

EsauriT

Immunoesaurimento in soggetti asintomatici o paucisintomatici con positività protratta per SARS-COV2: uno studio esplorativo

Responsabili Scientifici

Dott. Guido Chichino

SC Malattie Infettive

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Dott. Marco Mussa

SC Malattie Infettive

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Dott.ssa Federica Grosso

SSD Mesotelioma

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Principal Investigator

Dott. Marco Mussa

SC Malattie Infettive

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Co-Investigators

Dr.ssa Maria Matilde Ciriello

Citofluorimetria SC Laboratorio Analisi

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Dr. Roberto Guaschino

SC Laboratorio Analisi e SC Medicina Trasfusionale

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Dr. Andrea Rocchetti

SC Microbiologia

Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Promotore	Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria – SC Malattie Infettive
Autori	Dott. Marco Mussa SC Malattie Infettive Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria Dott.ssa Federica Grosso SSD Mesotelioma Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria
Data Management	Clinical Trial Center Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria
Coordinatore	Dott. Antonio Maconi Responsabile Infrastruttura Ricerca Formazione Innovazione Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria

SINOSI	
Titolo dello studio	Immunoesaurimento in soggetti asintomatici o paucisintomatici con positività protratta per SARS-COV2: uno studio esplorativo (EsauriT)
Promotore	A.O. S.S. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Alessandria – SC Malattie Infettive
Versione e data del protocollo	Versione 1.0 del 20.05.2020
Background e razionale	<p>L'immunoesaurimento è una disfunzione delle cellule T tipica delle infezioni virali croniche e del cancro, dove il programma di differenziazione T cellulare è profondamente alterato. Il fenomeno si manifesta con una scarsa risposta T cellulare, con l'espressione di recettori ad attività inibitoria sui checkpoints immunitari ed alterazioni dei normali pathways di trascrizione cellulare dei Linfociti T. Ne risulta un'incapacità della cellula T di contrastare efficacemente le infezioni virali croniche ed il cancro.</p> <p>La stimolazione antigenica cronica e diverse citochine modulano l'espressione di alcuni recettori di membrana, ad esempio PD1, e mediatori prodotti dalle cellule T, portando alla produzione di infociti T "esauriti".</p> <p>Numerosi studi hanno descritto il profilo linfocitario e i livelli di citochine in pazienti con quadri moderati/severi di SARS-COV2, ma, a nostra conoscenza nessuno studio ha affrontato questo tema nei pazienti paucisintomatici o asintomatici, spesso diagnosticati solo per aver avuto contatti diretti con pazienti COVID19. Tra i pazienti paucisintomatici e asintomatici sono stati osservati casi di positività al test molecolare protrattata ben oltre le 2-4 settimane previste come periodo di quarantena. Proprio questa condizione farebbe supporre uno stato di esaurimento funzionale delle cellule immunitarie che consentirebbe la persistenza virale pur senza l'instaurarsi di sintomi clinici severi.</p> <p>→Scopo di questo studio esplorativo è quindi analizzare e descrivere il profilo delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue periferico, il loro stato di attivazione, l'espressione dei recettori dei checkpoint inibitori. Contemporaneamente verrà effettuato il dosaggio delle citochine maggiormente coinvolte nella risposta virale (IL6 e TNF) e il dosaggio delle immunoglobuline IgG neutralizzanti anti SARS-COV2.</p>
Obiettivi	<p>Obiettivo Primario: descrivere il profilo delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue periferico, il loro stato di attivazione, l'espressione dei recettori dei checkpoint inibitori in pazienti asintomatici o paucisintomatici con RT-PCR per SARS COV2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico).</p> <p>Obiettivo secondario: descrivere il profilo citochinico e anticorpale in pazienti asintomatici o paucisintomatici con PCR per SARS COV 2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico).</p>
Disegno dello studio	Osservazionale, monocentrico, prospettico
Popolazione in studio	<p>Criteri di Inclusione</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacità di esprimere consenso informato. • Pazienti paucisintomatici/asintomatici con RT-PCR per SARS-COV2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla

	<p>scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Età >18 anni e <65 anni • Assenza di patologie autoimmuni • Assenza di copatologie neoplastiche (oncoematologiche) • Assenza di malattie infettive croniche (HIV,epatiti, CMV, tubercolosi) • Non in terapia farmacologica • Charlson comorbidities Index =0 per patologia o <2 se patologia=0 e età=2 . <p>Criteri di Esclusione</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paziente legalmente incapace di prestare il consenso • Paziente o legale rappresentante che nega il consenso. • Gravidanza • La presenza di una qualsiasi comorbilità • Body mass index >=30, sindrome metabolica. • Diabete in terapia dietetica, alterata glicemia a digiuno • Qualsiasi patologia autoimmune, oncoematologica, infettive croniche, neurodegenerative a avere avuto un tumore in qualsiasi fase della vita eccetto basalioma, melanoma in situ e tumore in situ della cervice.
Numerosità del campione	10 pazienti consecutivi che rispondano ai criteri di inclusione
Piano per la raccolta dei dati	I pazienti eleggibili e i loro dati clinici saranno raccolti in forma anonimizzata in un database su piattaforma Redcap® (v9.1.0; Vanderbilt University) dalla Infrastruttura Ricerca Formazione Innovazione - A.O. di Alessandria.

Sommario

Background e Razionale.....	7
Obiettivi.....	9
• Obiettivo primario	9
• Obiettivo secondario	9
Disegno dello studio.....	9
• Popolazione in studio	9
Contesto clinico e riferimenti temporali	9
Metodologia.....	10
• Tipologia di studio	10
• Criteri di Inclusione.....	10
• Criteri di Esclusione	10
Fonte dei dati	10
Endpoint.....	10
Variabili raccolte	11
• Variabili demografiche/fisiologiche.....	11
• Manifestazioni cliniche COVID19.....	11
• Variabili virologiche	11
• Variabili immunologiche	11
• Esami ematici.....	11
Procedure Effettuate.....	12
Metodi di analisi statistica	12
Strumenti di raccolta dati.....	12
Copertura assicurativa	12
Informazione sulla ricerca ai soggetti partecipanti e consenso informato	12
Proprietà dei dati e trasparenza dei risultati	13
Requisiti etici e aspetti legali.....	13
Costi	13
Bibliografia	14
ANNESSO I:.....	16

Background e Razionale

L'immunosaurimento è una disfunzione delle cellule T tipica delle infezioni virali croniche e del cancro. Durante le infezioni acute le cellule T naive attivate si differenziano in T effettrici nell'arco di 1-2 settimane. Questa differenziazione si accompagna ad importanti fenomeni di proliferazione cellulare, riprogrammazione trascrizionale e metabolica. Una volta superato il picco di espansione delle cellule effettrici ed eliminata la stimolazione antigenica, la maggior parte delle cellule T muore e una piccola percentuale persiste trasformandosi in una cellula della memoria. Il successivo mantenimento di una popolazione di queste cellule è regolato dall'IL7 e dall'IL-15. La trasformazione delle cellule T in cellule della memoria può avvenire solo quando la stimolazione antigenica si è esaurita [1].

Nelle infezioni croniche e nel cancro, in cui la stimolazione antigenica non si esaurisce, il programma di differenziazione T cellulare è profondamente alterato: le cellule si trovano in uno stato di differenziazione definito "immunosaurimento". Il fenomeno si manifesta con una scarsa risposta T cellulare, con l'espressione di recettori ad attività inibitoria sui checkpoints immunitari ed alterazioni dei normali pathways di trascrizione cellulare dei Linfociti T. Ne risulta un'incapacità della cellula T di contrastare efficacemente le infezioni virali croniche ed il cancro [2].

Molteplici fattori sono legati all'immunosaurimento delle cellule T e alla sua severità, questi includono la durata e la magnitudine della stimolazione antigenica, la presenza di attivazione da parte dei CD4 sulle cellule CD8, la presenza di citochine stimolatrici o soppressive e l'espressione di alcuni tipi di recettori (checkpoint immunitari) [2].

In particolare se sottoposte a uno stimolo antigenico intenso e duraturo (>2-4 settimane) le alterazioni funzionali possono diventare irreversibili [3].

La stimolazione antigenica cronica induce l'espressione di PD1 attraverso l'attivazione di NFATc1. PD1 sembrerebbe regolare il segnale del recettore del linfocita T (TCR) fungendo da elemento di controregolazione nell'iperattivazione del TCR [4].

L'espressione di PD1 viene upregolata rapidamente in tutti i linfociti attivati, ma quantitativamente la sua espressione è maggiore nelle cellule in immunosaurimento [5] La sola espressione di PD1 non è comunque sufficiente per definire l'immunosaurimento [6].

Altri recettori espressi possono essere *the lymphocyte activation gene 3 protein* (LAG3), 2B4 (ovvero il CD244), CD160, T cell immunoglobulin domain e il mucin domain-containing protein 3 (TIM3) e CTLA4.

Il numero di recettori co-espresso è proporzionale alla gravità dell'immunosaurimento mentre la singola espressione di un recettore non indica immunosaurimento [2].

Tra le citochine e i mediatori solubili, partecipano sia molecole anti-infiammatorie come la IL-10 e il TGF-beta che proinfiammatorie come IFN-γ.

In uno studio cinese pubblicato su *Cellular & Molecular Immunology*, l'esaurimento funzionale delle cellule NK e dei Linfociti citotossici (CTL) CD8+ nei pz con COVID-19 correlava con l'aumentata espressione di NKG2A e l'inverso si osservava al recupero funzionale dopo la malattia. Questo recettore inibitorio era già noto correlare con l'esaurimento

immunitario nelle infezioni virali croniche e la sua iperespressione nei pz COVID-19 provoca una ridotta produzione di alcune citochine intracellulari delle cellule NK e nei CTLs come CD107a, interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, granzyme B, e tumor necrosis factor (TNF)- α . Sono stati descritti anche fenomeni apoptotici a carico dei linfociti T [7].

Il fenomeno è sequenziale e porta alla progressiva comparsa di alterazioni fenotipiche e funzionali. Le cellule in esaurimento esprimono molecole inibitorie e differenti pattern di recettori delle citochine, molecole effettrici e fattori di trascrizione che le rendono differenziabili dalle altre. In successione, la produzione di IL2 è solitamente la prima a ridursi e scomparire, segue il TNF-alfa, quindi l'IFN-Y che sembrerebbe l'ultimo ad essere soppresso. Le complesse modificazioni che coinvolgono la cellula sono descritte in Fig.1.

Dal punto di vista evolutivo questo meccanismo apparentemente suicidario trova la sua ragion d'essere nella riduzione del danno tissutale nelle infezioni virali croniche (virus herpetici, epatite C e B cronica) [2].

Recentemente un gruppo cinese ha pubblicato uno studio retrospettivo su 522 pazienti [8] mostrando che i pazienti con infezione da SARS-COV2 severa presentavano una conta di linfociti CD4 e CD8 più bassa rispetto ai paziente con quadri attenuati. I dati mostrano che la conta linfocitaria è inversamente correlata ai livelli di TNF-alfa, IL-6 e IL10. Inoltre in 3 pazienti è stata analizzata l'espressione di PD1 e TIM3 nelle diverse fasi di malattia mostrando che aumentano progressivamente con la severità.

Un ulteriore studio ha mostrato che in 68 pazienti con infezione da SARS-COV 2 l'espressione di NKG2A, un recettore associato all'immuno-esaurimento delle NK è up-regolata nelle cellule NK e che i pazienti infetti presentano una minore capacità di produrre CD107a, IFN- γ , IL-2, granzyme B, e TNF- α . La percentuale di cellule che esprimono NKG2A si riduce progressivamente quando il paziente recupera [7].

Se diversi studi hanno descritto il profilo linfocitario e i livelli di citochine in pazienti che necessitano ricovero per SARS-COV2 [9,10], a nostra conoscenza nessuno studio ha affrontato questo tema nei pazienti paucisintomatici o asintomatici, spesso diagnosticati solo per aver avuto contatti diretti con pazienti COVID19.

Studi epidemiologici recenti suggeriscono peraltro che la proporzione di soggetti paucisintomatici o addirittura asintomatici potrebbe essere significativa e che essi potrebbero rappresentare una fonte importante di contagio [11].

Tra i pazienti paucisintomatici e asintomatici sono stati osservati casi di positività al test molecolare protrattata ben oltre le 2-4 settimane previste come periodo di quarantena. Proprio questa condizione farebbe supporre uno stato di esaurimento funzionale delle cellule immunitarie che consentirebbe la persistenza virale pur senza l'instaurarsi di sintomi clinici severi.

→Scopo di questo studio esplorativo è quindi analizzare descrivere il profilo delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue periferico, il loro stato di attivazione, l'espressione dei recettori dei checkpoint inibitori. Contemporaneamente verrà effettuato il dosaggio delle citochine maggiormente coinvolte nella risposta virale (IL6 e TNF) e il dosaggio delle immunoglobuline IgG neutralizzanti anti SARS-COV2.

Obiettivi

Obiettivo primario

- Descrivere il profilo delle sottopopolazioni linfocitarie su sangue periferico, il loro stato di attivazione, l'espressione dei recettori dei checkpoint inibitori in pazienti asintomatici o paucisintomatici con RT-PCR per SARS COV 2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico).

Obiettivo secondario

- Descrivere il profilo citochinico e anticorpale in pazienti asintomatici o paucisintomatici con RT-PCR per SARS COV 2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico).

Disegno dello studio

Popolazione in studio

- Pazienti paucisintomatici/asintomatici con RT-PCR per SARS-COV2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico)

Contesto clinico e riferimenti temporali

Questo studio, osservazionale, monocentrico, prospettico sarà condotto presso l'Ospedale SS Biagio e C. Arrigo di Alessandria (AL).

L'Ospedale SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria è un ospedale di III livello con circa 500 posti letto e 2500 dipendenti. Dalla fine di febbraio ad oggi sono stati ricoverati circa 500 pazienti con infezione virologicamente confermata da SARS-CoV2.

L'inizio dell'arruolamento è previsto per il 15/06/2020, l'ultimo paziente sarà arruolato il 31/07/2020.

**Metodologia****Tipologia di studio**

Si tratta di studio esplorativo, osservazionale prospettico, monocentrico, no-profit.

Criteria di Inclusione

- Consenso firmato dal paziente o dal suo legale rappresentante.
- Pazienti paucisintomatici/asintomatici con RT-PCR per SARS-COV2 su tampone nasofaringeo persistentemente positiva (15 giorni dalla scomparsa dei sintomi o 28 giorni dal primo tampone positivo in paziente asintomatico)
- Età >18 anni e <65 anni
- Assenza di patologie autoimmuni
- Assenza di copatologie neoplastiche (oncoematologiche)
- Assenza di malattie infettive croniche (HIV, epatiti, CMV, tubercolosi)
- Non in terapia farmacologica
- Charlson comorbidities Index =0 per patologia o <2 se patologia=0 e età=2 [12].

Criteria di Esclusione

- Paziente legalmente incapace di prestare il consenso
- Paziente o legale rappresentante che nega il consenso.
- Gravidanza
- La presenza di una qualsiasi comorbidità
- Body mass index ≥ 30 , sindrome metabolica.
- Diabete in terapia dietetica, alterata glicemia a digiuno
- Qualsiasi patologia autoimmune, oncoematologica, infettive croniche, neurodegenerative a avere avuto un tumore in qualsiasi fase della vita eccetto basalioma, melanoma in situ e tumore in situ della cervice.

Fonte dei dati

I pazienti eleggibili e i dati clinici saranno raccolti in forma anonimizzata in un database su piattaforma Redcap® (v9.1.0; Vanderbilt University) dalla Infrastruttura Ricerca Formazione Innovazione - A.O. di Alessandria.

Endpoint

Data la natura puramente descrittiva non sono previsti endpoint primari o secondari.



Dimensione del campione

Trattandosi di uno studio esplorativo, il campione previsto è di 10 pazienti consecutivi che rispondano ai criteri di inclusione.

Variabili raccolte

- **Variabili demografiche/fisiologiche**

Descrive le differenti variabili anagrafiche. Sesso (dicotomica), data di nascita, età. Peso (continua, in Kg). Altezza (continua in cm). Circonferenza vita (continua in cm).

- **Manifestazioni cliniche COVID19**

data inizio sintomi, data fine sintomi. I sintomi sono: febbre (almeno una puntata superiore o uguale a 37.5°C), febbrecola (almeno un giorno con temperatura corporea > 37°C ma <37.5°C) tosse, dispnea, rash cutaneo, diarrea (tre scariche di feci non formate in 24 ore), infiammazione delle vie aeree superiori, cefalea, ageusia, anosmia, dolori muscolari e/o osteoarticolari, astenia, congiuntivite .

- **Variabili virologiche**

Test immunometrico in Clia IgG semi quantitativo (test sierologico per le IgG antiproteine S1 S2 SARS-CoV2 con test LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG-Diasorin;

RT-PCR ELITech - CE-IVD kit GeneFinder™ COVID-19 Platform ELITE InGenius®.

Stato Sierologico: valutazione quantitativa in UA (Unità Arbitrarie): positivo se > 15UA

Esito RT-PCR (variabile dicotomica), valutazione reattività dei singoli geni in relazione all'andamento clinico.

- **Variabili immunologiche**

Conta assoluta e percentuale di linfociti T CD3, CD4, CD8, NK CD16+CD56 e B CD19 mediante citometria a flusso (Navios Beckman Coulter) e contestuale valutazione dei compartimenti linfocitari T attivati (HLA-DR+ CD38+), T esauriti (CD57+CD279+), T naive/memory/effector (CD45RA/R0, CD27, CD28, CCR7), T reg (CD25+CD127+low), NK esauriti (NKG2A+)

IL-6 (Siemens Healthcare), Human TNF-alfa Elisa kit (Diacclone Pantec)

- **Esami ematici**

Emocromo con formula, PCR, VES, ferritina, LDH, AST, ALT, creatinina.

Procedure Effettuate

Vengono contattati attivamente i soggetti con riscontro di tampone persistentemente positivo individuati:

- dal laboratorio Analisi, Medicina Trasfusionale e Microbiologia dell'ASO AL
- dal Medico Competente qualora si tratti di personale aziendale
- da uno degli sperimentatori,

Viene effettuato un colloquio informativo, registrati i dati demografici e verificati i criteri di inclusione-esclusione.

Il colloquio informativo avviene telefonicamente o contestualmente al prelievo ematico.

L'arruolamento deve essere effettuato entro 3 giorni da esecuzione tampone.

Gli esami effettuati in corso di studio sono schematizzati nell'annesso 1.

Basale - Tempo 0 (Giorno 0, giorno dell'arruolamento): si esegue prelievo ematico per emocromo e biochimica, esami sierologici e immunometria.

End – tempo finale: definito dalla negativizzazione del tampone nasofaringeo - ripete esami del tempo 0.

I prelievi e i tamponi nasofaringei vengono effettuati al punto prelievi laboratorio analisi, poliambulatorio Santa Caterina. All'atto del primo prelievo viene ottenuta la firma del consenso informato.

Metodi di analisi statistica

Sarà effettuata una analisi descrittiva delle variabili presenti nello studio. Media, mediana e deviazione standard saranno utilizzate per le variabili a distribuzione continua, per le variabili a distribuzione non continua saranno utilizzati mediana e range interquantile. Variabili dicotomiche e categoriche saranno descritti con valori numerici e percentuali.

Strumenti di raccolta dati

Il registro è creato attraverso la piattaforma web REDCap: <https://redcap.ospedale.al.it/redcap/>.

La raccolta dei dati viene effettuata secondo quanto previsto dal D.Lgs. n. 196 del 30 giugno 2003 ("Codice in materia di protezione dei dati personali") e dal Regolamento generale per la protezione dei dati personali n. 2016/679 (General Data Protection Regulation o GDPR).

Copertura assicurativa

Trattandosi di uno studio osservazionale non è prevista la stipula di una polizza assicurativa.

Informazione sulla ricerca ai soggetti partecipanti e consenso informato

È responsabilità dello sperimentatore principale o di una persona da esso designata ottenere il consenso informato firmato da ciascun paziente prima di partecipare a questo studio, dopo spiegazione adeguata degli scopi, metodi, benefici previsti e potenziali rischi dello studio. Lo sperimentatore deve anche spiegare che i pazienti sono completamente liberi di rifiutarsi di entrare nello studio e di ritirarsi da esso in qualsiasi momento, per qualsiasi

motivo. Il modulo di consenso informato è un documento separato, conforme al principio della Dichiarazione di Helsinki e ai requisiti normativi ed è considerato appropriato per questo studio.

Proprietà dei dati e trasparenza dei risultati

La proprietà dei dati e la responsabilità delle pubblicazioni dei risultati dello studio sono del Promotore dello Studio che si impegna a pubblicare i risultati in modo da dare piena e tempestiva informazione alla comunità scientifica, agli operatori sanitari, e ai pazienti potenzialmente interessati, indipendentemente dal tipo di risultato che verrà ottenuto.

Requisiti etici e aspetti legali

Lo studio dovrà essere svolto nel rispetto della normativa italiana vigente sulla sperimentazione clinica, sulla normativa europea e nel rispetto della dichiarazione di Helsinki per l'intera durata dello studio.

Lo Sperimentatore Principale e tutti i co-sperimentatori dovranno attenersi a quanto descritto nel protocollo nel completo rispetto delle GCP e dovranno impegnarsi a mantenere la massima riservatezza nei confronti di qualsiasi persona non autorizzata dal Promotore afferente allo studio, sia in riferimento ai risultati ottenuti nel corso della sperimentazione sia riguardo tutti i dati sensibili dei pazienti arruolati nello studio nel rispetto del D.Lgs. n. 196/2003 Codice in materia di protezione dei dati personali e Regolamento europeo GDPR n.679/2016.

Costi

I costi che non rientrano nella pratica clinica corrente e considerati “aggiuntivi” riguardano i test sierologici, il profilo linfocitario, il dosaggio delle citochine.

Il costo stimato per ogni paziente inserito in protocollo è di 250 euro per un costo complessivo dello studio di 5000 euro.

Bibliografia

- [1] Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:749–61. <https://doi.org/10.1038/nri3307>.
- [2] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15:486–99. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
- [3] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009;10:29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>.
- [4] Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 2013;14:1212–8. <https://doi.org/10.1038/ni.2762>.
- [5] Araki K, Youngblood B, Ahmed R. Programmed Cell Death 1-Directed Immunotherapy for Enhancing T-Cell Function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2013;78:239–47. <https://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.019869>.
- [6] Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15016–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801497105>.
- [7] Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020;7–9. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>.
- [8] Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *MedRxiv* 2020;11:2020.02.18.20024364. <https://doi.org/10.1101/2020.02.18.20024364>.
- [9] He R, Lu Z, Zhang L, Fan T, Xiong R, Shen X, et al. The clinical course and its correlated immune status in COVID-19 pneumonia. *J Clin Virol* 2020;127. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104361>.
- [10] Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia n.d. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150/5813618>.
- [11] Gandhi M, Yokoe DS, Havlir D V. Asymptomatic Transmission, the Achilles' Heel of Current Strategies to Control Covid-19. *N Engl J Med* 2020. <https://doi.org/10.1056/nejme2009758>.
- [12] Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373–83. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8).
- [13] Rhee J-Y, Kwon KT, Ki HK, Shin SY, Jung DS, Chung D-R, et al. SCORING SYSTEMS FOR PREDICTION OF MORTALITY IN PATIENTS WITH INTENSIVE CARE UNIT-ACQUIRED SEPSIS. *Shock* 2009.

<https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318182f98f>.

- [14] ECDC. Infection prevention and control and preparedness for COVID-19 in healthcare settings Target audience Healthcare settings 2020.

ANNESSO I:

	Baseline	End
Scheda Anagrafica	X	
Peso, altezza, circonferenza vita	X	
Manifestazioni cliniche	X	X
Tampone nasofaringeo	X	X
Sierologia	X	X
Profilo Immunologico	X	X
Ematochimici	X	X

Figura 1. Alterazioni fenotipiche e funzionali delle cellule T esaurite. Adattato da [1] Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. Immunology 2010;129:474–81.

