolazione mondiale. [63]

1.4 EPATITE C

1.4.1 Generalità ed epidemiologia

L'epatite C è una patologia causata dal Hepatitis C Virus (HCV), un virus a singolo filamento RNA con envelope, inserito all'interno della famiglia Flaviviridae. Il genoma a RNA è costituito da una singola open reading frame (ORF) codificante per una poliproteina, affiancata sia al 5' che al 3' da delle untranslated regions (UTR). La UTR posta al 5' costituisce il sito di entrata nel ribosoma, dove ha poi luogo la traduzione e la sintesi della poliproteina. [64]

La poliproteina viene successivamente scissa in tre proteine strutturali del core (C) e dell'envelope (E1, E2), e in sette proteine non strutturali che vanno a costituire il complesso di replicazione virale e di uscita del virione dalla cellula infetta. La proteina E2 è caratterizzata da tre regioni ad elevata variabilità che permettono al virus, assieme al fatto che la RNA-polimerasi virale manca di un sistema di proofreading, di modificare spesso la propria sequenza e struttura e quindi evadere il sistema immunitario; il virione infatti, per infettare le cellule, interagisce con i loro recettori proprio attraverso E2.

Oltre alla variabilità genetica di E2 che garantisce la presentazione di epitopi sempre diversi al sistema immunitario che non li riconosce, impedendo così un'efficace risposta, l'HCV ha sviluppato anche altre metodologie di evasione del sistema immunitario: va infatti ad interferire a diversi livelli con l'azione antivirale dell'interferone [65].

I dati più recenti parlano di una prevalenza mondiale intorno all'1% di persone sieropositive per HCV, con un totale di circa 70 milioni di persone infette ed un'incidenza stimata di 1.75 milioni nel 2015 [66]. Si stima che approssimativamente il 75-80% delle persone con infezione acuta da HCV sviluppi poi una forma cronica di epatite C, il 60-70% sviluppi steatosi e/o fibrosi epatica, il 5-20% sviluppi cirrosi epatica e circa il 5% possa poi andare incontro a complicanze potenzialmente mortali come HCC (Hepatocellular Carcinoma) [67]. Si capisce quindi come questo virus crei delle complicanze molto rilevanti per i sistemi sanitari mondiali.

La principale modalità di trasmissione dell'HCV è l'esposizione a sangue infetto. Questo fino agli anni '90 del XX secolo comportò che la principale fonte di diffusione del virus erano le trasfusioni sanguigne, in quanto l'agente patogeno infettivo non era stato identificato e ancora non era in atto uno screening della popolazione donatrice di sangue. Negli anni '80 la situazione migliorò con la scoperta dell'HBV e dell'HIV e con lo screening per questi altri due virus, che permise contestualmente di diminuire anche la trasmissione dell'HCV in quanto la popolazione a rischio era

sovrapponibile. Da quando si introdusse lo screening per l'HCV nel sangue dei donatori, questa modalità di trasmissione ha perso rilevanza, ed oggi ha lasciato il posto all'utilizzo di siringhe non sterilizzate per l'iniezione di stupefacenti endovena. La trasmissione sessuale, è stato dimostrato non essere particolarmente efficace per l'HCV, ma rimane comunque rilevante per individui già a rischio per altre patologie sessualmente trasmissibili o per portatori di HIV [44].

1.4.2 Clinica

L'infezione da HCV porta inizialmente ad una forma acuta di epatite, che può essere o meno seguita da una forma cronica.

L'epatite C acuta è caratterizzata tipicamente da ittero, nausea, dolore addominale e sindrome simil-influenzale, con risoluzione spontanea in circa 15-25% dei pazienti.

Fino all'85% delle forme acute di epatite C vanno incontro a transizione ad epatite C cronica, definita come la persistenza di HCV RNA nel sangue per più di 6 mesi dalla manifestazione clinica dell'epatite acuta. Una volta compiuto il passaggio ad epatite C cronica, la risoluzione spontanea è quasi impossibile, e se non trattata, può portare a fibrosi epatica ed a cirrosi fino, nei casi peggiori, allo sviluppo di epatocarcinoma [68].

La sintomatologia associata all'infezione cronica da HCV è simile a quella delle altre epatiti croniche, con l'astenia come sintomo principale e ittero relativamente raro. Rispetto ad altre epatiti croniche sono più rari i coinvolgimenti extra-epatici immunomediati, ad eccezione della crioglobulinemia mista, tipica dell'epatite C cronica, che porta a vasculite cutanea e glomerulonefrite membranoproliferativa [44].

1.4.3 Diagnosi [69]

In pazienti con fattori di rischio per infezione HCV in anamnesi è consigliato lo screening con test di rilevazione di anticorpi anti-HCV, caratterizzati da sensibilità del 95% e specificità del 99%. In caso di riscontro positivo a questo test di screening o in caso di sospetta infezione HCV in paziente con manifestazioni cliniche di sofferenza epatica e fattori di rischio anamnestici, il gold standard per la diagnosi di infezione in atto da HCV è la ricerca nel sangue del paziente di HCV RNA. La positività a questo test certifica l'infezione e indirizza il paziente a due ulteriori accertamenti: il primo è la determinazione del genotipo dell'HCV nel sangue del paziente, importante per la determinazione del corretto iter terapeutico da seguire, il secondo è la determinazione dello score METAVIR per

quantificare il danno epatico generato fino al momento della diagnosi e per contestualmente fornire dati riguardo la tempistica di intervento terapeutico. Se il danno epatico non è presente è possibile, secondo alcune linee guida, aspettare 4-6 mesi prima di iniziare una terapia antivirale per valutare se la forma acuta di epatite va incontro a risoluzione spontanea oppure no.

1.4.4 Trattamento

Il trattamento dell'infezione da HCV ha come scopo l'ottenimento di quella che viene chiamata "risposta virologica sostenuta" (SVR), che si definisce come il riscontro di HCV RNA non rilevabile nel siero del paziente a 12 o 24 settimane dall'inizio della terapia, basato su uno strumento di rilevazione che abbia un limite inferiore di rilevamento <15 UI/ml [70].

Le prime opzioni terapeutiche per il trattamento delle infezioni da HCV vennero approvate nel 1997 con il farmaco Infergen (Interferone alfacon-1), poi ritirato dal commercio nel 2013 a causa di effetti collaterali troppo importanti; in seguito vennero affiancati ad esso la ribavirina nel 1998, l'interferone pegilato 2 β nel 2001 e l'interferone pegilato 2 α nel 2002.

La svolta nella storia della terapia dell'epatite C si ebbe tra il 2011 ed il 2016, con la scoperta dei Direct Acting Antivirals (DAAs), farmaci antivirali specifici per le componenti del virus HCV sintetizzati a seguito dell'identificazione di tutte le proteine generate dalla scissione dell'originale poliproteina codificata dal genoma virale. Inizialmente i DAA erano genotipo-specifici, poi con lo sviluppo di Sofosbuvir, un inibitore specifico della polimerasi virale NS5B, si ottennero ben presto regimi terapeutici che portavano ad una SVR in oltre il 95% dei casi indipendentemente dal genotipo virale. Ad oggi, i principali farmaci approvati per il trattamento dell'infezione HCV sono [71]:

- Sofosbuvir/Velpatasvir (Epclusa)

Si tratta di una terapia pan-genotipica, che offre risultati ottimi, e che dura per tutti i pazienti 12 settimane.

- Glecaprevir/Pibrentasvir (Maviret)

Anche questa è una terapia pan-genotipica, ma la durata del trattamento varia:

- Per i pazienti al primo ciclo di trattamento (naive), non cirrotici o compensati, 8 settimane
- Per i pazienti non al primo ciclo di trattamento (experienced), 12 settimane.
- Per pazienti infetti con HCV di genotipo 3 naive con cirrosi compensata 8-12 settimane
- Per pazienti infetti con HCV di genotipo 3 experienced con cirrosi, 16 settimane

- Grazoprevir/Elbasvir (Zepatier)

Questa terapia è invece specifica per pazienti infetti con HCV genotipo 1.

- Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir

Utilizzata come regime terapeutico per pazienti nei quali precedenti trattamenti con DAA hanno fallito.

Questi regimi terapeutici, che garantiscono risultati ottimi in quasi il 100% dei pazienti, mettono quasi in secondo piano la necessità di determinare il genotipo di HCV che ha infettato il paziente dopo la diagnosi; tuttavia, rimane comune pratica clinica per accelerare i tempi, nell'eventualità che il trattamento pan-genotipico fallisca, e quindi si renda necessario un iter terapeutico diverso.

1.4.5 Epatite C e vaccinazioni

Ad oggi non è disponibile un vaccino per il virus HCV, nonostante la ricerca sul suo possibile sviluppo sia in atto praticamente dal momento della sua scoperta.

Sebbene l'obiettivo più desiderabile sia lo sviluppo di un vaccino che fornisca un'immunizzazione completa, che prevenga totalmente lo sviluppo della patologia epatica successiva ad inoculazione virale, le caratteristiche del virus lo rendono virtualmente impossibile. Sia la altissima variabilità genetica dovuta al meccanismo di replicazione virale, sia i diversi sistemi di evasione della risposta immunitaria che il virus mette in atto all'interno dell'organismo, sono ostacoli difficilissimi da superare durante lo sviluppo di vaccini di questo tipo.

Nonostante questo, diversi studi hanno fornito dati che suggeriscono l'efficacia teorica di un vaccino che protegga non dall'infezione, ma dalla cronicizzazione della malattia epatica: si è infatti visto che, mentre la prima infezione di HCV ha un tasso di guarigione completa del 15-20% con il restante dei pazienti che sviluppa la forma cronica di patologia, le re-infezioni con HCV in pazienti già guariti da una prima forma acuta hanno un tasso di guarigione che si attesta all'80% [72].

Prevenire la conversione verso la forma cronica dell'epatite C è comunque un obiettivo importante da perseguire, poiché il danno epatico ed il conseguente tasso di mortalità sono associati ad essa, non alla fase acuta dell'epatite C; se quindi lo sviluppo di un vaccino che previene l'insorgenza della patologia sembra ad oggi un'eventualità altamente improbabile, rimane accesa la speranza nello

sviluppo di un vaccino protettivo contro la cronicizzazione della patologia, che andrebbe ad abbassare molto sensibilmente la mortalità associata ad HCV.

1.5 STEATOSI EPATICA

1.5.1 Generalità ed epidemiologia

La steatosi epatica non è una vera e propria patologia; si tratta infatti di una lesione patologica, definita dalla presenza di vescicole di diverse dimensioni contenenti grassi (principalmente trigliceridi) all'interno del parenchima epatico [73].

Non essendo classificabile come patologia, è difficile quantificare la sua diffusione nella popolazione generale, anche in relazione al fatto che può essere associata a molte diverse eziologie. Uno studio ne stima la prevalenza mondiale tra il 6% ed il 35%, con una mediana del 20% [74].

1.5.2 Eziopatogenesi

La comparsa di steatosi epatica è dovuta ad uno squilibrio del metabolismo epatico degli acidi grassi; da una parte ci sono i processi di sintesi di queste molecole e il loro reclutamento dalle riserve lipidiche del corpo, dall'altra parte invece ci sono il loro catabolismo o la loro espulsione tramite lipoproteine. Lo squilibrio tra le due parti a favore della prima, sia esso per aumento di sintesi/reclutamento oppure per diminuzione di catabolismo/espulsione, porta all'accumulo intraepatico di trigliceridi e alla formazione delle vescicole di grasso [44].

Le cause che possono portare a steatosi epatica sono molteplici, ma una prima categorizzazione può essere fatta in relazione al ruolo dell'alcol: si parla infatti di *alcoholic liver disease* che ha nella steatosi epatica la sua più precoce manifestazione, e di *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) che racchiude al suo interno tutte le cause di steatosi epatica che non coincidono con tossicità da alcol (esclusa HCV per convenzione). Sebbene i meccanismi molecolari precisi di sviluppo di NAFLD siano ad oggi poco chiari, l'obesità e l'insulino-resistenza sono riconosciuti come i due principali fattori di rischio per lo sviluppo di steatosi. L'obesità contribuisce sia stimolando la sintesi epatica di trigliceridi alterando il microbiota intestinale per aumentare l'assorbimento di energia da fonti alimentari e la permeabilità intestinale, sia tramite la sintesi eccessiva di adipochine che inibisce la sensibilità

all'insulina [44]. L'insulina, dal suo canto, oltre ad essere un ormone ipoglicemizzante, è anche promotrice di assorbimento di acidi grassi e di sintesi e stoccaggio di trigliceridi; con l'insulino-resistenza si ha un aumento della sua sintesi e quindi un aumento di questa sua funzione, con conseguente squilibrio del metabolismo epatico degli acidi grassi che porta a steatosi.

1.5.3 Clinica

La maggior parte dei pazienti che presentano steatosi epatica sono asintomatici. Alcuni possono però lamentare affaticamento, fastidio al quadrante superiore destro, epatomegalia, acanthosis nigricans e lipomatosi [75].

Riferendosi alla porzione di pazienti con steatosi dovuta a NAFLD, sono state riconosciute negli anni diverse associazioni con altre patologie, tra cui le principali sono obesità, diabete, ipertensione, ipertrigliceridemia e malattie cardiovascolari. Altre associazioni meno frequenti includono stanchezza cronica, alterazioni dell'umore, apnea ostruttiva del sonno, disfunzione tiroidea e sindrome del dolore cronico.

1.5.4 Diagnosi

Il sospetto di steatosi epatica può sorgere in diversi contesti: pazienti con diagnosi di infezione da virus epatici, pazienti con sintomatologia caratteristica, pazienti con anamnesi positiva per alcolismo o pazienti con riscontro accidentale di alterazioni di parametri laboratoristici.

Tra i primi, quelli più a rischio di sviluppare steatosi epatica sono i pazienti infetti da HCV, il quale è stato dimostrato vada ad interferire con l'espulsione di trigliceridi tramite lipoproteine da parte del fegato.

All'esame obiettivo è difficile riconoscere segni di steatosi epatica; un segno riconoscibile è l'epatomegalia data dall'accumulo di grassi nel parenchima epatico, anche se è comunque un segno molto aspecifico, mentre altri segni come l'acantosi nigricans o la lipomatosi sono molto rari.

Per quanto riguarda le indagini sierologiche, la steatosi epatica è associata ad un aumento lieve o moderato dei valori delle aminotransferasi epatiche (più frequentemente ALT di AST), così come della gamma-glutamyl-transferasi (GGT). Altri valori ematochimici che possono risultare alterati sono dovuti alla disfunzione epatica provocata dalla progressione della lesione, e includono riduzione dei fattori di coagulazione (con conseguente allungamento del tempo di protrombina) e iperbilirubinemia.

Il Gold Standard per la diagnosi di steatosi epatica è l'analisi istologica su preparato bioptico del fegato. Questo esame tuttavia presenta delle problematiche legate all'invasività del prelievo bioptico ed ai costi, quindi si tende sempre più spesso a sfruttare indagini radiologiche, che sono meno invasive, per fare diagnosi di steatosi, nonostante la biopsia rimanga indicata in pazienti dove rimane incertezza diagnostica dopo i test di imaging [76].

Le indagini più comuni per confermare riscontro di steatosi epatica sono [75]:

- **Ecografia addominale:**
la presenza di depositi di grasso nel fegato causa il riscontro di struttura epatica iperecogena; questo test ha una sensibilità dell'89% e una specificità del 93%.

- **Elastografia epatica:**
si tratta di una tecnica di imaging che sfrutta un particolare tipo di ecografo per andare a valutare l'elasticità del tessuto epatico. Permette, in base a determinati parametri, di diagnosticare e di stadare sia la steatosi epatica che la fibrosi epatica.

- **TC, RMN, RM Spettroscopia**
Si tratta di esami di secondo livello, che danno un'immagine più definita del fegato, ma che presentano comunque delle criticità. La TC ha un'ottima specificità (100%) ma una bassa sensibilità (33%), viene quindi più utilizzata per escludere una lesione epatica piuttosto che per diagnosticarla.

1.5.5 Trattamento

Ad oggi non esiste una terapia farmacologica approvata per la steatosi epatica, quindi i possibili interventi che possono essere effettuati per trattare questa lesione mirano ai fattori di rischio associati ad essa:

- **Dieta ed esercizio fisico**
Principalmente volti a trattare l'obesità che spesso è associata a steatosi epatica e rimuovere così uno dei fattori di rischio, si rivela spesso efficace nel ridurre il livello di steatosi nei pazienti che riescono ad aderire ai regimi prescritti anche se attualmente rappresenta una percentuale molto bassa del totale dei pazienti.

- Modifiche dello stile di vita

Si fa principalmente riferimento alla terminazione di abitudini di alcolismo o tabagismo: si cerca quindi di rimuovere la principale fonte di tossicità epatica che causa il danno da cui poi nasce lo stato di steatosi.

- Trapianto di fegato

Da considerare esclusivamente per i pazienti con una progressione di malattia allo stadio terminale. Non rimuove i fattori di rischio che possono esistere nel paziente e quindi possono portare ad una recidiva di steatosi anche nel nuovo organo, motivo per cui assieme alla terapia post-trapianto vanno sicuramente trattati anch'essi.

Nonostante obesità e diabete mellito di tipo II (insulino-resistenza) siano i principali fattori di rischio per steatosi epatica, la chirurgia bariatrica e le terapie antidiabetiche non sono efficaci per la risoluzione del problema e questo è sottolineato dal fatto che ad oggi i dati relativi ad entrambe sono scarsi e/o inconcludenti, per cui nessuna delle due ha indicazione in pazienti affetti da steatosi epatica.

Capitolo 2: SCOPO DELLO STUDIO

All'inizio della campagna vaccinale per COVID-19 i dati sulla risposta immunitaria da parte dei pazienti affetti da patologia epatica cronica erano pochi.

Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di valutare questa risposta immunitaria ai nuovi vaccini per il virus SARS CoV2; tale analisi ha incluso sia l'aspetto sierologico che immunologico dei pazienti vaccinati ed il livello di immunizzazione dei pazienti dopo due dosi vaccinali.

Per la coorte reclutata dall'UOC Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova, è stato anche analizzato il tasso di protezione dall'infezione dopo la vaccinazione e l'eventuale impatto della vaccinazione sulla storia naturale dell'epatopatia cronica sottostante.

Capitolo 3: MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio multicentrico, prospettico ed osservazionale che mira a valutare la risposta immunitaria, l'efficacia clinica e l'impatto sul paziente con epatopatia cronica, dei vaccini anti-SARS-CoV-2.

I vaccini studiati all'interno di questo studio sono: Pfizer/BioNTech BNT162b2, Moderna mRNA-1723 e AstraZeneca/University of Oxford ChAdOx-nCoV-19.

Per la parte di analisi sierologica delle risposte ai vaccini è stata reclutata una popolazione di controllo non affetta da epatopatia cronica.

3.2 Contesto

Il promotore principale della fase multicentrica di questo studio è il Research Institute for Medicines, Faculty of Pharmacy dell'Università di Lisbona, in Portogallo.

Sono stati arruolati pazienti provenienti da dieci diversi centri in Europa, divisi in 6 Paesi (Portogallo, Spagna, Belgio, Romania, Austria, Italia), tra i quali il complesso Azienda Ospedaliera-Università di Padova, nel tentativo di ampliare il più possibile la coorte di pazienti reclutati in modo da ottenere risultati riproducibili.

Per quanto riguarda il centro di Padova, lo studio è stato svolto presso l'Ambulatorio Epatiti dell'UOC di Gastroenterologia dove i pazienti sono seguiti periodicamente per la valutazione dell'efficacia della terapia e per il successivo follow-up al termine di essa.

3.3 Selezione dei pazienti

Per lo studio multicentrico i pazienti sono stati arruolati nei diversi centri coinvolti nello studio, e successivamente inseriti in forma anonima all'interno di un registro chiamato HEPCOVIVac, secondo precisi criteri di inclusione ed esclusione.

- I criteri di inclusione sono:
 - Pazienti affetti da epatopatia cronica di qualunque eziologia, definita attraverso evidenze cliniche, radiologiche o istologiche;
 - Pazienti con età maggiore di 18 anni;
 - Pazienti che ancora non avevano ricevuto alcuna dose di vaccino anti-SARS-CoV-2;

- Pazienti eleggibili per i vaccini Pfizer/BioNTech BNT162b2, Moderna mRNA-1723 e AstraZeneca/University of Oxford ChAdOx-nCoV-19.
- I criteri di esclusione sono:
 - Gravidanza
 - Pazienti con pregresso trapianto di fegato.

I pazienti appartenenti al gruppo di controllo, invece, sono stati arruolati nell'area di Lisbona, ed i criteri di inclusione erano la maggiore età (≥ 18 anni) e l'assenza di epatopatia cronica.

Per il follow-up condotto a Padova è stata usata la popolazione già selezionata per lo studio multicentrico, dunque i criteri di inclusione ed esclusione sono rimasti i medesimi.

3.4 Raccolta dei dati

Per la fase di studio multicentrico, i prelievi di sangue venoso e i dati clinici dei pazienti aderenti allo studio sono stati raccolti tra Febbraio 2021 e Febbraio 2022.

Il protocollo prevedeva la raccolta di dati clinici ed il prelievo in quattro diversi momenti:

- T0 baseline: prima della prima dose di vaccino
- T1 (facoltativa): 2 settimane dopo la somministrazione della prima dose di vaccino
- T2: 2 settimane dopo il completamento dell'iniziale programma vaccinale (due dosi o una singola dose se paziente precedentemente infetto)
- T3: 6 mesi dopo il completamento della vaccinazione.

Successivamente al prelievo sanguigno, il sangue è stato subito processato tramite centrifugazione per l'isolamento della componente plasmatica, la quale è stata poi congelata a -80°C .

I campioni prelevati dai pazienti sono poi stati analizzati per ricercare anticorpi (IgG, IgM e % di anticorpi neutralizzanti) verso i diversi antigeni di SARS-CoV-2: la proteina spike S1 del SARS-CoV-2 di riferimento (Wuhan-Hu-1), il RBD della proteina spike della variante SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) ed il RBD della proteina spike della variante SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron).

Per la ricerca di IgG ed IgM ci si è serviti della tecnologia ELISA mentre per la misurazione della % di anticorpi neutralizzanti è stato fatto uso della tecnologia AlphaLISA.

Al momento dell'arruolamento dei pazienti sono stati anche compilati dei report clinici che includevano informazioni generali del paziente (età, sesso), eziologia della patologia epatica e sua severità, fattori di rischio e comorbidità associate, parametri clinici ed eventuale terapia in corso, pregressa infezione da SARS-CoV-2 (sintomatologia, data di inizio sintomi, data di risoluzione degli stessi) e dettagli sulla vaccinazione (tipo di vaccino effettuato, data di somministrazione, eventuali effetti collaterali registrati).

Inoltre, in corrispondenza di ogni prelievo, è stato chiesto ai pazienti se avevano contratto l'infezione da SARS-CoV-2 (diagnosticata con test molecolare) ed in caso positivo quali sintomi fossero stati associati all'infezione e se fosse stata necessaria ospedalizzazione con o senza supporto di ossigeno. Tutti i campioni sono stati comunque testati per la ricerca di anticorpi verso la proteina del nucleocapside di SARS-CoV-2 per ricercare eventuali infezioni non segnalate e confermare quelle segnalate. I pazienti che hanno subito l'infezione prima del T2 (n = 75, dove n sta per numero di pazienti) sono stati analizzati per ricercare associazioni tra caratteristiche demografiche o cliniche, mentre i pazienti che hanno subito l'infezione tra T2 e T3 (n = 29) sono stati raggruppati ed utilizzati per misurare l'efficacia clinica della vaccinazione.

Tali dati sono poi stati inseriti in forma anonima nel registro HEPCOVIVac.

Successivamente, per la coorte di Padova, sono stati raccolti a settembre 2023, tramite consultazione del sistema Galileo (un sistema informatico utilizzato dall'Azienda Ospedaliera di Padova per la gestione delle cartelle cliniche dei pazienti), dati di follow-up riguardanti la storia naturale dell'epatopatia cronica dei pazienti nel periodo immediatamente successivo al completamento del percorso vaccinale; nello stesso periodo, i pazienti sono stati contattati telefonicamente per raccogliere informazioni su eventuali infezioni da COVID-19 contratte successivamente alla vaccinazione.

3.5 Aspetti etici

Il protocollo di studio ed il modulo di consenso informato per i pazienti arruolabili sono stati approvati dal Comitato Etico della Faculty of Pharmacy dell'Università di Lisbona e del Lisbon Academic Medical Center, i centri coordinatori dello studio; inoltre, tutti i centri coinvolti nello studio hanno ricevuto approvazione dalla rispettiva commissione etica, prima dell'avviamento dello studio.

Tutti i pazienti sono stati informati verbalmente e tramite documento scritto riguardo le modalità di svolgimento e le finalità dello studio, ed è stato spiegato loro che la loro partecipazione è strettamente volontaria, libera e consapevole e che il consenso avrebbe potuto essere ritirato in qualsiasi momento per qualunque ragione o anche per nessuna ragione.

Ad ogni paziente è stato garantito che la partecipazione o meno allo studio non avrebbe in alcun modo influito sulle cure ricevute per la patologia da cui era affetto.

I dati personali dei pazienti sono stati raccolti ed elaborati in modo da garantire la riservatezza e la conformità alle leggi e ai regolamenti sulla protezione dei dati personali.

I pazienti appartenenti al gruppo di controllo sono stati altresì informati verbalmente e tramite documento scritto, approvato dal Comitato Etico della Faculty of Pharmacy dell'Università di Lisbona, sulle modalità di svolgimento e le finalità dello studio.

Capitolo 4: ANALISI STATISTICA

Per la fase di analisi della risposta immunologica alle vaccinazioni, le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti arruolati sono state analizzate e categorizzate tramite analisi statistiche descrittive, non inferenziali.

Le variabili continue sono state sintetizzate nella loro mediana e scarto interquartile (IQR – Interquartile Range), mentre quelle discrete sono state descritte come numero di pazienti (n) e probabilità percentuale. Tutte le variabili continue sono state sottoposte al test di Shapiro-Wilk per valutare la normalità della loro distribuzione.

Per il confronto tra due gruppi, i test t di Student e di Mann Whitney sono stati utilizzati rispettivamente per analizzare dati parametrici e non parametrici. Per lo stesso tipo di confronto ma tra più gruppi, dati parametrici e non parametrici sono stati rispettivamente analizzati tramite test di ANOVA e test di Kruskal-Wallis, con successive ulteriori analisi tramite test post-hoc di Bonferroni e di Dunn, rispettivamente.

Per l'analisi di campioni appaiati è stato utilizzato il test di Wilcoxon per il confronto tra due gruppi, mentre è stato utilizzato il test di Friedman, seguito dal test post-hoc di Dunn, per il confronto tra più gruppi.

Per il confronto tra le variabili qualitative riferite ai tre diversi vaccini analizzati è stato utilizzato il test chi-quadrato di Pearson.

L'associazione tra due variabili è stata valutata tramite coefficiente di correlazione di Spearman, con approssimazione Gaussiana.

L'Odds è stato stimato attraverso analisi di regressione logistica binaria basata su rapporti di verosimiglianza ricavati includendo una serie di variabili indipendenti, definite tali dal $p < 0,25$ delle analisi univariate.

Tutti i p-values sono stati ottenuti in test a doppia coda, ed è stato ritenuto statisticamente significativa ogni associazione con $p < 0,05$.

Capitolo 5: RISULTATI

5.1: Analisi della risposta immunologica: coorte dello studio multicentrico

5.1.1 Caratteristiche del campione

Il totale dei pazienti arruolati inizialmente per questa fase dello studio ammonta a 489, dei quali 132 sani, inseriti nel gruppo di controllo, e 357 con patologia epatica cronica di qualunque eziologia ed a qualunque stadio di gravità della malattia.

Di questa coorte, tuttavia, 55 sono stati esclusi a causa di mancanza del prelievo di sangue a T2. Questa esclusione è dovuta a diversi fattori: la mancata compliance del paziente, l'effettuazione di trapianto di fegato, o la morte; inoltre sono stati esclusi i pazienti (n = 15) cui è stato somministrato il vaccino a vettore virale JNJ-78436735 (vaccino Johnson & Johnson, vedi capitolo 1), a causa della scarsa numerosità campionaria e del diverso schema terapeutico di somministrazione rispetto agli altri vaccini, ovvero a singola dose invece che doppia, con una seconda dose da somministrare dopo un intervallo di 2-6 mesi [76].

Infine, i pazienti che hanno subito infezione da SARS-CoV-2 prima dell'inizio della campagna vaccinale (n=75), identificati sia tramite anamnesi sia tramite rilevazione di positività anticorpale alle proteine del nucleocapside virale (i vaccini infatti generano immunità esclusivamente verso la proteina S di superficie), sono stati esclusi dalla parte di studio relativa al follow-up a breve termine, ovvero a due settimane dopo la seconda dose di vaccino ricevuta.

Il totale di pazienti analizzati a T0 ed a T2 è quindi di 212, e le caratteristiche di questo campione sono riassunte in [Tab. 3]. La mediana d'età di questa popolazione è di 57 anni (IQR 52,0 – 64,0 anni), ed il 56,6% rappresenta la componente maschile. Le più comuni eziologie relative alle varie epatopatie croniche erano epatite virale (45,3%) e steatosi epatica ad eziologia metabolica (Metabolic Related Fatty Liver Disease, MRFLD – 45,8%), che include sia la NAFLD che la steatosi epatica alcolica. Altre eziologie registrate, in percentuale minore, sono le epatopatie autoimmuni/colestatiche, le epatopatie ereditarie (malattia di Wilson, emocromatosi e policistosi epatico-renale) e le epatopatie criogeniche.

Un altro parametro raccolto riguarda l'eventuale terapia farmacologica in atto da parte dei pazienti. Si distinguono in questo contesto tre diverse classi di terapie a cui i pazienti erano sottoposti:

- Terapia immunosoppressiva come cortisonici, micofenolato mofetile, azatioprina, altri.
- Terapia metabolica: acido ursodesossilico, acido obetico, fibrati, metformina, analoghi di GLP-1, insulina, statine, altri.
- Terapia antivirale tra cui entecavir, tenofovir, interferone, altri.

Si è inoltre andato a specificare lo stadio di avanzamento della patologia epatica, e si è visto come del totale dei pazienti, il 66,5% presentava uno stato avanzato di fibrosi (METAVIR F3 – F4); una percentuale simile (61,8%) è stata associata a diagnosi di cirrosi, con diversi pazienti che quindi presentavano entrambi.

Tra le comorbidità registrate, le più comuni sono l'ipertensione arteriosa (31,1%), il diabete mellito di tipo II (25,5%) e l'obesità (19,8%). Da notare che molti pazienti sono associati a più eziologie contemporaneamente oltre che a più comorbidità.

	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 23)	mRNA-1273 (n = 40)	BNT162b2 (n = 149)	Total (n = 212)	p value
General characteristics					
Age	63.0 (57.0–71.0)	58.0 (53.0–62.5)	56.0 (50.0–64.0)	57.0 (52.0–64.0)	<0.01
Male	14 (60.9)	26 (65.0)	80 (53.7)	120 (56.6)	n.s.
Ethnicity					
Caucasian	22 (95.7)	38 (95.0)	140 (94.0)	200 (94.3)	n.s.
Asian	1 (4.3)	0 (0.0)	3 (2.0)	4 (1.9)	
African	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.0)	3 (1.4)	
Other	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.0)	3 (1.4)	
Not reported	0 (0.0)	2 (4.9)	0 (0.0)	2 (0.9)	
Weight	81.0 (72.0–93.0)	81.0 (69.0–88.8)	75.0 (63.0–88.0)	75.0 (65.0–88.0)	n.s.
Height	168.0 (164.0–175.0)	175.5 (165.0–179.0)	169.0 (163.3–175.0)	170.0 (164.0–176.0)	n.s.
BMI (kg/m ²)	28.4 (24.7–34.7)	26.4 (23.5–30.4)	25.5 (22.8–29.8)	26.0 (23.1–30.3)	n.s.
Aetiology of liver disease					
Viral hepatitis	7 (30.4)	13 (32.5)	76 (51.0)	98 (45.3)	<0.05
Autoimmune and/or cholestatic liver disease	1 (4.3)	6 (15.0)	20 (13.4)	27 (12.7)	n.s.
Metabolic related fatty liver disease	16 (69.6)	23 (57.5)	58 (38.9)	97 (45.8)	<0.01
Hereditary liver disease	0 (0.0)	1 (2.5)	4 (2.7)	5 (2.4)	n.s.
Cryptogenic liver disease	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	1 (0.5)	n.s.
Pharmacotherapy					
Immunosuppressive treatment	3 (13.0)	5 (12.5)	10 (6.7)	18 (8.5)	n.s.
Antiviral therapy	1 (4.3)	2 (5.0)	22 (14.8)	25 (11.8)	n.s.
Metabolic therapy	10 (43.5)	10 (25.0)	50 (33.6)	70 (33.0)	n.s.
Stage of liver disease					
F3–F4	20 (87.0)	32 (80.0)	89 (59.7)	141 (66.5)	<0.01
Liver cirrhosis	19 (82.6)	30 (75.0)	82 (55.0)	131 (61.8)	<0.01
Hepatocellular carcinoma	2 (8.7)	3 (7.5)	10 (6.7)	15 (7.1)	n.s.
Comorbidities					
Type 2 diabetes mellitus	9 (39.1)	11 (27.5)	34 (22.8)	54 (25.5)	n.s.
Arterial hypertension	6 (26.1)	19 (47.5)	41 (27.5)	66 (31.1)	<0.05
Obesity	9 (39.1)	7 (17.5)	26 (17.4)	42 (19.8)	<0.05
Hypertriglyceridaemia	3 (13.0)	2 (5.0)	9 (6.0)	14 (6.6)	n.s.
Hypercholesterolaemia	4 (17.4)	4 (10.0)	26 (17.4)	34 (16.0)	n.s.
Renal insufficiency	0 (0.0)	2 (5.0)	6 (4.0)	8 (3.8)	n.s.
Asthma	2 (8.7)	0 (0.0)	7 (4.7)	9 (4.2)	n.s.
Heart/cardiovascular disease	2 (8.7)	4 (10.0)	20 (13.4)	26 (12.3)	n.s.
Smoking	1 (4.3)	7 (17.5)	18 (12.1)	26 (12.3)	n.s.
Other	5 (21.7)	7 (17.5)	39 (26.2)	51 (24.1)	n.s.

Tab. 3 [87] Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con epatopatia cronica. I dati sono esposti come mediana (IQR) per variabili continue e n (%) per variabili qualitative.

Del gruppo di pazienti affetti da epatopatia cronica, il 10,8% è stato vaccinato con doppia dose di ChAdOx-1 (Oxford-Astrazeneca), il 18,9% con mRNA-1273 (Moderna), ed il 70,3% con BNT162b2 (BioNTech-Pfizer).

La popolazione di controllo, descritta in [Tab. 4], consisteva di 132 pazienti negativi per le IgG dirette verso le proteine del nucleocapside; la mediana d'età di questo gruppo è di 45,5 anni (IQR 37.0 - 57.3 anni), mentre la percentuale di maschi è del 28%.

Di questo gruppo di pazienti, il 9,1% è stato vaccinato con doppia dose di ChAdOx-1 (Oxford-Astrazeneca), il 7,6% con mRNA-1273 (Moderna), e l'83,3% con BNT162b2 (BioNTech-Pfizer).

Healthy Volunteers	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 12)	mRNA-1273 (n = 10)	BNT162b2 (n = 110)	Total (n = 132)	p value
Age	41.0 (33.0 – 55.3)	39.5 (27.8 – 59.5)	46.5 (38.0 – 58.0)	45.5 (37.0 – 57.3)	ns
Male	6 (50.0)	3 (30.0)	28 (25.5)	37 (28.0)	ns

Tab. 4 [87] Caratteristiche demografiche pazienti sani del gruppo di controllo

Si nota quindi come tra i due gruppi esistano due principali differenze: il gruppo di controllo è infatti mediamente più giovane (mediana, 45,5 vs 57 anni) e la popolazione femminile è più rappresentata (72% vs 43,4%).

I vaccini studiati, che rappresentano i tre principali vaccini di prima generazione utilizzati su scala mondiale, sono stati sviluppati per fornire immunità verso il primo virus SARS-CoV-2 isolato, ovvero quello originale responsabile della prima ondata di contagi partita da Wuhan (e per questo denominato Wuhan-Hu-1).

5.1.2 Analisi dati nel breve periodo: T0 – T2 time points.

La maggior parte dei pazienti con epatopatia cronica (96%) ha avuto una risposta immunitaria alla vaccinazione, valutata tramite l'analisi dei livelli di immunoglobuline dirette verso l'antigene di Wuhan-Hu-1, la variante originale del virus SARS-CoV-2 che colpì Wuhan e che è stata sequenziata per prima.

Al T0 (pre-vaccinazione) i valori di IgG, IgM e la percentuale di anticorpi neutralizzanti erano rispettivamente 0.2 nM (IQR 0.0 - 0.9 nM), 0.3 nM (IQR 0.1 - 0.5 nM) e 14.8 (IQR 8.4 - 21.1); al T2, completata la vaccinazione, tali valori si sono alzati rispettivamente a 419 nM (IQR 188.1 - 650.0 nM; $p < 0.0001$), 1.4 nM (IQR 0.8 - 2.8 nM; $p < 0.0001$), e 60 (IQR 40.3 - 76.9; $p < 0.0001$) [Fig. 1].

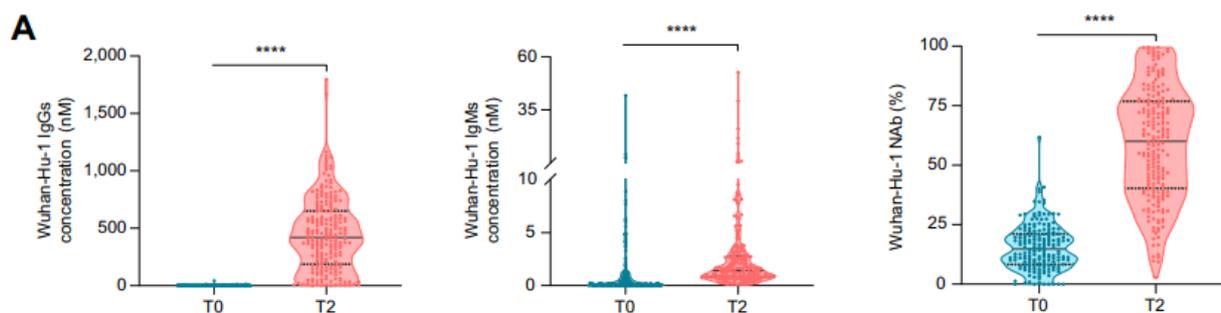


Fig. 1 [87] Valori di IgG, IgM e % di anticorpi neutralizzanti nei pazienti con epatopatia cronica a T0 e T2. La linea continua indica la mediana, le linee tratteggiate l'IQR.

Nella [Fig. 2] vengono riportati i grafici a violino che mostrano un confronto dei livelli di IgG (Wuhan-Hu-1) al T2 tra pazienti raggruppati di volta in volta in due o più gruppi sulla base di determinate caratteristiche.

Da questi grafici si sono evidenziate alcune differenze significative:

- I livelli di IgG erano significativamente più elevati nei pazienti giovani con meno di 50 anni rispetto ai pazienti di età compresa tra i 50 ed i 64 anni ($p < 0,001$) ed ai pazienti di età maggiore o uguale a 65 anni ($p < 0,01$). Analogamente, i pazienti con epatite virale mostrano valori di IgG maggiori rispetto a quelli con altre eziologie di epatopatia cronica ($p < 0,01$), e dei pazienti che erano in corso di terapia antivirale rispetto a quelli che non la stavano ricevendo ($p < 0,05$).

- I livelli di IgG erano invece minori in pazienti con epatocarcinoma rispetto a chi non lo aveva ($p < 0,05$), così come in pazienti con MRFLD rispetto ai pazienti con altre eziologie di epatopatia cronica ($p < 0,01$) e in pazienti che erano in corso di terapia metabolica rispetto a chi non lo era ($p < 0,05$).

Inoltre è stata osservata una risposta immunologica maggiore nei pazienti con epatopatia cronica vaccinati con mRNA-1273, seguiti dai pazienti vaccinati con BNT162b2 ed infine dai pazienti vaccinati con ChAdOx-1.

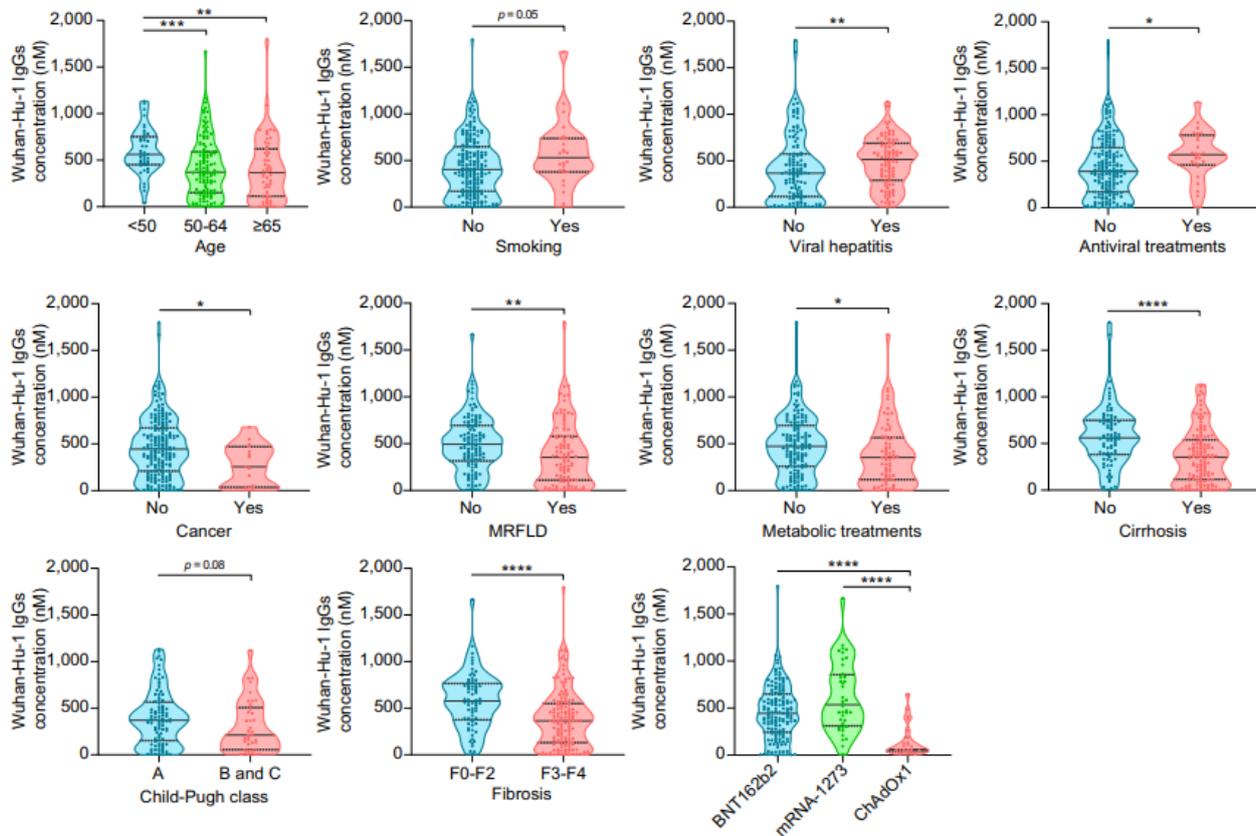


Fig. 2 [87] Confronto dei livelli di anti-Wuhan-Hu-1 IgG al T2 di pazienti con epatopatia cronica, divisi per età, abitudine al fumo, eziologia virale dell'epatopatia cronica, trattamento antivirale in corso, presenza di epatocarcinoma, eziologia MRFLD, trattamento metabolico in corso, presenza di cirrosi, classe Child-Pugh, stadio METAVIR di fibrosi e vaccino ricevuto.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Per quanto riguarda la popolazione sana di controllo [Tab. 5], i livelli di IgG, IgM e la percentuale di anticorpi neutralizzanti presente al T2 erano rispettivamente 409.6 nM (254.3 - 576.3 nM), 1.0 nM (0.3 - 2.2 nM), e 57.6% (43.8 - 75.1%). I valori, dunque, non si discostano significativamente dai valori rilevati nei pazienti epatopatici, nei quali comunque le IgM rimangono più elevate rispetto ai sani ($p < 0,05$).

Stratificare i pazienti per eziologia e severità della patologia epatica non ha alcun impatto su questi risultati, sebbene si sia notata una minore risposta dei pazienti cirrotici o con fibrosi avanzata (F3 - F4) rispetto al gruppo di controllo; questa differenza comunque non ha riscontrato significatività statistica.

Healthy Volunteers	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 12)	mRNA-1273 (n = 10)	BNT162b2 (n = 110)	Total (n = 132)	p value
Age	41.0 (33.0 – 55.3)	39.5 (27.8 – 59.5)	46.5 (38.0 – 58.0)	45.5 (37.0 – 57.3)	ns
Male	6 (50.0)	3 (30.0)	28 (25.5)	37 (28.0)	ns
Days after second dose vaccination	15.0 (15.0 – 15.0)	28.0 (16.8 – 28.0)	17.0 (15.0 – 21.0)	16.0 (15.0 – 21.0)	ns
Negative serologic response (IgG)	1 (8.3)	0 (0.0)	3 (2.7)	4 (3.0)	ns
Negative serologic response (NAb)	1 (8.3)	0 (0.0)	6 (5.5)	7 (5.3)	ns
Antibody titer (T2)					
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	276.7 (87.2 – 397.0)	768.4 (555.3 – 1,009.2)	408.9 (250.2 – 541.0)	409.6 (254.3 – 576.3)	<0.0001
IgM (nM)	0.4 (0.2 – 1.6)	12.0 (4.8 – 22.5)	1.0 (0.3 – 2.0)	1.0 (0.3 – 2.2)	<0.0001
% of neutralization	39.8 (33.0 – 49.8)	85.3 (76.3 – 94.7)	58.4 (46.1 – 74.1)	57.6 (43.8 – 75.1)	<0.0001
Patients with CLD	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 23)	mRNA-1273 (n = 40)	BNT162b2 (n = 149)	Total (n = 212)	p value
Antibody titer at baseline (T0)					
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	0.2 (0.0 – 0.6)	0.0 (0.0 – 0.6)	0.2 (0.0 – 1.1)	0.2 (0.0 – 0.9)	ns
IgM (nM)	0.2 (0.1 – 0.5)	0.2 (0.1 – 0.3)	0.3 (0.1 – 0.5)	0.3 (0.1 – 0.5)	ns
% of neutralization	17.8 (10.4 – 24.5)	10.5 (7.3 – 13.2)	17.1 (9.4 – 22.5)	14.8 (8.4 – 21.1)	<0.01
Days after second dose vaccination	19.0 (15.0 – 22.0)	17.0 (15.0 – 20.0)	15.5 (14.0 – 23.0)	17.0 (14.0 – 22.5)	ns
Negative serologic response (IgG)	0 (0.0)	1 (2.5)	7 (4.7)	8 (3.8)	ns
Negative serologic response (NAb)	3 (13.0)	5 (12.5)	8 (5.4)	16 (7.5)	ns
Antibody titer (T2)					
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	61.7 (40.7 – 206.1)	535.3 (310.8 – 856.1)	444.0 (242.7 – 649.8)	419.0 (188.1 – 650.0)	<0.0001
IgM (nM)	0.9 (0.6 – 1.7)	1.7 (0.9 – 5.1)	1.4 (0.8 – 2.8)	1.4 (0.8 – 2.8)	<0.01
% of neutralization	42.6 (36.2 – 53.6)	61.9 (35.1 – 85.9)	64.2 (44.2 – 77.0)	60.0 (40.3 – 76.9)	<0.05

Tab. 5 [87] Risposta anticorpale alla vaccinazione di pazienti sani e pazienti con epatopatia cronica a T2. I dati sono esposti come mediana (IQR) per variabili continue e n (%) per variabili qualitative.

Per identificare variabili indipendenti che potessero essere associate ad una differente risposta anticorpale, i pazienti sono stati divisi in low-responders e high-responders in base al loro valore di IgG registrato a T2, prendendo come valore cut-off 418,95 nM, ovvero la mediana [Fig. 3 (A)]. Si è visto che ad elevati valori di IgG (quindi il gruppo high-responders) corrispondevano valori più alti anche di IgM e maggiore percentuale di anticorpi neutralizzanti, ed analogamente il gruppo di low-responders mostrava livelli inferiori di IgM e minore percentuale di anticorpi neutralizzanti [Fig. 3 (B)].

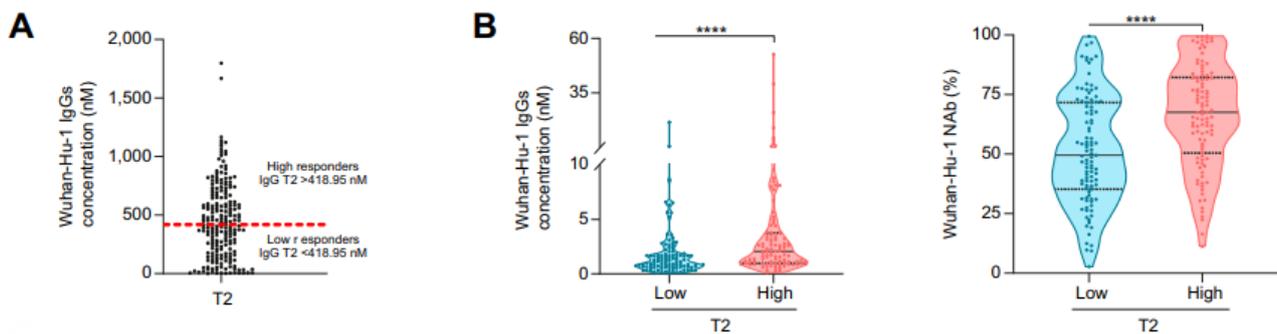


Fig. 3 [87] (A) Distribuzione IgG al T2 dei pazienti epatopatici. La linea rossa tratteggiata corrisponde alla mediana e divide high-responders da low-responders. (B) Valori di IgM e % di anticorpi neutralizzanti al T2 divisi tra low-responders e high-responders. La linea nera continua indica la mediana, mentre le linee tratteggiate l'IQR.

Da analisi univariate svolte poi sulla base di questa distinzione, i cui risultati sono descritti nella [Tab. 6], è emerso che:

- L'eziologia virale dell'epatite (odds ratio [OR] 2.34, 95% CI 1.35 - 4.07; CI = Confidence Interval, ovvero l'Intervallo di Confidenza di OR) e la terapia antivirale in corso di svolgimento (OR 4.70, 95% CI 1.69 - 13.05) sono predittivi di una risposta immunitaria più elevata.
- L'età avanzata (OR 0.95, 95% CI 0.92 - 0.98), la diagnosi di MRFLD (OR 0.41, 95% CI 0.24 - 0.72) e la terapia metabolica in corso di svolgimento (OR 0.46, 95% CI 0.26 - 0.82) sono invece predittivi di una risposta immunitaria minore.
- Per quanto riguarda invece la gravità della patologia epatica, la presenza di alto grado di fibrosi (OR 0.28, 95% CI 0.15 - 0.51) e la presenza di cirrosi (OR 0.28, 95% CI 0.15 - 0.50) correlano con una risposta immunitaria minore. Non sono state notate differenze statisticamente significative, invece, stratificando i pazienti cirrotici per classe Child-Pugh (B + C vs A).

- Tra i vaccinati con ChAdOx-1, solamente l'8% rientravano tra i high-responders (2 pazienti sui 23 totali), contro il 51,7% dei vaccinati con BNT162b2 (77 pazienti su 149 totali) ed il 67,5% dei vaccinati con mRNA-1273 (27 pazienti su 40 totali) [Tab.6].

	Low responders* (n = 106)	High responders* (n = 106)	Univariate analysis		Multivariate analysis	
			OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
Age	59.0 (53.8–65.3)	56.0 (47.0–62.3)	0.95 (0.92–0.98)	<0.0001	0.97 (0.93–0.99)	0.042
Sex						
Male	61 (57.5)	59 (55.7)	1 (Ref.)	–		
Female	45 (42.5)	47 (44.3)	1.08 (0.63–1.86)	0.782		
BMI (kg/m ²)	27.0 (24.2–30.7)	24.9 (22.5–29.4)	0.95 (0.90–1.01)	0.075		
Aetiology of liver disease, yes (vs. no)						
Viral hepatitis	37 (34.9)	59 (55.7)	2.34 (1.35–4.07)	0.003	2.15 (1.04–4.45)	0.039
Autoimmune and/or cholestatic liver disease	15 (14.2)	12 (11.3)	0.77 (0.34–1.74)	0.537		
Metabolic related fatty liver disease	60 (56.6)	37 (34.9)	0.41 (0.24–0.72)	0.002		
Hereditary liver disease	1 (0.9)	4 (3.8)	4.12 (0.45–37.47)	0.209		
Cryptogenic liver disease	1 (0.9)	0 (0.0)	–	–		
Immunosuppressive treatment, yes (vs. no)	10 (9.4)	8 (7.5)	0.78 (0.30–2.07)	0.623		
Antiviral therapy, yes (vs. no)	5 (4.7)	20 (18.9)	4.70 (1.69–13.05)	0.003	2.77 (0.83–9.26)	0.098
Metabolic therapy, yes (vs. no)	44 (41.5)	26 (24.5)	0.46 (0.26–0.82)	0.009		
Stage of liver disease, yes (vs. no)						
F0–F2	21 (19.8)	50 (47.2)	1 (Ref.)	<0.0001		
F3–F4	85 (80.2)	56 (52.8)	0.28 (0.15–0.51)			
Liver cirrhosis	81 (76.4)	50 (47.2)	0.28 (0.15–0.50)	<0.0001	0.33 (0.16–0.68)	0.003
Child–Pugh score class, A (vs. B + C)	55 (67.9)	38 (76.0)	1.50 (0.67–3.33)	0.322		
Hepatocellular carcinoma	11 (10.4)	4 (3.8)	0.34 (0.11–1.11)	0.072		
Comorbidities, yes (vs. no)						
Type 2 diabetes mellitus	30 (28.3)	24 (22.6)	0.74 (0.40–1.38)	0.345		
Arterial hypertension	34 (32.1)	32 (30.2)	0.92 (0.51–1.64)	0.77		
Obesity	21 (19.8)	21 (19.8)	1.0 (0.51–1.97)	1.0		
Hypertriglyceridaemia	8 (7.5)	6 (5.7)	0.74 (0.25–2.20)	0.58		
Hypercholesterolaemia	22 (20.8)	12 (11.3)	0.49 (0.23–1.05)	0.065		
Renal Insufficiency	5 (4.7)	3 (2.8)	0.59 (0.14–2.53)	0.476		
Asthma	3 (2.8)	6 (5.7)	2.06 (0.50–8.46)	0.316		
Heart/cardiovascular disease	10 (9.4)	16 (15.1)	1.71 (0.74–3.96)	0.213		
Smoking	9 (8.5)	17 (16.0)	2.06 (0.87–4.85)	0.099		
Other	30 (28.3)	21 (19.8)	0.63 (0.33–1.18)	0.15		
Vaccine type (vs. mRNA-1273)						
mRNA-1273	13 (12.3)	27 (25.5)	1 (Ref.)			
ChAdOx1 nCoV-19	21 (19.8)	2 (1.9)	0.05 (0.01–0.24)	<0.0001	0.04 (0.01–0.23)	<0.0001
BNT162b2	72 (67.9)	77 (72.6)	0.52 (0.24–1.06)	0.077	0.26 (0.11–0.59)	0.001

Tab. 6 [87] Variabili associate a risposta anticorpale alla vaccinazione dei pazienti con epatopatia cronica a T2. I dati sono riportati come mediana (IQR) per le variabili continue e n (%) per variabili qualitative. I risultati dell'analisi di regressione logistica sono riportati come OR, 95% CI e p values. Le covariate con $p < 0,25$ nell'analisi univariata ($n = 14$) sono state inserite in un modello di analisi logistica multivariata.

5.1.3 Analisi dati nel lungo periodo (T0-T3)

Successivamente a queste analisi, sono state analizzate l'immunità sierologica dei pazienti con epatopatia cronica verso le varianti B.1.617.2 (Delta) e B.1.1.529 (Omicron), che al momento dello studio erano le due più prevalenti nella popolazione generale, a due settimane (T2) e sei mesi (T3) dal completamento della vaccinazione. In questo periodo, 48 pazienti e 30 volontari sani hanno abbandonato lo studio, mentre 29 pazienti e 18 volontari sani hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2 (confermata tramite rilevazione di anticorpi verso l'antigene del nucleocapside virale). Di conseguenza, a questa fase dello studio hanno partecipato 135 pazienti con epatopatia cronica ed 84 individui sani.

Dai dati ottenuti, si ricava che:

- Sia i livelli di IgG diretti contro la variante B.1.617.2 ($p < 0,0001$) che di IgG diretti contro la variante B.1.1.529 ($p < 0,0001$) a T2 erano inferiori rispetto ai livelli di IgG diretti contro Wuhan-Hu-1; a T3 queste relazioni sono state confermate ($p < 0,0001$), con livelli assoluti di IgG sensibilmente inferiori [Fig. 4 (C), sinistra]. Sia in T2 che in T3, i pazienti classificati precedentemente come high-responders sulla base dei livelli di IgG contro Wuhan-Hu-1 hanno mostrato maggiore risposta anche verso le altre due varianti rispetto ai pazienti classificati come low-responders [Fig. 4 (C), centro e destra].
- Sia a T2 che a T3 le risposte immunitarie dei pazienti epatopatici e dei pazienti sani erano simili, con l'unica eccezione rappresentata dal minore livello di IgG contro la variante B.1.1.529 a T2 dei pazienti epatopatici ($p < 0,01$) [Fig. 4 (D)]. Ciononostante, stratificando i risultati sulla base dei vaccini ricevuti, si nota a T2 un livello minore di IgG contro B.1.617.2 ($p < 0,05$) e di IgG contro B.1.1.529 ($p < 0,01$) da parte dei pazienti epatopatici vaccinati con ChAdOx-1 rispetto alla popolazione sana, seguito dai pazienti a cui è stato somministrato mRNA-1273 ed infine dai pazienti che hanno ricevuto BNT162b2 [Tab. 7].
- Al T3 i pazienti epatopatici hanno registrato un minore livello di IgG indipendentemente dal vaccino ricevuto rispetto alla popolazione sana [Tab. 7].
- Conformemente alle informazioni trovate in letteratura [77], i dati registrati mostrano che età e sesso sono due fattori confondenti nell'analisi della risposta immunitaria alle vaccinazioni per COVID-19. Sono state ricercate differenze nella risposta immunitaria ai vaccini tra i volontari sani ed i pazienti epatopatici calibrando i campioni per sesso ed età, senza trovare differenze statisticamente significative. Sono dunque state selezionate sotto-coorti tra le due popolazioni con distribuzioni di sesso ed età sovrapponibili, ed è stato

confermato il livello minore di IgG per tutte le varianti di SARS-CoV-2 nei pazienti epatopatici vaccinati con ChAdOx-1 rispetto alla controparte sana [Tab. 8]; invece i pazienti che hanno ricevuto il vaccino BNT162b2 hanno registrato livelli lievemente superiori di IgG rispetto ai volontari sani vaccinati con lo stesso vaccino. Considerando le due sotto-coorti nell'insieme, tuttavia, non sono state registrate differenze statisticamente rilevanti [Tab. 8].

- Rispetto ai dati rilevati in T2, in T3 sono state trovate meno associazioni tra differenze nei valori di IgG contro Wuhan-Hu-1 e caratteristiche demografiche o cliniche [Fig. 5]; tra queste, l'eziologia virale dell'epatite e la terapia antivirale in corso di somministrazione hanno perso la loro associazione ad una maggiore risposta anticorpale. L'età avanzata e lo stadio avanzato di patologia (compreso lo stadio più avanzato di cirrosi, definito dalle classi Child-Pugh B + C vs A) continuano a mostrare un'associazione con minori livelli di IgG. Inoltre è rimasta analoga nella popolazione epatopatica l'inferiorità dei livelli di IgG dei pazienti vaccinati con ChAdOx-1 rispetto ai pazienti vaccinati con gli altri due vaccini.

Antibody titer in healthy volunteers (T2)	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 12)	mRNA-1273 (n = 10)	BNT162b2 (n = 110)	Total (n = 132)	p value
IgG B.1.617 (nM)	174.2 (58.6 – 290.0)	454.8 (356.0 – 653.7)	275.5 (149.4 – 413.2)	275.5 (152.8 – 422.8)	<0.01
IgG B.1.1.529 (nM)	157.4 (32.3 – 214.2)	245.2 (113.9 – 409.1)	130.1 (86.4 – 220.8)	136.5 (89.3 – 224.6)	<0.05
Antibody titer in patients with CLD (T2)	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 23)	mRNA-1273 (n = 40)	BNT162b2 (n = 149)	Total (n = 212)	p value
IgG B.1.617 (nM)	47.1 (23.3 – 78.2) [†]	352.6 (214.1 – 571.6)	257.4 (143.9 – 410.0)	245.4 (119.9 – 408.2)	<0.0001
IgG B.1.1.529 (nM)	24.5 (4.7 – 78.5) [‡]	141.4 (79.7 – 295.8)	110.8 (56.4 – 188.8)	103.6 (47.4 – 192.6) [†]	<0.0001
Antibody titer in healthy volunteers (T3)	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 8)	mRNA-1273 (n = 2)	BNT162b2 (n = 74)	Total (n = 84)	p value
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	82.7 (50.0 – 127.2)	293.4 (238.8 - .)	80.8 (46.8 – 142.8)	85.0 (47.5 – 149.9)	ns
IgG B.1.617 (nM)	55.0 (43.0 – 90.2)	204.4 (156.2 - .)	48.9 (34.8 – 86.9)	50.9 (35.2 – 92.0)	ns
IgG B.1.1.529 (nM)	20.5 (13.8 – 37.5)	65.2 (62.0 - .)	17.6 (10.9 – 28.0)	17.8 (11.0 – 32.9)	ns
Days after start of vaccination	201 (198-201)	190 (190-192.5)	190 (170-195)	192 (173.8-196.3)	ns
Antibody titer in patients with CLD (T3)	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 18)	mRNA-1273 (n = 25)	BNT162b2 (n = 92)	Total (n = 135)	p value
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	32.8 (8.6 – 85.9)	176.1 (81.5 – 257.2)	82.0 (40.1 – 147.4)	83.1 (39.4 – 183.2)	<0.0001
IgG B.1.617 (nM)	14.6 (5.4 – 67.9)	98.8 (59.3 – 171.2)	61.4 (13.7- 113.0)	62.3 (14.7 – 120.8)	<0.01
IgG B.1.1.529 (nM)	4.0 (2.5 – 8.5)	16.2 (8.7 – 57.6)	8.6 (4.0 – 55.9)	9.4 (3.9 – 54.1)	<0.05
Days after start of vaccination	190 (182.5-206.5)	180 (179-182)	187 (181-209)	185 (180-208.5)	ns

Tab. 7 [87] Risposta anticorpale alla vaccinazione per COVID-19 in volontari sani e pazienti con epatopatia cronica a T2 e T3. I dati sono esposti come mediana (IQR). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per confrontare le variabili tra i tre diversi vaccini; per confrontare la popolazione sana con quella malata è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

Antibody titre in healthy volunteers	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 9)	mRNA-1273 (n = 6)	BNT162b2 (n = 68)	Total (N = 83)	p value
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	113.4 (54.1–349.5)	709.6 (545.2–851.5)	409.6 (244.2–535.1)	409.2 (237.1–557.5)	<0.001
IgG B.1.617 (nM)	77.9 (35.8–285.0)	408.3 (223.1–485.9)	269.4 (137.8–375.2)	269.8 (135.6–381.2)	n.s.
IgG B.1.1.529 (nM)	89.3 (20.4–194.6)	298.5 (107.3–473.3)	125.5 (80.1–213.9)	126.1 (78.8–219.8)	n.s.
IgM (nM)	0.4 (0.2–1.6)	11.3 (3.5–17.6)	0.9 (0.3–1.9)	0.9 (0.3–2.1)	<0.01
% neutralisation	39.3 (31.6–50.4)	83.5 (63.2–91.9)	58.7 (46.7–74.2)	57.0 (45.1–74.2)	<0.001
Antibody titre in patients with CLD	ChAdOx1 nCoV-19 (n = 6)	mRNA-1273 (n = 16)	BNT162b2 (n = 61)	Total (N = 83)	p value
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	31.9 (17.7–56.7)*	496.2 (312.0–1,104.310)	534.0 (299.2–707.1)*	494.2 (231.4–713.0)	<0.01
IgG B.1.617 (nM)	20.9 (3.9–43.7)*	352.8 (195.7–785.7)	300.2 (179.2–507.2)	296.0 (136.1–524.0)	<0.01
IgG B.1.1.529 (nM)	3.9 (1.2–6.7)†	158.6 (85.1–358.8)	143.0 (67.0–231.6)	132.3 (56.3–238.3)	<0.001
IgM (nM)	0.7 (0.5–2.2)	3.7 (1.6–8.5)	1.5 (0.9–3.1)†	1.6 (0.9–3.7)	<0.01
% neutralisation	47.3 (41.3–67.3)	50.8 (27.5–94.8)	65.6 (50.7–81.6)	63.1 (43.7–81.5)	n.s.

Tab. 8 [87] Risposta anticorpale alla vaccinazione per COVID-19 in sotto-coorti di volontari sani e pazienti con epatopatia cronica, selezionate per ottenere distribuzioni sovrapponibili di sesso ed età, a T2 e T3. I dati sono esposti come mediana (IQR). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per confrontare le variabili tra i tre diversi vaccini; per confrontare la popolazione sana con quella malata è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

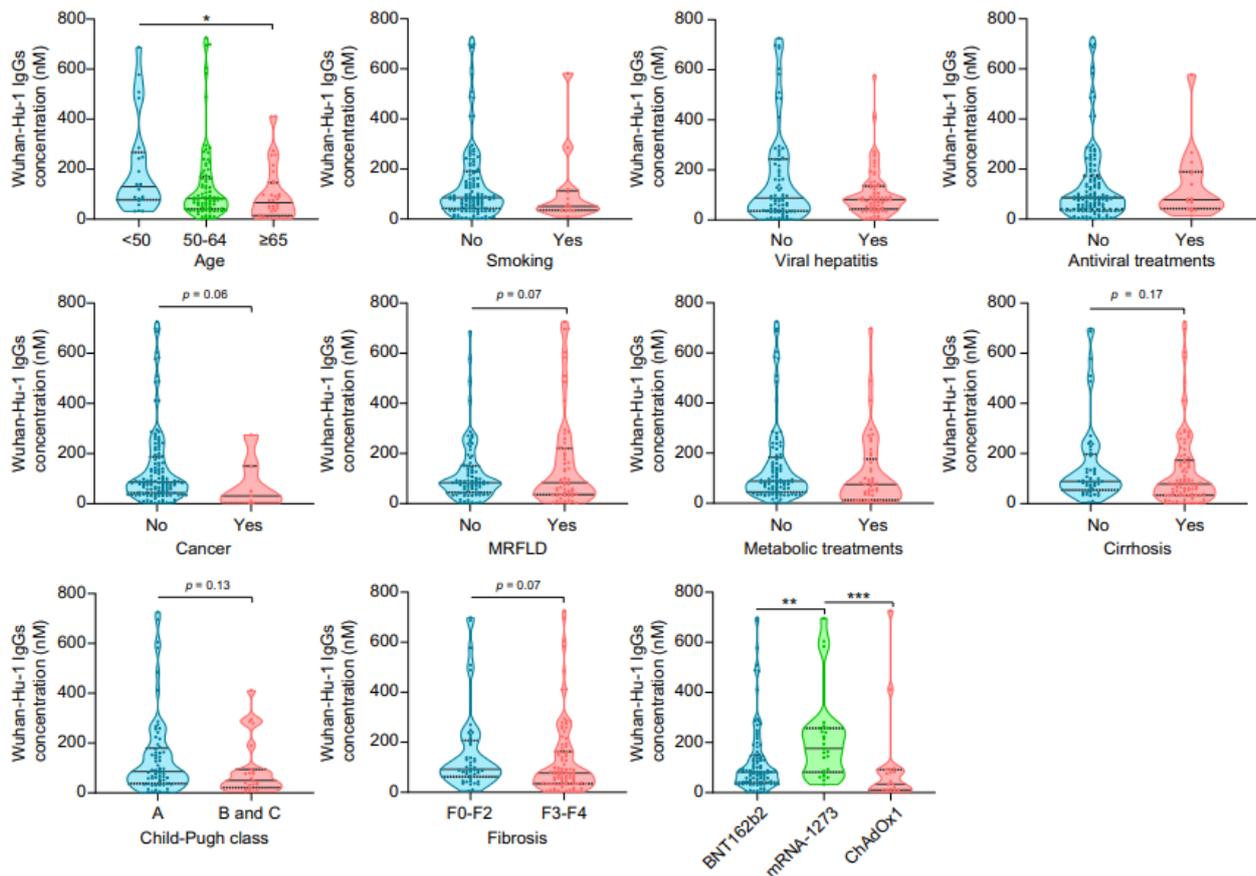


Fig. 5 [87] Livelli di IgG contro Wuhan-Hu-1 a T3 in pazienti divisi in base a caratteristiche demografiche e cliniche ed a tipologia di vaccino ricevuto. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5.1.4 Analisi sull'efficacia della vaccinazione tra T2 e T3

La fase successiva dello studio riguarda l'analisi dei pazienti che hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2 tra T2 e T3 (n = 29) per valutare la possibile associazione tra l'efficacia clinica della vaccinazione e le variabili demografiche e cliniche prese in esame durante questo studio.

Tutti i pazienti in questione hanno presentato lieve sintomatologia durante l'infezione da SARS-CoV-2 oppure sono stati asintomatici.

	Noninfected patients (n = 135)	SARS-CoV-2 infection (n = 29)	p value
General characteristics			
Age	57.0 (52.0–64.0)	58.0 (54.0–65.0)	n.s.
Male	75 (55.6)	18 (62.1)	n.s.
Ethnicity			
Caucasian	127 (94.1)	27 (93.1)	n.s.
Asian	4 (3.0)	0 (0.0)	
African	1 (0.7)	1 (3.4)	
Other	2 (1.5)	0 (0.0)	
Not reported	1 (0.7)	1 (3.4)	
Weight	75.0 (64.0–86.0)	82.7 (70.5–95.4)	<0.05
Height	168.0 (162.0–175.0)	174.0 (168.5–180.5)	<0.01
BMI (kg/m ²)	25.5 (23.1–29.8)	27.3 (24.7–32.2)	n.s.
Aetiology of liver disease			
Viral hepatitis	64 (47.4)	14 (48.3)	n.s.
Autoimmune and/or cholestatic liver disease	19 (14.1)	2 (6.9)	n.s.
Metabolic related fatty liver disease	57 (42.2)	15 (51.7)	n.s.
Hereditary liver disease	4 (3.0)	1 (3.4)	n.s.
Cryptogenic liver disease	1 (0.7)	0 (0.0)	n.s.
Pharmacotherapy			
Immunosuppressive treatment	10 (7.4)	1 (3.4)	n.s.
Antiviral therapy	16 (11.9)	4 (13.8)	n.s.
Metabolic therapy	45 (33.3)	13 (44.8)	n.s.
Stage of liver disease			
F3–F4	90 (66.7)	23 (79.3)	n.s.
Cirrhosis	87 (64.4)	20 (69.0)	n.s.
Hepatocellular carcinoma	7 (5.2)	4 (13.8)	n.s.
Comorbidities			
Type 2 diabetes mellitus	32 (23.7)	9 (31.0)	n.s.
Arterial hypertension	43 (31.9)	10 (34.5)	n.s.
Obesity	28 (20.7)	7 (24.1)	n.s.
Hypertriglyceridaemia	9 (6.7)	2 (6.9)	n.s.
Hypercholesterolaemia	25 (18.5)	6 (20.7)	n.s.
Renal insufficiency	1 (0.7)	2 (6.9)	<0.05
Asthma	4 (3.0)	2 (6.9)	n.s.
Heart/cardiovascular disease	16 (11.9)	4 (13.3)	n.s.
Smoking	13 (9.6)	3 (10.3)	n.s.
Other	28 (20.7)	10 (34.5)	n.s.
Vaccine type			
mRNA-1273	25 (18.5)	8 (27.6)	n.s.
ChAdOx1 nCoV-19	18 (13.3)	0 (0.0)	
BNT162b2	92 (68.1)	21 (72.4)	
Response to vaccine at T2			
Low response	65 (48.1)	17 (58.6)	n.s.
Negative serologic response	7 (5.2)	0 (0.0)	n.s.
Antibody titre at T2			
IgG Wuhan-Hu-1 (nM)	390.1 (127.0–649.1)	408.0 (267.5–643.5)	n.s.
IgG B.1.617 (nM)	241.9 (76.8–390.6)	286.7 (188.7–428.2)	n.s.
IgG B.1.1.529 (nM)	103.1 (38.3–188.6)	94.4 (60.3–204.5)	n.s.

Tab. 9 [87] Caratteristiche demografiche, cliniche e sierologiche di pazienti affetti da epatopatia cronica infettati con SARS-CoV-2 tra T2 e T3. I dati sono riportati come mediana (IQR) per le variabili continue e n (%) per variabili qualitative. Sono stati utilizzati il test di Mann-Whitney ed il test esatto di Fischer per analizzare variabili quantitative e qualitative rispettivamente. È stata considerata soglia di significatività un valore di $p < 0,05$.

Non è stata trovata correlazione tra la tipologia di vaccino ricevuto ed i tassi di infezione. Inoltre, non è stata trovata nessuna associazione tra i valori di IgG riscontrati in T2 e l'efficacia del vaccino; si è notato infatti che i valori di IgG verso tutte e tre le varianti esaminate erano simili nella popolazione infettata e in quella non infettata [Tab. 9]. Un riscontro particolare riguarda i dati sull'altezza e sul peso: valori elevati di entrambi sembrano avere una associazione con una inferiore efficacia vaccinale.

	Non-infected patients (n = 212)	SARS-CoV-2 infection (n = 75)	p value
General characteristics			
Age	57.0 (52.0 – 64.0)	57.0 (50.0 – 64.0)	ns
Male	120 (56.6)	44 (58.7)	ns
Ethnicity			
Caucasian	200 (94.3)	69 (92.0)	
Asian	4 (1.9)	2 (2.7)	
African	3 (1.4)	2 (2.7)	ns
Other	3 (1.4)	2 (2.7)	
Not reported	2 (0.9)	0 (0.0)	
Weight	75.0 (65.0 – 88.0)	78.0 (68.5 – 88.0)	ns
Height	170.0 (164.0 – 176.0)	171.0 (163.0 – 175.3)	ns
BMI (kg/m ²)	26.0 (23.1 – 30.3)	26.6 (23.7 – 30.4)	ns
Etiology of liver disease			
Viral Hepatitis	98 (45.3)	27 (36.0)	ns
Autoimmune and/or cholestatic liver disease	27 (12.7)	12 (16.0)	ns
Metabolic related fatty liver disease	97 (45.8)	33 (44.0)	ns
Hereditary liver disease	5 (2.4)	3 (4.0)	ns
Cryptogenic liver disease	1 (0.5)	1 (1.3)	ns
Pharmacotherapy			
Immunosuppressive treatment	18 (8.5)	6 (8.0)	
Antiviral therapy	25 (11.8)	7 (9.3)	
Metabolic therapy	70 (33.0)	26 (34.7)	
Stage of liver disease			
F3 – F4	141 (66.5)	50 (66.7)	ns
Liver cirrhosis	131 (61.8)	48 (64.0)	ns
Hepatocellular Carcinoma	15 (7.1)	1 (1.3)	ns
Comorbidities			
Type 2 diabetes mellitus	54 (25.5)	19 (25.3)	ns
Arterial Hypertension	66 (31.1)	29 (38.7)	ns
Obesity	42 (19.8)	16 (21.3)	ns
Hypertriglyceridemia	14 (6.6)	4 (5.3)	ns
Hypercholesterolemia	34 (16.0)	9 (12.0)	ns
Renal Insufficiency	8 (3.8)	4 (5.3)	ns
Asthma	9 (4.2)	2 (2.7)	ns
Heart/cardiovascular disease	26 (12.3)	10 (13.3)	ns
Smoking	26 (12.3)	12 (16.0)	ns
Other	51 (24.1)	12 (16.0)	ns
Vaccine type			
mRNA-1273	40 (18.9)	23 (30.7)	
ChAdOx1 nCoV-19	23 (10.8)	6 (8.0)	ns
BNT162b2	149 (70.3)	46 (61.3)	

Tab. 10 [87] Caratteristiche cliniche e demografiche di pazienti epatopatici infettati e non infettati con SARS-CoV-2 prima di T2. I dati sono riportati come mediana (IQR) per le variabili continue e n (%) per variabili qualitative. Sono stati utilizzati il test di Mann-Whitney ed il test esatto di Fischer per analizzare variabili quantitative e qualitative rispettivamente. È stata considerata soglia di significatività un valore di $p < 0,05$.

È stata poi investigata l'associazione tra l'infezione da SARS-CoV-2 e le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con epatopatia cronica; per questo scopo sono stati presi in analisi i pazienti che avevano riscontrato positività anticorpale contro l'antigene del nucleocapside prima di T2 (n = 75) e confrontati con i pazienti epatopatici non infettati.

I pazienti epatopatici infettati da SARS-CoV-2 hanno presentato sintomatologia lieve o asintomatologia, ed i principali sintomi associati all'infezione sono stati febbre (75.0%), astenia (43.8%), tosse (31.3%), dolore muscolare (25.0%), cefalea (18.8%), faringodinia (18.8%), dispnea lieve (12.5%), dolore addominale (6.3%), diarrea (6.3%), e vomito (6.3%). Solamente un paziente ha avuto necessità di ospedalizzazione e di supporto con ossigenoterapia.

I risultati ottenuti dall'analisi non mostrano nessuna associazione significativa tra le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti e tasso di infezione da SARS-CoV-2 o severità della patologia dovuta ad essa [Tab. 10].

I pazienti con epatopatia cronica infettati da SARS-CoV-2 hanno registrato valori di IgG contro Wuhan-Hu-1, B.1.617.2 e B.1.1.529 rispetto ai pazienti non infettati sia a T2 che a T3 [Fig. 6].

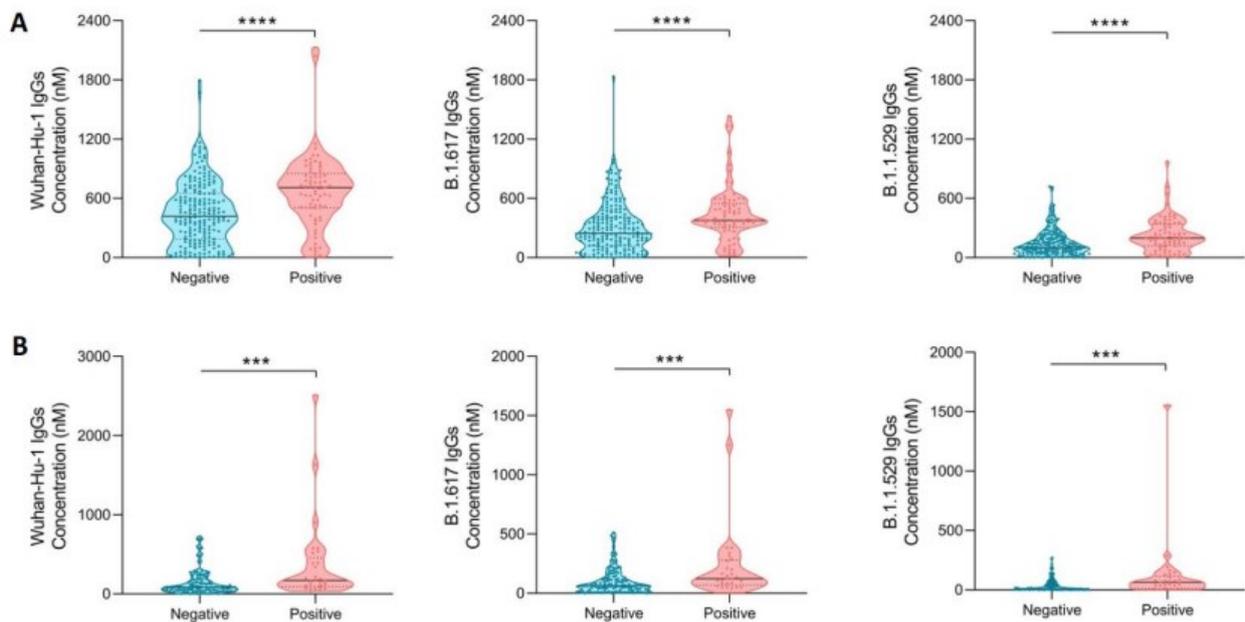


Fig. 6 [87] Livelli di IgG contro Wuhan-Hu-1, B.1.617.2 (Delta) e B.1.1.529 (Omicron) in pazienti infettati e non a T2 (A) e T3 (B). Le linee continue orizzontali rappresentano le mediane, le linee grigie tratteggiate rappresentano gli IQR. Per l'analisi di dati parametrici e non-parametrici sono stati utilizzati rispettivamente il test t di Student ed il Mann-Whitney test. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

5.2 Follow-up coorte di Padova

Nei mesi di settembre ed ottobre 2023 è stato condotto un follow up allo studio multicentrico appena descritto sulla coorte di pazienti arruolati dall'Ambulatorio Epatiti di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

5.2.1 Caratteristiche del campione

Un totale di 54 pazienti è stato inizialmente arruolato dall'Ambulatorio Epatiti per la partecipazione allo studio multicentrico; di questi, 4 pazienti hanno successivamente abbandonato lo studio.

La prima parte del follow up è consistita in un questionario somministrato via telefono dove si chiedeva ai pazienti se avessero o meno ricevuto la dose booster del vaccino e se avessero o meno contratto l'infezione dopo il completamento del ciclo vaccinale; in caso di risposta positiva a questa seconda domanda, è stato chiesto di caratterizzare la sintomatologia associata all'infezione subita. Dei 50 pazienti rimasti all'interno della coorte, non è stato possibile raggiungere telefonicamente 5 di essi.

La seconda parte, invece, si è basata sulla ricerca dei dati clinici attraverso la consultazione della cartella clinica dei pazienti. L'Azienda Ospedaliera di Padova utilizza un sistema di raccolta dati chiamato E-Health che raccoglie tutti i dati clinici dei pazienti; è stato quindi consultato tale sistema e, nello storico delle visite ambulatoriali svolte dai pazienti presso l'Ambulatorio Epatiti dell'Unità Operativa Complessa di Gastroenterologia, si sono andati a ricercare dati laboratoristici e di imaging che caratterizzassero lo stato della loro patologia epatica, con riferimento al periodo antecedente ed al periodo successivo alla vaccinazione, per indagare se avesse un impatto di qualunque tipo sulla storia clinica della patologia. Nello specifico, è stato ricercato il dato sulla Stiffness epatica valutata con l'elastometria, poi sono stati valutati i referti degli esami ematochimici relativi al follow up della patologia del paziente (HBV-DNA e HBsAg per i pazienti affetti da epatite B cronica, HCV-RNA per i pazienti affetti da epatite C cronica), ed infine sono stati analizzati i referti delle ecografie addominali di controllo per valutare lo stato della struttura epatica.

Dei 50 pazienti analizzati, alcuni non avevano all'interno del database dati relativi al periodo post-vaccinazione, in alcuni casi per mancato appuntamento alle visite di controllo programmate, in altri per mancato svolgimento degli esami richiesti.

La coorte di pazienti presa in esame è composta dal 46% di individui di sesso maschile, mentre il restante 54% è di sesso femminile. L'età dei pazienti variava in un range tra 34 e 70 anni, con una mediana di 54,5 anni (IQR 47 – 59 anni).

5.2.2 Analisi dell'efficacia vaccinale

Per valutare l'efficacia della vaccinazione nella prevenzione dell'insorgenza dell'infezione oppure, in caso negativo, nella prevenzione della forma grave della patologia derivata, 45 pazienti sono stati contattati telefonicamente per rispondere ad un breve questionario.

È stato chiesto ai pazienti se avessero effettuato o meno la dose booster di vaccino, per andare a diversificare l'efficacia delle sole prime due dosi nella protezione a lungo termine dall'efficacia con una dose booster; successivamente, è stato chiesto ai pazienti se avessero contratto o meno l'infezione da SARS-CoV-2, ed in caso positivo si è chiesto di specificare la sintomatologia associata. La maggior parte dei pazienti raggiunti presentava un'epatopatia ad eziologia virale: solamente un paziente, infatti, non ha riscontrato positività ad alcun virus epatico; degli altri, 23 presentavano epatite HBV correlata, 20 presentavano epatite HCV correlata ed un paziente aveva riscontrato positività sia ad HBV che ad HCV.

Dalla ricerca è emerso che:

- Solamente 7 pazienti su 45 non hanno ricevuto la dose booster di vaccino (15,5%). Di questi pazienti, 5 hanno contratto l'infezione (71,4%), ponendo l'efficacia delle due dosi vaccinali nel prevenire l'infezione a lungo termine nella popolazione studiata al 28,6% [Tab. 11].
- Dei 38 pazienti che hanno ricevuto la dose booster di vaccino (84,5%), 20 hanno riferito di aver contratto l'infezione dopo la vaccinazione (52,6%); l'efficacia della vaccinazione con la dose booster nella prevenzione dell'infezione nella popolazione studiata è stata quindi del 47,4% [Tab. 11].

	BOOSTER EFFETTUATO (%)	BOOSTER NON EFFETTUATO (%)
Infettato	20 (52,6)	5 (71,4)
Non infettato	18 (47,4)	2 (28,6)
Totale	38	7

Tab. 11 Efficacia vaccinale della dose booster confrontata con quella delle sole due dosi.

- Dei 5 pazienti che, non avendo ricevuto la dose booster di vaccino, hanno contratto l'infezione, nessuno ha necessitato di ospedalizzazione né di ossigenoterapia di supporto, e la sintomatologia più riscontrata è stata la rinite (4 pazienti su 5 – 80%), seguita da febbre, astenia e cefalea.
- Anche dei 20 pazienti che, invece, hanno contratto l'infezione dopo aver ricevuto la dose booster, nessuno ha necessitato di ospedalizzazione né di ossigenoterapia di supporto. La

sintomatologia più riscontrata è stata febbre (14 pazienti su 20 – 70%), seguita da rinite e mal di gola (entrambe 4 pazienti – 20%), ed infine da cefalea (2 pazienti – 10%); 2 pazienti su 20 (10%) sono invece risultati asintomatici.

Da questi ultimi due dati si può quindi riconoscere come sia la vaccinazione con due dosi che l'aggiunta di una dose booster, nonostante abbiano mostrato una limitata efficacia nella prevenzione dell'infezione, hanno mostrato efficacia del 100% nella prevenzione di ospedalizzazione e di manifestazione di sintomatologia grave nella popolazione studiata.

Una successiva analisi è stata condotta per indagare la possibile associazione tra l'eziologia dell'epatopatia dei pazienti studiati ed una differenza dell'efficacia vaccinale; a questo scopo sono stati creati due sottogruppi di pazienti [Tab. 12], di cui uno composto da 24 pazienti HBV+ (dei quali 23 positivi esclusivamente ad HBV ed uno positivo sia ad HBV che ad HCV) e l'altro composto da 21 pazienti HCV positivi (dei quali 20 esclusivamente HCV+ ed uno HCV+/HBV+).

PATOLOGIA	BOOSTER EFFETTUATO (%)	BOOSTER NON EFFETTUATO (%)
HBV		
Infettato	11 (55)	3 (75)
Non infettato	9 (45)	1 (25)
HCV		
Infettato	10 (55,5)	2 (66,7)
Non infettato	8 (44,5)	1 (33,3)

Tab. 12 Sottogruppi di pazienti divisi per eziologia virale dell'epatopatia, divisi tra chi ha effettuato la terza dose vaccinale e chi non l'ha ricevuta.

Dato l'esiguo numero di pazienti per sottopopolazione che non ha ricevuto la dose booster, che rende statisticamente irrilevante il dato sui tassi di infezione, è stata indagata l'efficacia del ciclo vaccinale compreso di dose booster.

Del gruppo dei pazienti positivi ad HBV, 20 soggetti hanno effettuato la terza dose di vaccino. Di questi, 11 hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2 successivamente al completamento del ciclo vaccinale; si è così registrata un'efficacia vaccinale del 45%, con 9 pazienti su 20 che non hanno contratto l'infezione dopo le tre dosi.

Dei pazienti positivi ad HCV, 18 hanno effettuato la dose booster. Di questi, 10 hanno riferito di aver contratto l'infezione COVID-19 dopo il completamento del ciclo vaccinale; si è quindi registrata in questa sottopopolazione un'efficacia vaccinale del 44,5%, con 8 pazienti su 18 che non hanno contratto l'infezione dopo le tre dosi.

Andando a confrontare [Fig. 7] questi dati con l'efficacia delle tre dosi vaccinali nel totale della popolazione studiata (47,4%), si nota come tali valori siano quasi sovrapponibili.

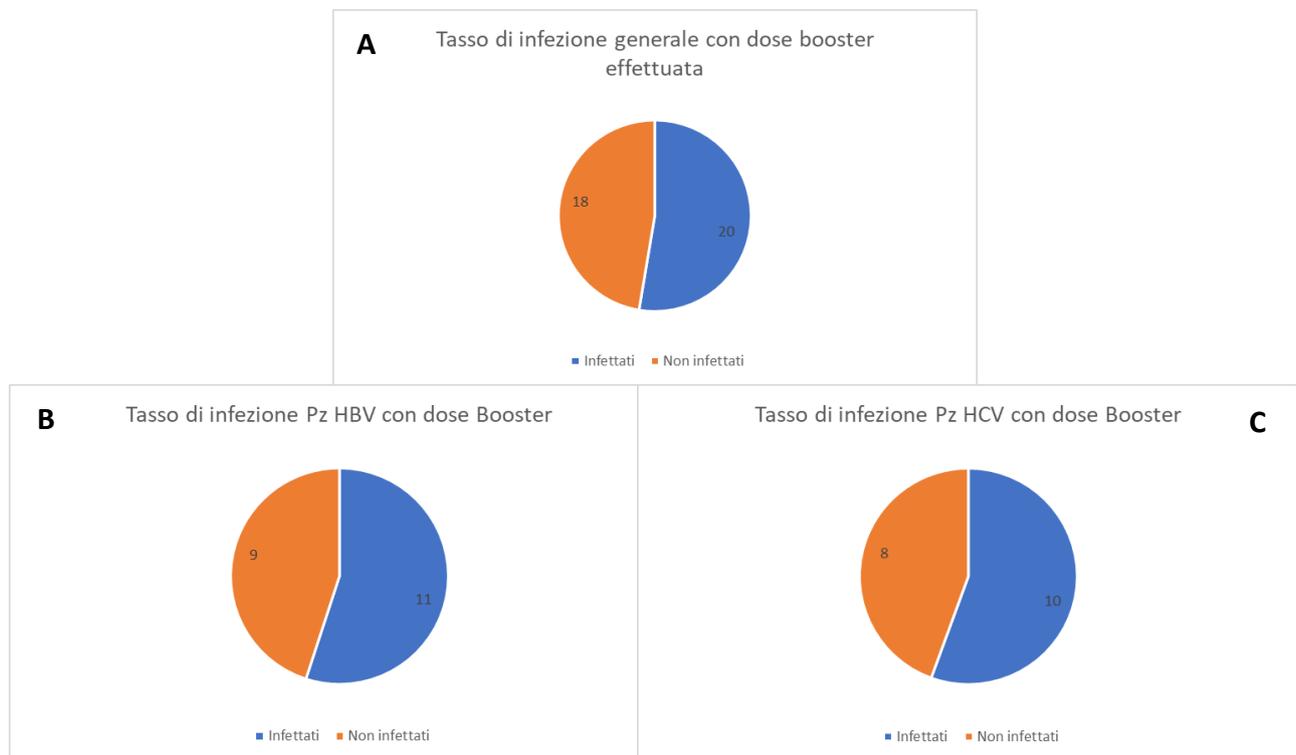


Fig. 7 Confronto tra efficacia vaccinale del ciclo completo di dose booster nella popolazione generale (A), nella sottopopolazione HBV+ (B) e nella sottopopolazione HCV+ (C). In blu i pazienti infettati con SARS-CoV-2 dopo aver ricevuto la dose booster, in arancio i pazienti che non hanno contratto l'infezione.

5.2.3 Analisi dell'impatto delle vaccinazioni sull'epatopatia cronica

Per questa seconda parte del follow-up è stato consultato il sistema informatico Galileo, contenente le informazioni cliniche dei pazienti seguiti in ambulatorio. Da esso sono stati ricavati i dati relativi a tre parametri utili nella valutazione e nel follow-up della patologia epatica cronica:

- o La stiffness epatica valutata tramite elastometria:

è stata presa in considerazione la misurazione antecedente alla prima dose vaccinale più recente, e successivamente confrontata con la misura successiva alla vaccinazione, per valutare se questa ha avuto un impatto sul processo di fibrosi epatica, generalmente valutato tramite questo esame.

Dei 50 pazienti studiati, 15 non avevano eseguito elastometria epatica precedentemente o successivamente alla valutazione, quindi, non avendo a disposizione i due dati per il confronto, sono stati esclusi dall'indagine.

I risultati ottenuti dall'analisi dei valori dei 35 pazienti [Fig. 8] rimasti mostrano un generale abbassamento della stiffness dopo il secondo vaccino, con una media del differenziale tra le due misurazioni pari a -0,89 kPa.

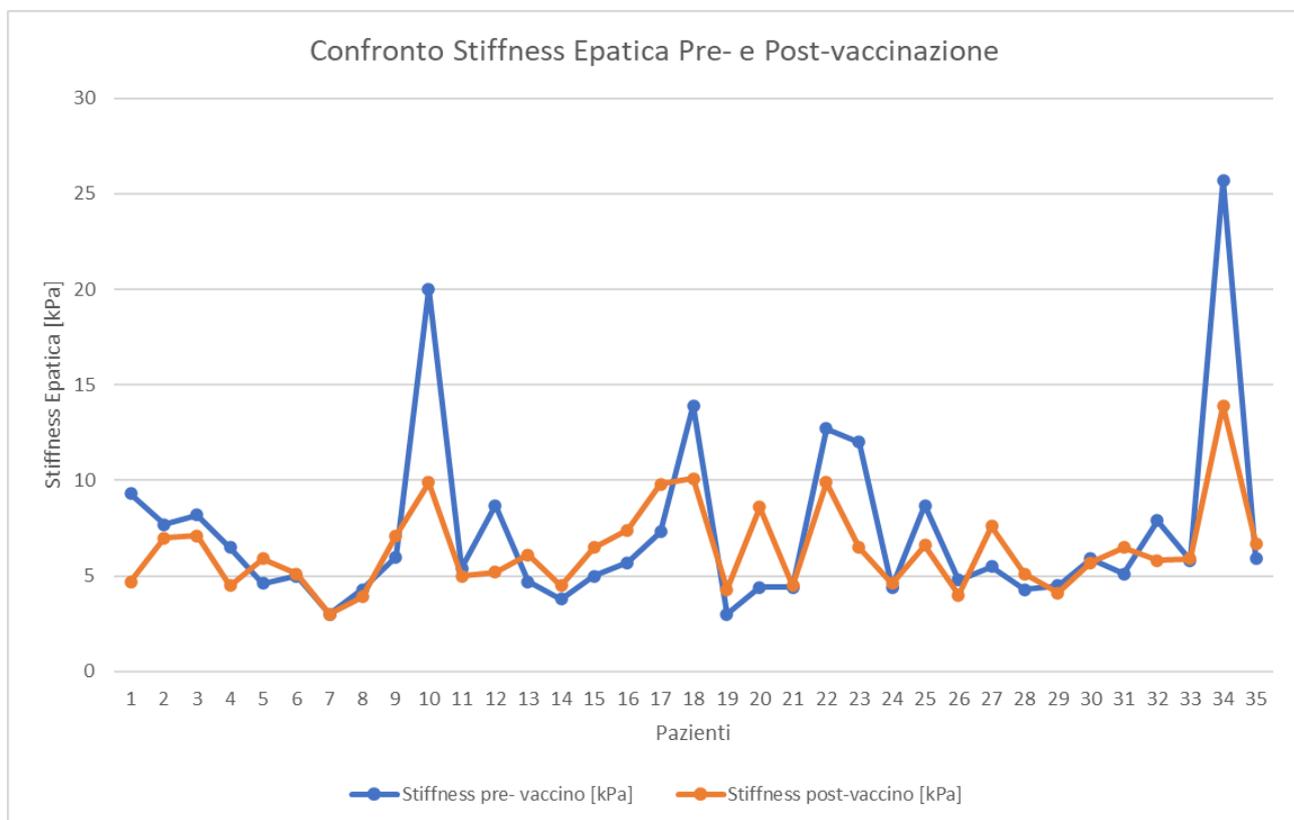


Fig. 8 Valori di Stiffness epatica rilevati nel periodo precedente alla vaccinazione (blu) e nel periodo successivo alla vaccinazione (arancio).

- Gli esami ematochimici con ricerca di valori specifici per il follow-up della patologia epatica: nello specifico, sono stati analizzati gli indici di funzione epatica per valutare un eventuale danno acuto al fegato dato dalla vaccinazione, ed i valori di markers utili per il follow up delle epatopatie ad eziologia virale. In questo specifico caso si guarda all'HBV-DNA ed al HBsAg sierici per i pazienti affetti da epatite B, ed all'HCV-RNA per pazienti affetti da epatite C. Dei 50 pazienti studiati 8 non avevano all'interno della storia clinica degli esami ematochimici post-vaccinazione, e per questo motivo non sono stati presi in esame.

Dei 42 pazienti rimanenti, solamente uno (2,38%) ha registrato un innalzamento degli indici di funzionalità epatica nell'esame svolto dopo il ciclo vaccinale mentre i restanti 41 (97,62%) non hanno registrato variazioni. Il paziente in questione, inoltre, ha svolto gli esami successivi a distanza di 2 anni dalla vaccinazione, ed ha ricevuto in questo periodo una diagnosi di malattia metabolica, che può spiegare l'innalzamento dei valori sierologici di funzionalità epatica.

Per quanto riguarda invece i markers di malattia virale esaminati, dei 42 pazienti studiati 23 sono affetti da epatite B cronica. Analizzando i marker relativi all'epatopatia cronica HBV-correlata e confrontandoli tra i due periodi pre-vaccinazione e post-vaccinazione, si è notato un miglioramento (definito dall'abbassamento di tali valori) in 3 pazienti (13%), mentre 2 pazienti (8,7%) hanno registrato un rialzo. I restanti 18 pazienti (78,3%) non hanno registrato variazioni di tali valori.

Dei 20 pazienti affetti da epatite C, attiva o in remissione, sono stati indagati i valori sierici di HCV RNA nei due momenti pre- e post-vaccinazione; 4 pazienti (20%) hanno mostrato un miglioramento del valore, mentre i restanti 16 (80%) non hanno mostrato variazioni nei livelli di acido nucleico.

Da notare che, dei 42 pazienti totali esaminati in questa parte di indagine, due pazienti presentavano infezione contemporanea di HBV ed HCV e sono quindi stati inseriti in entrambi i gruppi, mentre un paziente non presentava diagnosi di epatite virale ed è quindi stato escluso da questa analisi.

- I referti delle ecografie addominali che esaminano l'aspetto ecografico del fegato:
Del totale di 50 pazienti della coorte padovana presa in esame, 12 pazienti non hanno eseguito un'ecografia addominale nel periodo post-vaccinazione, dunque non potendo disporre dei dati per il confronto, sono stati esclusi dall'analisi.
Dei 38 pazienti così rimasti, 26 (68,4%) non hanno mostrato variazioni nel referto dell'esame ecografico; 6 pazienti (15,8%) invece hanno riscontrato un miglioramento delle caratteristiche ecografiche epatiche, ma i restanti 6 (15,8%) hanno registrato un peggioramento.

Capitolo 6: DISCUSSIONE

6.1: Fase di studio multicentrico

In questo studio sono stati analizzati i livelli di IgG, IgM e la percentuale di anticorpi neutralizzanti contro la variante Wuhan-Hu-1 di SARS-CoV-2 nel siero di pazienti con epatopatia cronica per valutare la risposta alla vaccinazione per COVID-19. Dai risultati si nota come tutti i pazienti abbiano risposto positivamente alla vaccinazione, con incremento di tutti e tre i parametri analizzati sia due settimane dopo la prima dose di vaccino (T1) che due settimane dopo il completamento della vaccinazione con la seconda dose (T2).

Per valutare ulteriormente se ci fossero delle caratteristiche demografiche o cliniche che potessero essere predittive di una maggiore o minore risposta anticorpale alla vaccinazione, sono state compiute delle analisi statistiche stratificando i pazienti con questo criterio e cercando differenze nella risposta anticorpale dei due gruppi così ottenuti.

Si è registrato in questo modo che l'eziologia virale e la terapia antivirale in corso di somministrazione erano predittori indipendenti di una maggiore risposta anticorpale alla vaccinazione per SARS-CoV-2. In linea con questi risultati, un altro studio ha riscontrato che, a 3 mesi dalla seconda dose di vaccino, i livelli di IgG in pazienti affetti da epatite B cronica erano addirittura superiori ai livelli rilevati nei pazienti sani utilizzati come controllo [78]. Nonostante questi riscontri, non è ancora chiara la ragione clinica sottostante alla maggiore risposta anticorpale in pazienti con epatite cronica virale.

Pazienti con diagnosi di Metabolic Related Fatty Liver Disease (MRFLD), terapia metabolica in corso di somministrazione e in presenza di epatocarcinoma sono stati invece predittori di una risposta umorale più limitata. In letteratura si trovano pubblicazioni di studi che descrivono una risposta sub-ottimale alla vaccinazione per COVID-19 in pazienti con patologia neoplastica, a causa della terapia chemioterapica che influisce notevolmente sulla capacità di risposta del paziente [79], ma i dati riguardanti l'epatocarcinoma nello specifico sono scarsi. In letteratura sono presenti dati un po' contrastanti rispetto ai risultati ottenuti in questo studio; sono stati pubblicati infatti alcuni report che identificano la diagnosi di NAFLD come un fattore di rischio indipendente per la forma severa di COVID-19 [80], ma nessuno tra i pazienti arruolati che ha contratto l'infezione ha manifestato sintomatologia grave. Inoltre, altri studi hanno evidenziato una risposta positiva alla vaccinazione in tali pazienti [81], invece dai nostri dati si evince che tale risposta seppur presente sia comunque sub-

ottimale, anche se va specificato che pazienti con MRFLD ed in terapia metabolica in atto sviluppano una risposta anticorpale inferiore nelle nostre analisi univariate ma non nelle analisi multivariate.

Per quanto riguarda invece la severità della patologia epatica, dallo studio è emerso che la presenza di fibrosi F3-F4 o di cirrosi erano associate ad una risposta alla vaccinazione inferiore; la presenza di cirrosi, nello specifico, era associata a questo risultato sia in analisi univariate che in analisi multivariate facendo presupporre che la risposta anticorpale ai vaccini sia stata influenzata negativamente dalla presenza di Cirrhosis Associated Immune Dysfunction (CAID), descritta nel capitolo 1.2.5.

I risultati ottenuti in questo studio, coerentemente con quanto riscontrato in letteratura [82], mostrano come la protezione dalla variante B.1.1.529 (Omicron), ovvero quella prevalente al momento attuale, offerta dalla prima generazione di vaccini sia di breve durata; si è visto infatti che i livelli di IgG verso tale variante fossero inferiori sia a T2 che a T3 rispetto agli anticorpi contro Wuhan-Hu-1; il dato di nota è però il fatto che, ad entrambi i time point, i livelli di IgG verso B.1.1.529 fossero sensibilmente inferiori nei pazienti con epatopatia cronica rispetto ai pazienti sani, suggerendo che la patologia sottostante influisse negativamente sull'efficacia delle vaccinazioni verso questa variante. Questo dato suggerirebbe la necessità sia di somministrare dosi booster alla popolazione generale, sia di creare delle corsie preferenziali per i pazienti con epatopatia cronica, che hanno dimostrato averne più necessità; in alternativa, potrebbe essere giustificabile dare priorità a tali pazienti qualora ci fosse disponibilità di somministrare vaccini di nuova generazione contro le varianti emergenti [83]. Visti i dati ottenuti in questo studio, si ritiene fortemente necessario studiare l'efficacia di questi vaccini di nuova generazione soprattutto nella popolazione con epatopatia cronica di stadio avanzato, la quale ha infatti dimostrato una risposta meno ottimale rispetto alla popolazione generale ai vaccini di prima generazione.

In questo studio non sono state trovate associazioni tra caratteristiche cliniche dei pazienti con epatopatia cronica e tassi di infezione da SARS-CoV-2 al T2, così come non sono state trovate correlazioni con l'efficacia vaccinale al T3. L'unica eccezione riguarda un lieve calo di tale efficacia in pazienti con maggiore altezza e peso (parametri importanti nello studio della farmacocinetica), che induce a pensare alla necessità di studiare una dose vaccinale diversa per questi soggetti.

Dai risultati si evince però che i pazienti con epatopatia cronica hanno una risposta anticorpale maggiore ai due vaccini a mRNA (mRNA-1273 e BNT162b2) rispetto al vaccino ChAdOx-1 (vaccino Astrazeneca a vettore adenovirale), sia a T2 che a T3; nello specifico, confrontando i due vaccini a mRNA è stato rilevato un livello maggiore di anticorpi sia a T2 che a T3 nei pazienti vaccinati con mRNA-1273 rispetto al BNT162b2. Una possibile spiegazione di questo rilievo si può ottenere guardando le rispettive dosi vaccinali: 100µg per due dosi per il vaccino mRNA-1273 mentre 30 µg per due dosi nel secondo [84].

Nonostante questi dati, nella popolazione che ha contratto l'infezione da SARS-CoV-2 nel periodo compreso tra T2 e T3 non sono state trovate associazioni né col tipo di vaccino ricevuto, né con il livello di IgG rilevato al T2; questo suggerisce che le differenze nei livelli di IgG rilevate durante lo studio abbiano poco impatto sull'efficacia complessiva della vaccinazione nel prevenire la l'infezione da SARS-C

Limiti dello studio

Nonostante i dati raccolti, questo studio ha riportato i seguenti limiti e criticità:

- Non sono state prese in esame le ultime varianti di Omicron che stanno acquistando sempre più prevalenza.
- Nonostante la popolazione di pazienti nel suo complesso fosse ampia, le sottopopolazioni associate al vaccino somministrato hanno incluso una quantità limitata di soggetti.
- Sebbene siano state analizzate diverse caratteristiche cliniche, numerosi altri fattori esterni potenzialmente potrebbero aver avuto un impatto sulla risposta immunitaria, tra cui il profilo funzionale delle IgG e l'immunità cellulo-mediata.

Prospettive future

Dati i risultati ottenuti in questo studio, si ritiene possa rivelarsi utile l'analisi delle modalità con cui l'epatite virale, la MRFLD e la terapia antivirale vadano ad impattare l'immunogenicità della vaccinazione verso COVID-19.

Si ritiene inoltre opportuno, sia sulla base dei risultati ottenuti in questo studio che sulla base di dati ricavati dalla letteratura, creare dei canali preferenziali per i pazienti affetti da patologia epatica cronica in stadio avanzato perché possano ricevere in tempi utili dosi booster delle vaccinazioni oppure perché possano ricevere vaccini appartenenti alle nuove generazioni, adattati per creare immunità verso le nuove varianti prevalenti.

6.2: Fase di follow-up della coorte di Padova

La prima parte dello studio ha valutato l'efficacia dei vaccini per SARS-CoV-2 nella popolazione studiata, ovvero i pazienti epatopatici arruolati per lo studio multicentrico dall'Ambulatorio Epatiti dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Essendo il periodo preso in esame corrispondente al picco di diffusione della variante Omicron in Italia, sono stati cercati dati in letteratura relativi all'efficacia delle vaccinazioni contro questa variante per impostare un confronto [82].

I risultati ottenuti in questo studio mostrano una bassa efficacia (29%) della doppia dose vaccinale nel prevenire l'insorgenza dell'infezione nel lungo termine, dato sensibilmente inferiore rispetto a quello riscontrato in letteratura (55,9%).

Analizzando invece i pazienti che hanno ricevuto una dose booster di vaccino è emerso che l'efficacia vaccinale aumenta al 47,4%; questo dato rimane significativamente inferiore a quelli visti in letteratura, dove l'efficacia della dose booster nel contrastare l'infezione della variante Omicron è stimata all'80,8% [82].

Per ricercare un'eventuale associazione tra eziologia della patologia epatica ed efficacia vaccinale, il campione di 45 pazienti è stato diviso in due sottopopolazioni caratterizzate una dalla positività ad HBV e l'altra dalla positività ad HCV. Queste sottopopolazioni sono poi state divise a loro volta in base all'assunzione o meno della dose booster di vaccino; tra i pazienti dei due gruppi HBV+ ed HCV+ che avevano ricevuto la dose booster di vaccino e si è ricercato il tasso di infezione da SARS-CoV-2, trovando un valore di 55% e 55,5%, rispettivamente. Tale valore risulta essere quasi sovrapponibile a quello trovato nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto la dose booster nella popolazione totale (52,6%), suggerendo che non ci sia associazione tra eziologia della patologia epatica sottostante ed efficacia vaccinale della dose booster nel prevenire l'infezione COVID-19. I tassi di infezione riscontrati per le parti di sottopopolazioni che non hanno ricevuto la dose booster sono sensibilmente più elevati di quelli registrati tra chi l'ha ricevuta, ma la ristretta numerosità campionaria (4 pazienti tra gli HBV+, 3 pazienti tra gli HCV+) rende statisticamente irrilevante qualsiasi analisi compiuta su di essi.

Nonostante i risultati di questo studio siano condizionati da un campione limitato di pazienti, ciò che rimane in linea con quanto riscontrato in letteratura è l'innalzamento dell'efficacia vaccinale in seguito all'introduzione di una dose booster nel piano vaccinale; questo fa presupporre che per mantenere un livello di immunità desiderabile nei confronti delle nuove varianti servano periodiche dosi booster dei vaccini di prima generazione, oppure lo sviluppo di nuovi farmaci che siano specifici

per le varianti virali più recenti. Sono comunque necessari ulteriori analisi sull'efficacia vaccinale a lungo termine dopo la somministrazione di altre dosi booster, per valutare la necessità di impostare un piano vaccinale periodico nella popolazione generale.

Analizzando invece l'efficacia vaccinale nella prevenzione della comparsa di sintomatologia grave associata all'infezione da SARS-CoV-2, si nota come nessuno dei pazienti arruolati che ha contratto l'infezione ha dichiarato necessità di ospedalizzazione o di supporto di ossigeno durante la malattia, dimostrando come la vaccinazione abbia offerto un tasso di protezione del 100% da questo punto di vista nella popolazione studiata. Questo dato, seppur non possa essere preso come statisticamente rilevante a causa della scarsa numerosità campionaria, rimane in linea con quanto indicato dall'Istituto Superiore di Sanità sul rischio di malattia grave da COVID-19 nella popolazione vaccinata [85].

La seconda parte del follow-up, riguardante la coorte di Padova, ha previsto la consultazione del sistema informatico E-Health, per la ricerca all'interno della cartella clinica elettronica dei pazienti, di dati clinici riguardanti la progressione della patologia epatica nel periodo di intercorso tra prima della vaccinazione e la fine dell'iter vaccinale.

Un primo dato preso in analisi è stata la stiffness epatica, valutata tramite elastometria; i risultati ottenuti hanno indicato una generale diminuzione del valore di stiffness successivamente al completamento del ciclo vaccinale. Nonostante si tratti di un dato abbastanza significativo, non è possibile associare la vaccinazione al miglioramento di tale valore, in quanto ci sono molti fattori che possono aver avuto un'influenza sullo stato fibrotico del fegato dei pazienti, che però non sono stati analizzati in questo follow up; ciononostante, si può comunque intuire che la vaccinazione non ha avuto un impatto negativo sullo stadio di fibrosi dei pazienti di questo studio. In letteratura i dati sull'impatto della vaccinazione nella fibrosi epatica sono scarsi, tuttavia uno studio pubblicato in Giappone [86] dimostra che le vaccinazioni offrono ottimi profili di sicurezza nei pazienti epatopatici cronici, in linea con quanto trovato in questo studio.

Il secondo dato analizzato riguardava i valori ematochimici rilevati nei pazienti nei periodi pre- e post- vaccinazione; in questo contesto è stata notata una generale sicurezza riguardo al danno epatico acuto potenzialmente causato dalla vaccinazione, in quanto sono stati riscontrati innalzamenti dei marcatori di danno epatico solamente in un paziente dei 42 studiati, e tale reperto poteva essere spiegato da altre condizioni patologiche concomitanti. Analogamente, i dati rilevati

indagando i livelli dei marcatori specifici di patologia virale epatica mostrano come la forte maggioranza dei pazienti non presenta variazioni dei valori studiati; per l'epatite cronica HBV-correlata si è visto un rialzo dei marcatori di patologia (HBV-DNA e HBsAg sierici) in solamente 2 pazienti, mentre 3 pazienti hanno visto un miglioramento dei valori; per quanto riguarda l'epatite HCV-correlata, invece, non è stato visto un peggioramento in nessuno dei pazienti studiati, ed i pazienti che hanno mostrato miglioramento dei valori (HCV-RNA sierico) erano pazienti con infezione attiva in corso di trattamento antivirale.

Infine, sono stati analizzati i referti delle ecografie addominali effettuate nel periodo precedente ed in quello successivo alla vaccinazione, per valutare anche eventuali variazioni nella presentazione ecografica del fegato. In questo caso i referti hanno mostrato un miglioramento delle condizioni ecografiche in sei pazienti, esattamente quanti hanno invece riscontrato un peggioramento; la maggioranza del campione, comunque, non ha registrato variazioni; si ritiene dunque ipotizzabile che la vaccinazione non abbia avuto alcun tipo di impatto sul dato ecografico dei pazienti presi in esame.

Sia quest'ultimo dato sui referti ecografici che quello relativo ai valori ematochimici suggeriscono che la vaccinazione non ha influito significativamente sulla clinica della patologia epatica dei pazienti studiati; tale risultato, pur condizionato da una numerosità campionaria ristretta, è comunque in linea con quanto presente in letteratura riguardo alla sicurezza dei vaccini nei pazienti epatopatici [86].

Limiti dello studio

Oltre alle criticità esplicitate negli altri paragrafi, per quanto riguarda il follow-up eseguito sui pazienti della coorte di Padova i principali limiti rilevati sono stati:

- Il carattere retrospettivo dello studio ha impedito di seguire approfonditamente i pazienti e di ottenere tutti i dati necessari, per cui molte analisi non hanno potuto essere svolte sulla totalità della coorte per mancanza di dati clinici.
- I dati analizzati hanno permesso di dare un inquadramento generale della storia clinica della patologia epatica dei pazienti pur tenendo conto che ci potrebbero essere stati fattori concomitanti che possono aver influito sui risultati dello studio ma che non sono stati presi in esame in questa tesi.

Prospettive future

I risultati ottenuti hanno confermato quanto ritrovato in letteratura riguardo la sicurezza dei vaccini nella popolazione epatopatica, nonostante la coorte di pazienti poco numerosa, dunque si ritiene opportuno mantenere la campagna di vaccinazione attiva per i pazienti epatopatici, monitorando eventuali effetti indesiderati sia sulle condizioni generali dei pazienti che sulla patologia epatica stessa.

Capitolo 7: CONCLUSIONE

In conclusione, lo studio multicentrico descritto nella prima parte di questa tesi ha riscontrato, in un campione relativamente ampio e ben caratterizzato di pazienti affetti da epatopatia cronica, che l'efficacia della vaccinazione sembra essere compromessa in pazienti con stato più avanzato di malattia epatica.

Nello specifico, lo stato di fibrosi avanzata (F3 - F4 METAVIR) e la diagnosi di cirrosi epatica correlano con una minore risposta immunologica alla vaccinazione.

Per quanto riguarda la sicurezza delle vaccinazioni, nessun effetto collaterale maggiore è stato riportato nella coorte di pazienti presa in esame; dunque, non sono state ritrovate associazioni tra la presenza di epatopatia cronica e la sicurezza dei vaccini.

Questo ultimo dato è stato confermato anche nella seconda parte del lavoro, riguardante la coorte di pazienti padovana, che ha ulteriormente mostrato sia come le vaccinazioni non abbiano avuto un impatto sensibile sulla storia naturale della patologia epatica cronica.

È stato inoltre rilevato, pur con un campione ristretto di persone, un sensibile calo dell'efficacia del ciclo vaccinale contro le nuove varianti di SARS-CoV-2 prevalenti, suggerendo la necessità di implementare il ciclo vaccinale con ulteriori dosi booster al fine di garantire un livello desiderabile di immunità adattativa, oppure di sviluppare nuove formulazioni che possano offrire una protezione più elevata contro le ultime varianti emerse rispetto ai vaccini di prima generazione, sviluppati per contrastare la variante originale denominata Wuhan-Hu-1.

BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://lab24.ilsole24ore.com/storia-coronavirus/>
- [2] statistichecoronavirus.it
- [3] Cui J, Li F, Shi ZL. (2018). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 17. 10.1038/s41579-018-0118-9.
- [4] Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 85. 104502. 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- [5] Abdelrahman Z, Li M, Wang X. (2020). Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses.
- [6] Tsang H, Chan L, Cho W et al. (2020). An Update on COVID-19 Pandemic: The Epidemiology, Pathogenesis, Prevention and Treatment Strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 19. 10.1080/14787210.2021.1863146.
- [7] Kim KD, Hwang I, Ku KB, Lee S, Kim SJ, Kim C. (2020). Progress and Challenges in the Development of COVID-19 Vaccines and Current Understanding of SARS-CoV-2- Specific Immune Responses. *Journal of microbiology and biotechnology*. 30. 10.4014/jmb.2006.06006.
- [8] Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha M. (2021). COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*. 49. 10.1007/s15010-020-01516-2.
- [9] Yang N, Wang C, Huang J, Dong J, et al. Clinical and Pulmonary CT Characteristics of Patients Infected With the SARS-CoV-2 Omicron Variant Compared With Those of Patients Infected With the Alpha Viral Strain. *Front Public Health*. 2022 Jul 12;10:931480
- [10] Elrobaa I, New K. (2021). COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. *Frontiers in Public Health*. 9. 711616. 10.3389/fpubh.2021.711616.
- [11] Omar A, Kaddoura R, Orabi B, Hanoura S. (2021). Impact of COVID-19 pandemic on liver, liver diseases, and liver transplantation programs in intensive care units. *World Journal of Hepatology*. 13. 1215-1233. 10.4254/wjh.v13.i10.1215.
- [12] Zhong P, Xu J, Yang D, Shen Y, Wang L et al. (2020). COVID-19-associated gastrointestinal and liver injury: clinical features and potential mechanisms. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 5. 256. 10.1038/s41392-020-00373-7.
- [13] Bhalala U, Gist K, Tripathi S, Boman K, Kumar V et al. (2021). Characterization and Outcomes of Hospitalized Children With Coronavirus Disease 2019 A Report From a Multicenter, *Viral Infection*

and Respiratory Illness Universal Study (Coronavirus Disease 2019) Registry. *Critical Care Medicine*. 50. 40-51.

[14] Dhama K, Nainu F, Frediansyah A, Yattoo Dr. M, Mohapatra R, Chakraborty S et al. (2023). Global Emerging Omicron Variant of SARS-CoV-2: Impacts, Challenges and Strategies. *Journal of Infection and Public Health*. 16. 10.1016/j.jiph.2022.11.024.

[15] Sharma A, Balda S, Apreja M, & Kataria K, Capalash N, Sharma P. (2021). COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 193. 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016.

[16] Fernandes Q, Inchakalody V, Merhi M, Mestiri S, Taib N, Moustafa D et al. (2022). Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Annals of Medicine*. 54. 524-540. 10.1080/07853890.2022.2031274.

[17] Sun B, Feng Y, Mo X, Zheng P, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):940-948

[18] Fathizadeh H, Afshar S, Masoudi M, Gholizadeh P, Asgharzadeh M, et al. (2021). SARS-CoV-2 (Covid-19) vaccines structure, mechanisms and effectiveness: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 188. 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.076.

[19] <https://www.governo.it/it/cscovid19/report-vaccini/>

[20] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al; COVE Study Group. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 2021 Feb 4;384(5):403-416

[21] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 31;383(27):2603-2615

[22] Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021 Jan 9;397(10269):99-111.

[23] Patel R, Kaki M, Potluri VS, Kahar P, Khanna D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum Vaccin Immunother*. 2022 Dec 31;18(1):2002083

[24] Nascimento IP, Leite LC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Dec;45(12):1102-11

[25] Parums DV. Editorial: First Approval of the Protein-Based Adjuvanted Nuvaxovid (NVX-CoV2373) Novavax Vaccine for SARS-CoV-2 Could Increase Vaccine Uptake and Provide Immune Protection from Viral Variants. *Med Sci Monit*. 2022 Mar 1;28:e936523

- [26] Yuan, Yongliang & Jiao, Baihai & Qu, Lili & Yang, Duomeng & Liu, Ruijuan. (2023). The development of COVID-19 treatment. *Frontiers in Immunology*. 14. 1125246. 10.3389/fimmu.2023.1125246.
- [27] Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, et al. Early remdesivir to prevent progression to severe covid-19 in outpatients. *N Engl J Med* (2022)
- [28] Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, et al; ACTT-2 Study Group Members. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Mar 4;384(9):795-807
- [29] Udwadia ZF, Singh P, Barkate H, et al. Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *Int J Infect Dis*. 2021 Feb;103:62-71.
- [30] Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7;382(19):1787-1799
- [31] RECOVERY Collaborative Group. Lopinavir-ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2020 Oct 24;396(10259):1345-1352
- [32] Hung IF, Lung KC, Tso EY, Liu R, Chung TW, Chu MY, et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* (2020)
- [33] Ren Z, Luo H, Yu Z, Song J, Liang L, Wang L, et al. A randomized, open-label, controlled clinical trial of azvudine tablets in the treatment of mild and common COVID19, a pilot study. *Adv Sci (Weinh)* (2020)
- [34] Rejdak K, Grieb P. Adamantanes might be protective from COVID-19 in patients with neurological diseases: multiple sclerosis, parkinsonism and cognitive impairment. *Mult Scler Relat Disord*. 2020 Jul;42:102163
- [35] Nakhband A, Fakhari A, Azizi H. Interferon-alpha position in combating with COVID-19: A systematic review. *J Med Virol* (2021)
- [36] Marconato M, Abela IA, Hauser A, et al. Antibodies from convalescent plasma promote SARS-CoV-2 clearance in individuals with and without endogenous antibody response. *J Clin Invest*. 2022 Jun 15;132(12):e158190
- [37] Alemany A, Millat-Martinez P, Corbacho-Monné M, et al; CONV-ERT Group. High-titre methylene blue-treated convalescent plasma as an early treatment for outpatients with COVID-19: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2022 Mar;10(3):278-288

- [38] Sullivan DJ, Gebo KA, Shoham S, et al. Early Outpatient Treatment for Covid-19 with Convalescent Plasma. *N Engl J Med*. 2022 May 5;386(18):1700-1711
- [39] RECOVERY Collaborative Group. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021 May 29;397(10289):2049-2059
- [40] Wang Q, Guo Y, Iketani S, Nair MS, Li Z, Mohri H, et al. Antibody evasion by SARS-CoV-2 omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature* (2022)
- [41] Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 20. 7312-7324. 10.3748/wjg.v20.i23.7312.
- [42] Ganne N. (2017). Epidemiology of liver cirrhosis. *La Revue du praticien*. 67. 726-730.
- [43] Liu YB, Chen MK. (2022). Epidemiology of liver cirrhosis and associated complications: Current knowledge and future directions. *World Journal of Gastroenterology*. 28. 5910-5930. 10.3748/wjg.v28.i41.5910.
- [44] Principles of Internal Medicine, Harrison et al. 20th ed
- [45] Smith A, Baumgartner K, Bositis C. (2019). Cirrhosis: Diagnosis and Management. *American family physician*. 100. 759-770.
- [46] Peng Y, Qi X, Guo X. (2016). Child–Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis. *Medicine*. 95. e2877. 10.1097/MD.0000000000002877.
- [47] Tsois A, Marlar CA. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. *StatPearls Publ*. (2021)
- [48] Ruf A, Dirchwolf M, Freeman RB, From Child-Pugh to MELD score and beyond: Taking a walk down memory lane, *Annals of Hepatology* (2022)
- [49] Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *Journal of Hepatology*. 61. 10.1016/j.jhep.2014.08.010.
- [50] Hasa E, Hartmann P, Schnabl B. (2022). Liver cirrhosis and immune dysfunction. *International Immunology*. 34. 10.1093/intimm/dxac030.
- [51] Marjot T, Webb G, et al. (2021). COVID-19 and liver disease: mechanistic and clinical perspectives. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 18. 10.1038/s41575-021-00426-4.
- [52] Marjot, T. et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: an international registry study. *J. Hepatol*. 74, 567–577 (2020).
- [53] Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970 Apr 4;1(7649):695-8

- [54] Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 2020 Oct;182:104925.
- [55] Tripathi N, Mousa OY. Hepatitis B. *StatPearls Publ.* (2023)
- [56] Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. *Clin Liver Dis.* 2016 Nov;20(4):607-628.
- [57] Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. *Clin Liver Dis.* 2016 Nov;20(4):607-628.
- [58] Sagnelli E, Sagnelli C, Pisaturo M, Macera M, Coppola N. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 28;20(24):7635-43
- [59] Wilkins T, Sams R, Carpenter M. Hepatitis B: Screening, Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Am Fam Physician.* 2019 Mar 1;99(5):314-323
- [60] Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *QJM.* 2012 Feb;105(2):109-13.
- [61] Guvenir M, Arikan A. Hepatitis B Virus: From Diagnosis to Treatment. *Pol J Microbiol.* 2020 Dec;69(4):391-399.
- [62] Pattyn J, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis B Vaccines. *J Infect Dis.* 2021 Sep 30;224(12 Suppl 2):S343-S351
- [63] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>
- [64] Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 21;20(43):15992-6013
- [65] Thimme R, Binder M, Bartenschlager R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 May;36(3):663-83
- [66] Lombardi A, Mondelli MU; ESCMID Study Group for Viral Hepatitis (ESGVH). Hepatitis C: Is eradication possible? *Liver Int.* 2019 Mar;39(3):416-426
- [67] Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):9633-52
- [68] Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015 Dec;44(4):717-34

- [69] Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician*. 2015 Jun 15;91(12):835-42
- [70] Martinez MA, Franco S. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. *Viruses*. 2020 Dec 29;13(1):41
- [71] Abu-Freha N, Mathew Jacob B, Elhoashla A, et al. Chronic hepatitis C: Diagnosis and treatment made easy. *Eur J Gen Pract*. 2022 Dec;28(1):102-108
- [72] Grebely J, Prins M, Hellard M, et al; International Collaboration of Incident HIV and Hepatitis C in Injecting Cohorts (InC3). Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis*. 2012 May;12(5):408-14
- [73] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002 May;122(6):1649-57.
- [74] Karanjia RN, Crossey MM, Cox IJ, et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 7;22(45):9880-9897.
- [75] Pouwels S, Sakran N, Graham Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr Disord*. 2022 Mar 14;22(1):63
- [76] Carr RM, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2016 Dec;45(4):639-652
- [77] Müller L, Andrée M, Moskorz W, et al. Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 6;73(11):2065-2072.
- [78] He T, Zhou Y, Xu P, Ling N, et al. Safety and antibody response to inactivated COVID-19 vaccine in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int*. 2022 Jun;42(6):1287-1296.
- [79] Fendler A, de Vries EGE, GeurtsvanKessel CH, et al. COVID-19 vaccines in patients with cancer: immunogenicity, efficacy and safety. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Jun;19(6):385-401
- [80] Zhou YJ, Zheng KI, Wang XB, et al. Younger patients with MAFLD are at increased risk of severe COVID-19 illness: A multicenter preliminary analysis. *J Hepatol*. 2020 Sep;73(3):719-721
- [81] Wang J, Hou Z, Liu J, et al. Safety and immunogenicity of COVID-19 vaccination in patients with non-alcoholic fatty liver disease (CHESS2101): A multicenter study. *J Hepatol*. 2021 Aug;75(2):439-441.
- [82] Zeng B, Gao L, Zhou Q, Yu K, Sun F. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2022 May 23;20(1):200

- [83] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#adapted-covid-19-vaccines-section>
- [84] Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med*. 2020 Dec 17;383(25):2439-2450
- [85] <https://www.iss.it/covid-19-efficacia-vaccinale> - Impatto della vaccinazione e della pregressa diagnosi sul rischio di malattia grave 02/01/2023 – 05/02/2023
- [86] Ozaka S, Kobayashi T, Mizukami K, Murakami K. COVID-19 vaccination and liver disease. *World J Gastroenterol*. 2022 Dec 28;28(48):6791-6810
- [87] Simão AL, Palma CS, Izquierdo-Sanchez L, Zanaga P, Spagnolo E, Russo FP, Castro RE. Cirrhosis is associated with lower serological responses to COVID-19 vaccines in patients with chronic liver disease. *JHEP Rep*. 2023 May;5(5):100697