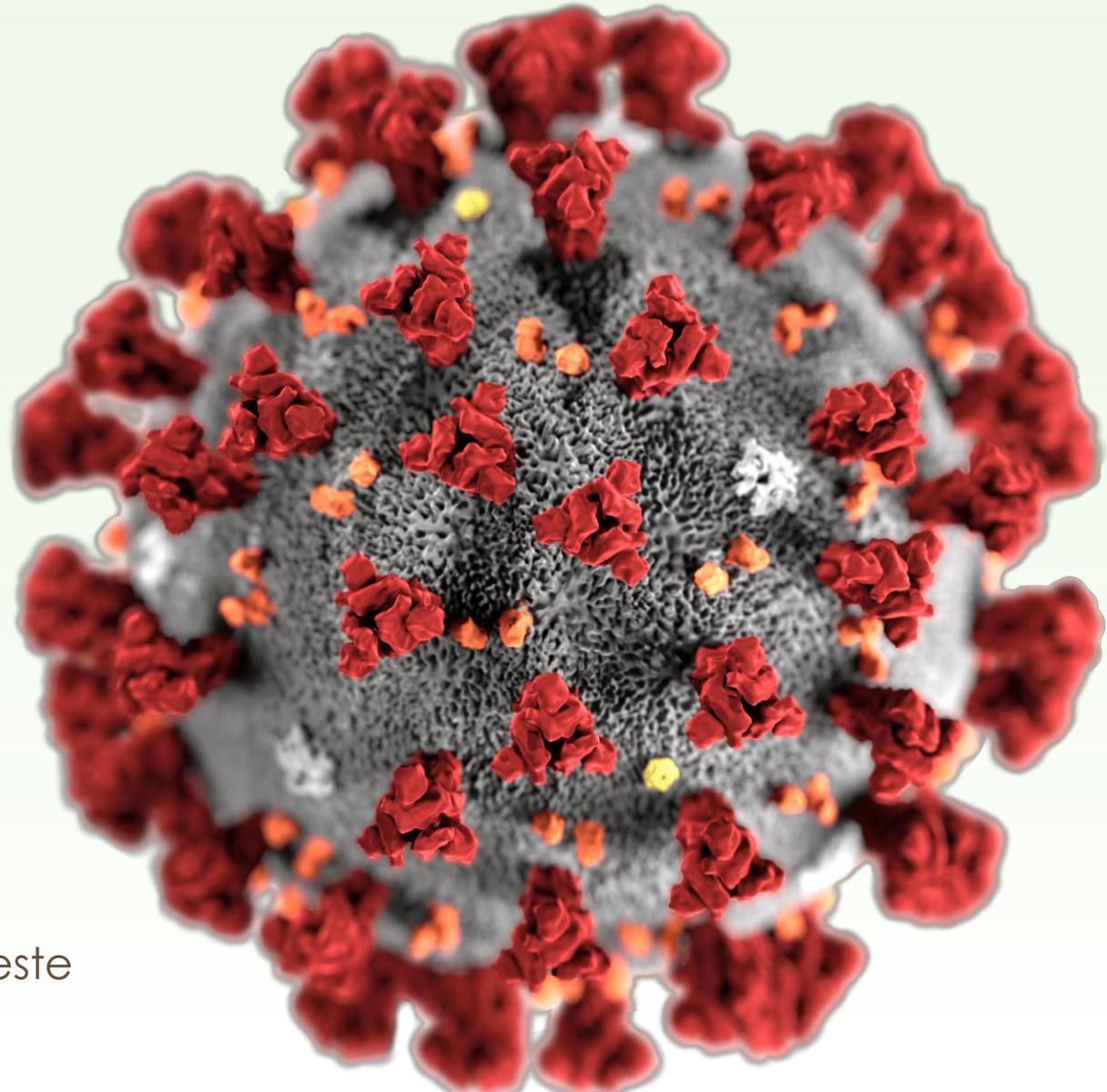


# SARS-CoV-2: una storia di zoonosi, varianti e sgradite sorprese

Marco Gerdol  
Ricercatore BIO/18 - genetica

Dipartimento di Scienze della Vita – Università di Trieste

Darwin Day 2022 – 24 febbraio 2022  
Museo di Storia Naturale - Ferrara



# Uomo e coronavirus: un incontro non così casuale



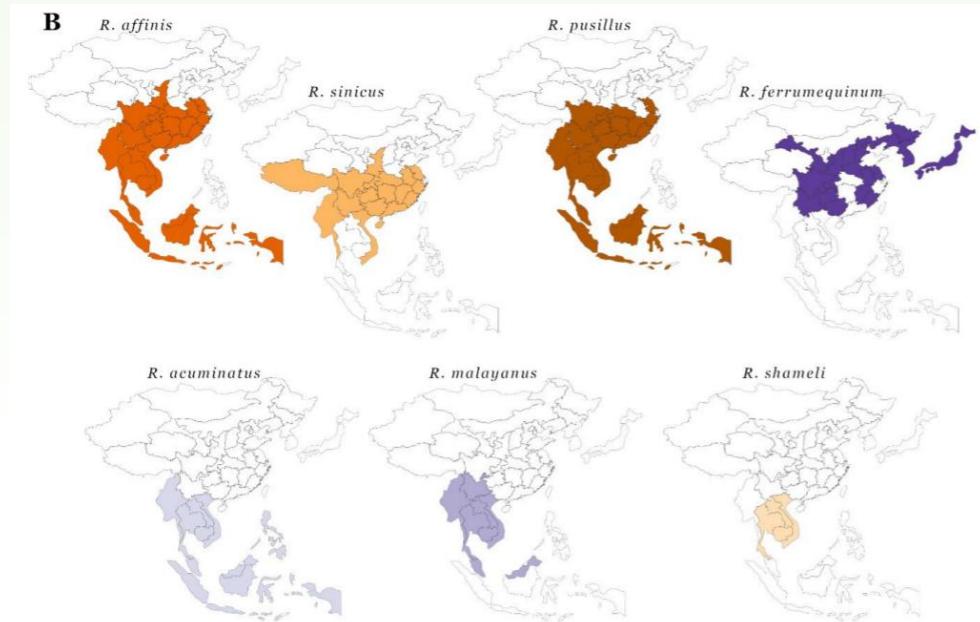
- I chiroteri sono il secondo gruppo animale più numeroso dopo i roditori
- Ampia distribuzione di pipistrelli del genere Rhinolophus nel sud-est asiatico
- Ampia sovrapposizione con aree densamente popolate dall'uomo

**Perspective**

## Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir

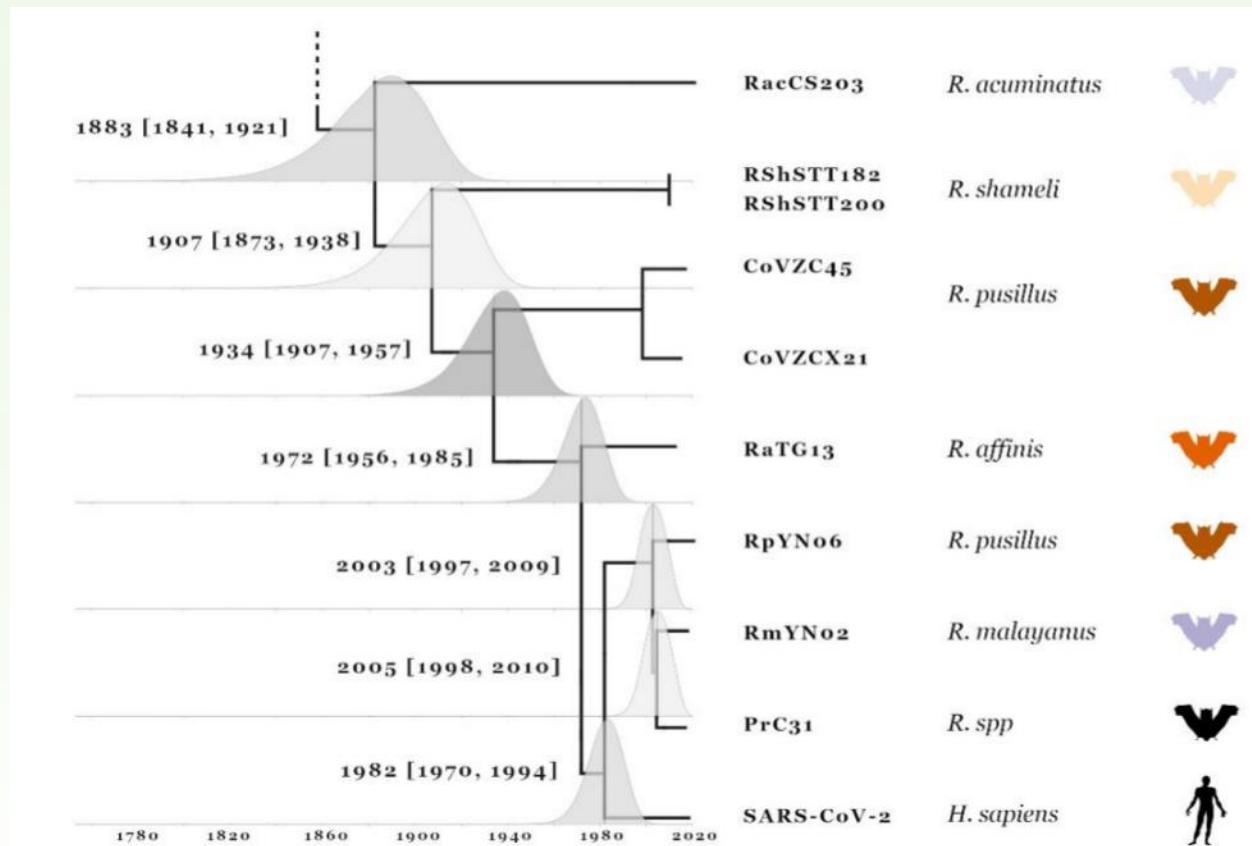
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0> Aaron T. Irving<sup>1,2,3,5</sup>, Matae Ahn<sup>1,5</sup>, Geraldine Goh<sup>1,5</sup>, Danielle E. Anderson<sup>1</sup> & Lin-Fa Wang<sup>1,4,5</sup>

«64 million years of adaptive evolution have shaped the host defence system of bats to balance defence and tolerance, which has resulted in a unique ability to act as an ideal reservoir host for viruses”



Lytras et al. 2022, GBE

# I coronavirus dei pipistrelli: più ne cerchiamo, più ne troviamo



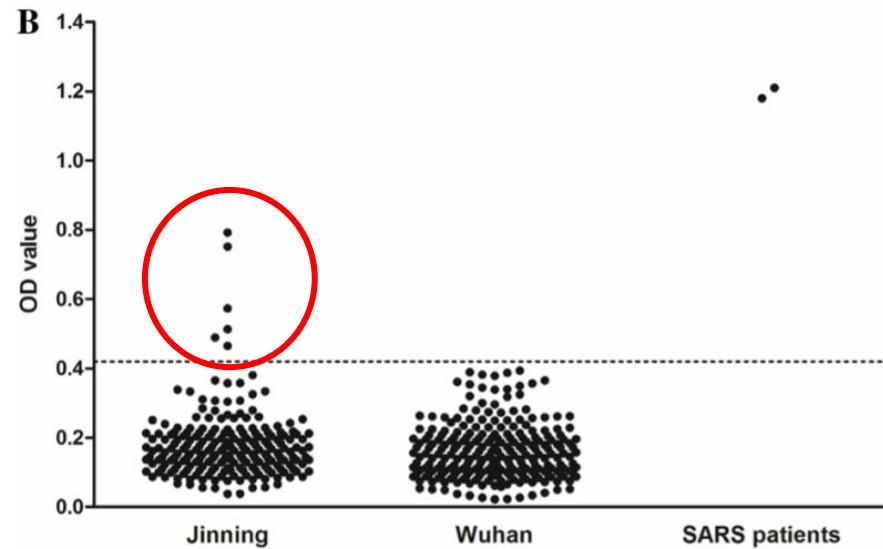
- La nostra visione della biodiversità dei coronavirus dei pipistrelli è molto limitata
- Nuove spedizioni stanno via via colmando i «buchi evolutivi» che separano SARS-CoV-2 dai suoi cugini
- Studiare l'evoluzione di SARS-CoV-2 non è facile! **Frequenti eventi di ricombinazione**
- Bastano i pipistrelli o bisognerebbe cercare altrove?

**L'antenato comune tra SARS-CoV-2 ed i virus ed esso più strettamente imparentati può essere fatto risalire a circa una ventina di anni fa**

# SARS-CoV-2 non è stato il primo e (probabilmente) non sarà l'ultimo coronavirus pandemico

## Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China

Ning Wang<sup>1,2</sup> · Shi-Yue Li<sup>3</sup> · Xing-Lou Yang<sup>1</sup> · Hui-Min Huang<sup>3</sup> · Yu-Ji Zhang<sup>1</sup> · Hua Guo<sup>1,2</sup> · Chu-Ming Luo<sup>1,2</sup> · Maureen Miller<sup>4</sup> · Guangjian Zhu<sup>4</sup> · Aleksei A. Chmura<sup>4</sup> · Emily Hagan<sup>4</sup> · Ji-Hua Zhou<sup>5</sup> · Yun-Zhi Zhang<sup>5,6</sup> · Lin-Fa Wang<sup>7</sup> · Peter Daszak<sup>1</sup> · Zheng-Li Shi<sup>1</sup> 



Già nel 2015 gli abitanti di alcuni villaggi dello Yunnan, mostravano presenza di anticorpi anti-SARS!

Era solo questione di tempo?

- I Sarbecovirus sono virus «generalisti»
- Alcuni di essi hanno già la potenzialità di riconoscere con elevata affinità il recettore ACE2 umano -> alto potenziale zoonotico
- Ospiti intermedi possono favorire l'acquisizione di caratteristiche favorevoli per l'infezione in uomo

**nature**

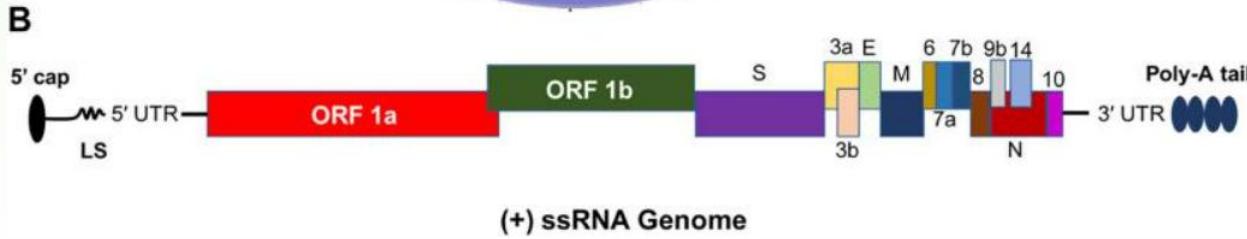
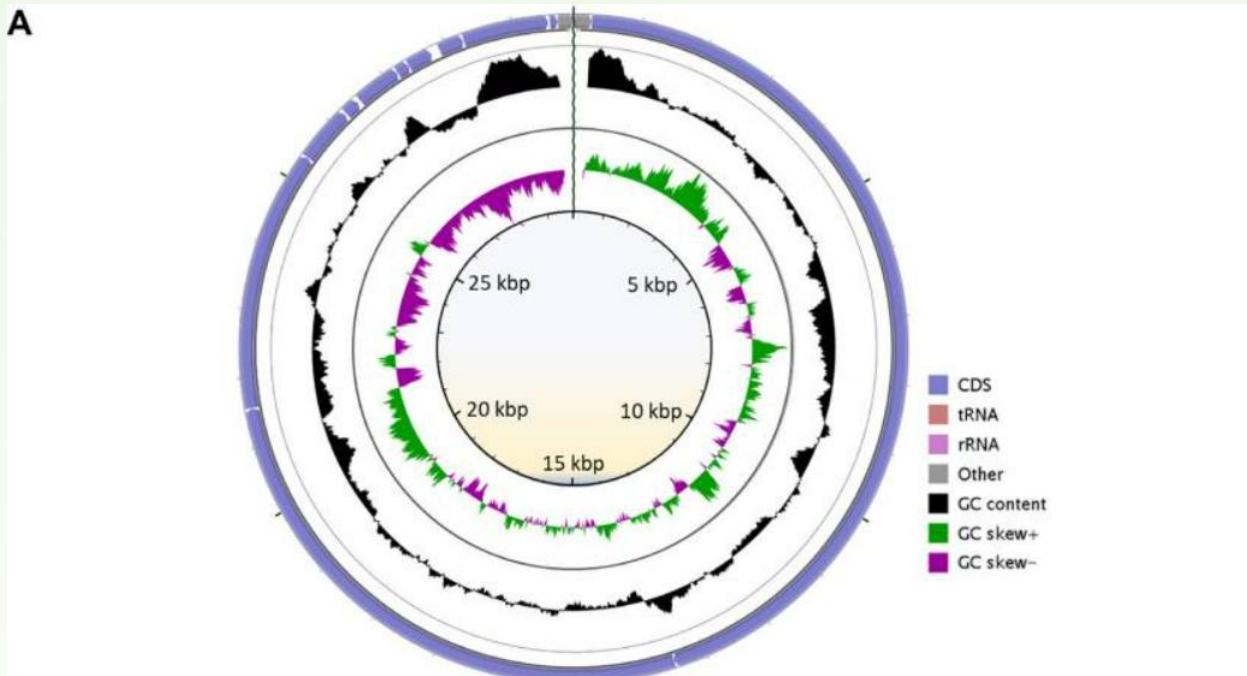
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>

**Accelerated Article Preview**

**Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells**



# La struttura del genoma virale

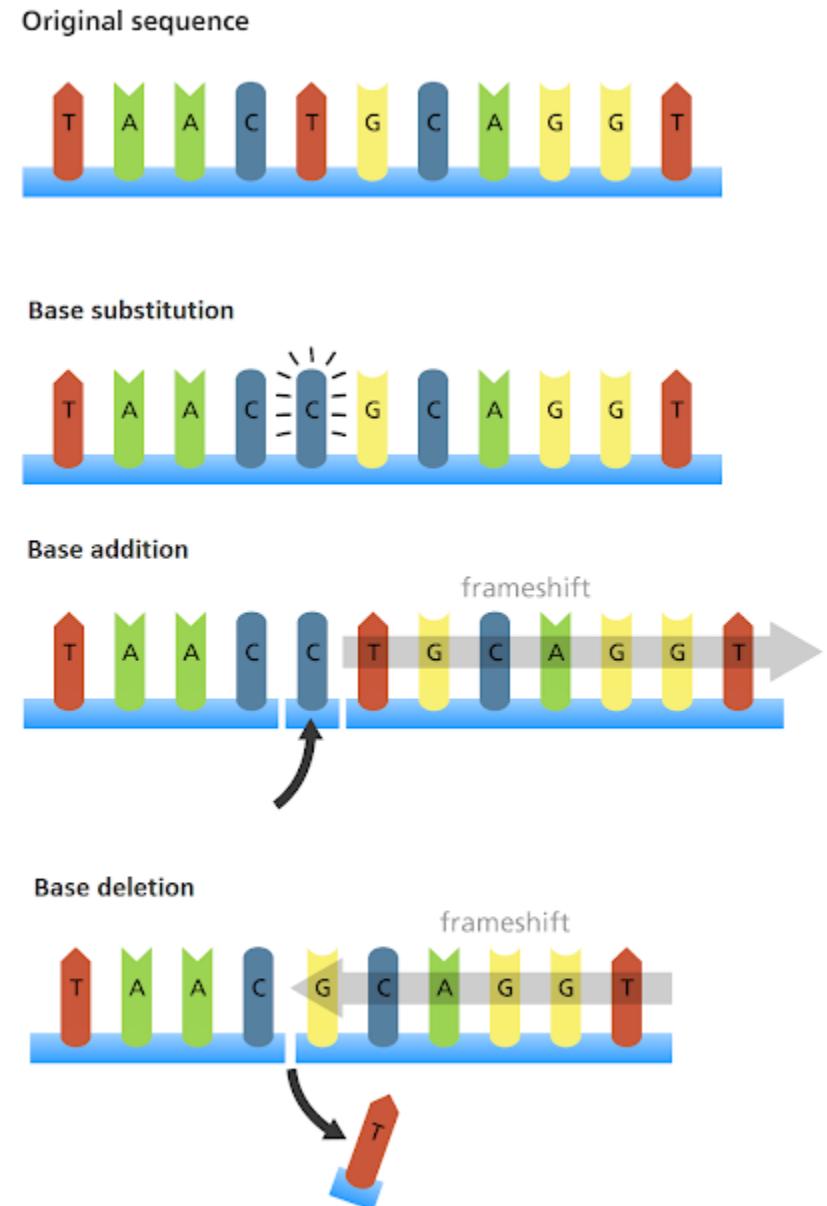


Nel panorama dei genomi dei virus ad RNA, quello di SARS-CoV-2 non è un genoma particolarmente piccolo, né «semplice»

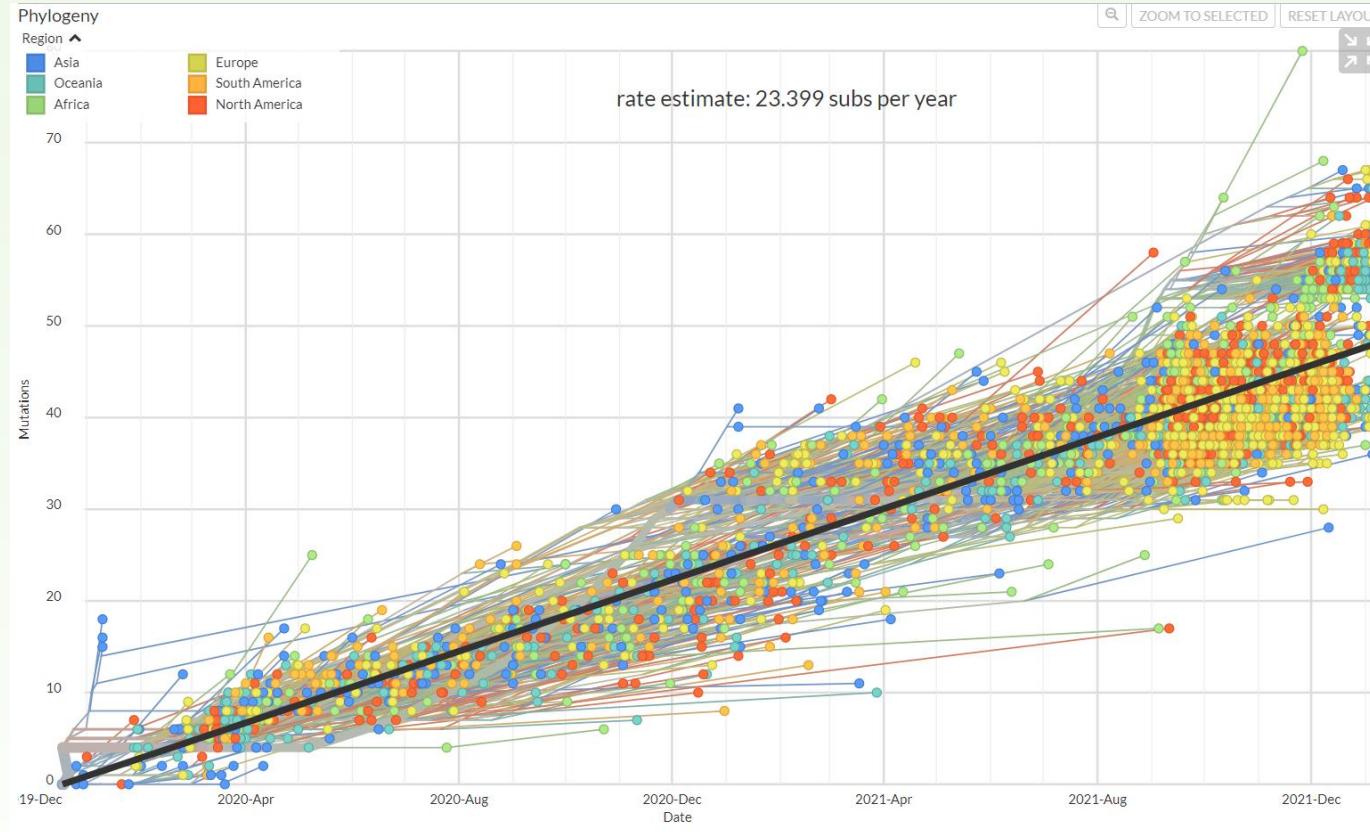
- Genoma di **29903 nucleotidi**
- Circa 100mila volte più piccolo del genoma umano
- Circa 6mila volte più piccolo del genoma di *Drosophila melanogaster*
- Circa 150 volte più piccolo del genoma di *Escherichia coli*
- Sono presenti **«open reading frames»**, che potremmo considerare equivalenti a «geni»
- Alcune delle proteine codificate vengono processate in unità funzionali più piccole

# Perché i virus mutano?

- ✓ Le mutazioni sono il **motore dell'evoluzione**. Senza di esse la vita nell'ambiente mutevole nello spazio e nel tempo del pianeta Terra non sarebbe possibile, in quanto non sarebbe possibile **adattamento**
- ✓ La possibilità di mutare è una proprietà intrinseca di tutti gli acidi nucleici, e le mutazioni sono sempre **eventi dovuti al caso**
- ✓ Un evento mutazionale può essere dovuto a cause intrinseche (**errori da parte delle polimerasi in fase di replicazione**) oppure estrinseche (ad esempio danno da UV, radiazioni, ecc.)
- ✓ E' necessario trovare il **giusto compromesso** tra tasso di mutazione e stabilità genomica per evitare effetti avversi -> intuitivo nell'uomo, meno nei virus



# Quanto velocemente evolve SARS-CoV-2?



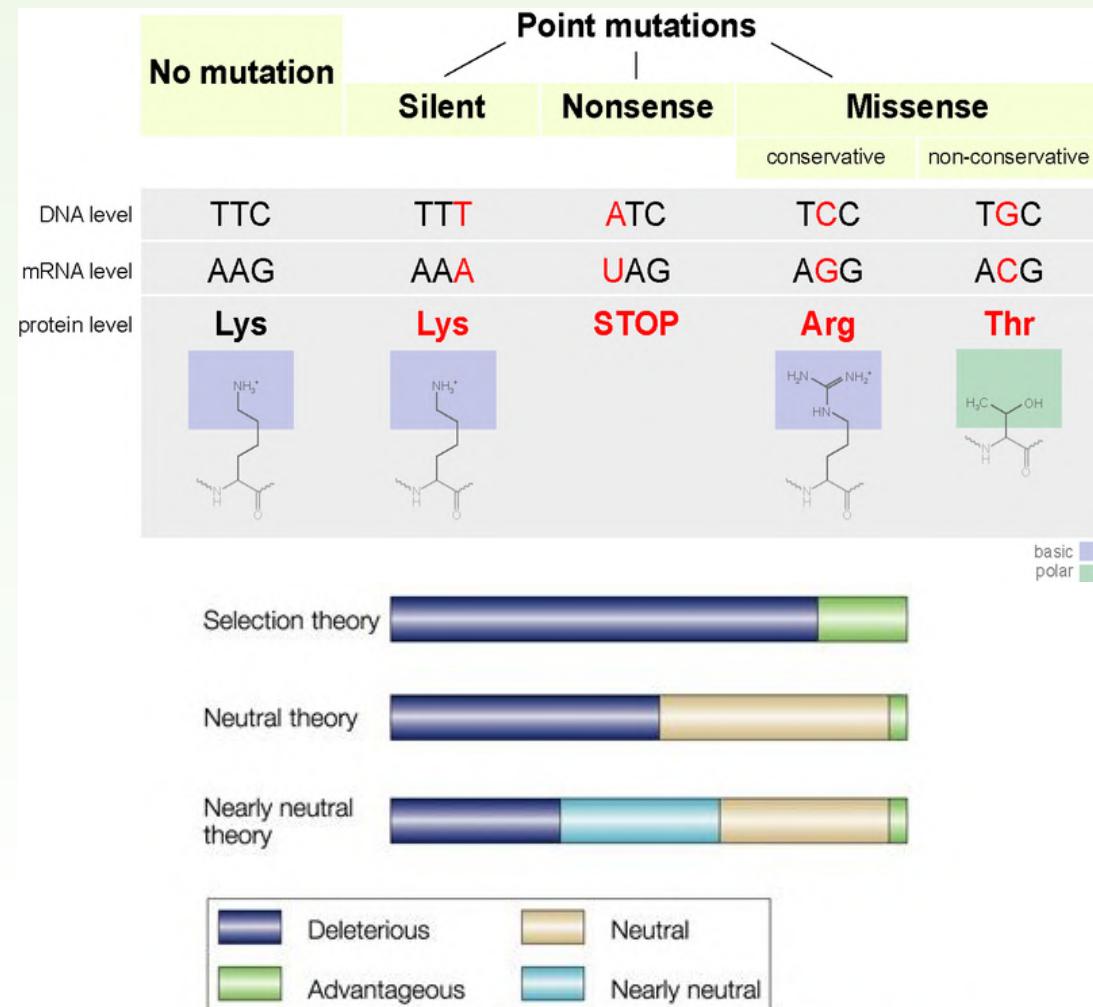
~25 sostituzioni nucleotidiche all'anno (~2 al mese)

In 2 anni, meno dello 0.5% del genoma di SARS-CoV-2 era cambiato rispetto a quello isolato a Wuhan

- Fino all'arrivo di omicron, il genoma di SARS-CoV-2 aveva accumulato mutazioni con un **tasso piuttosto costante**
- Questo tasso di mutazione è **SIMILE** a quello dei 4 coronavirus umani endemici responsabili di raffreddori
- Questo tasso di mutazione è circa **10 volte INFERIORE** rispetto a quello dell'influenza
- I betacoronavirus sono dotati di un sistema molecolare di **«correzione bozze»** (nsp14) che limita questo tasso

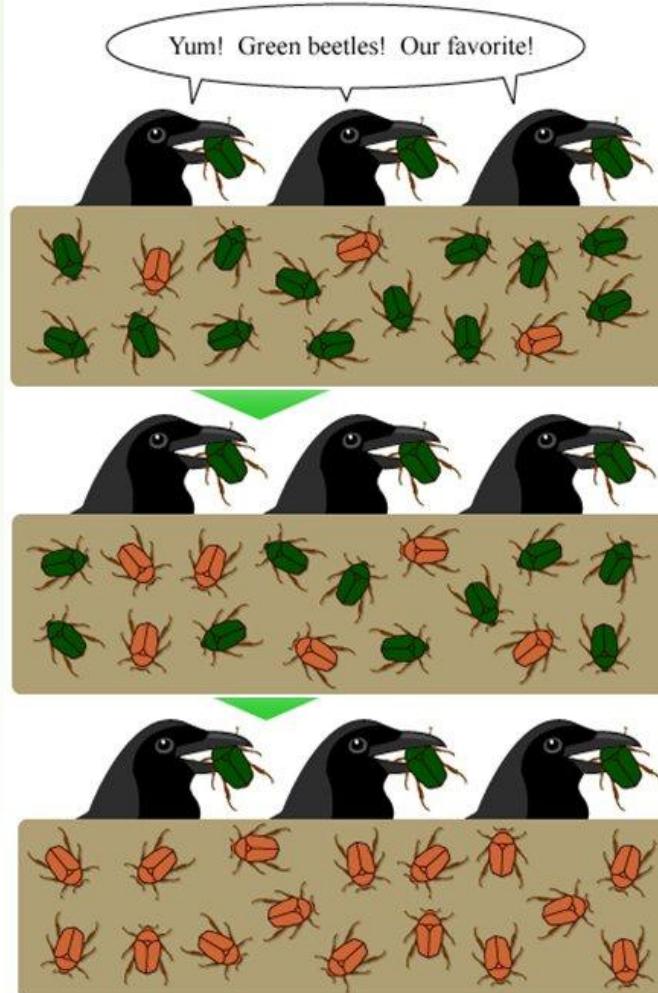
# Le mutazioni non sono tutte uguali

- ✓ Non tutte le mutazioni hanno lo stesso effetto, in particolare se riguardano regioni che codificano proteine
- ✓ La maggior parte delle mutazioni sono **DELETERIE** e vengono dunque **selezionate negativamente**
- ✓ Alcune mutazioni sono **NEUTRALI** e dunque possono essere perse rapidamente o diffondersi nella popolazione per vari motivi (deriva genetica, colli di bottiglia, effetto fondatore)
- ✓ Pochissime mutazioni possono portare ad un **VANTAGGIO EVOLUTIVO** e dunque vengono **selezionate positivamente**: la loro frequenza nella popolazione tende ad aumentare nel tempo



# Il concetto di fitness

**Natural selection, in a nutshell:**



Nel tempo le varianti caratterizzate da una migliore **FITNESS** tendono ad emergere

**Fitness = “la capacità di un virus di produrre progenie infettiva in un determinato ambiente”** (Domingo & Holland, 1997)

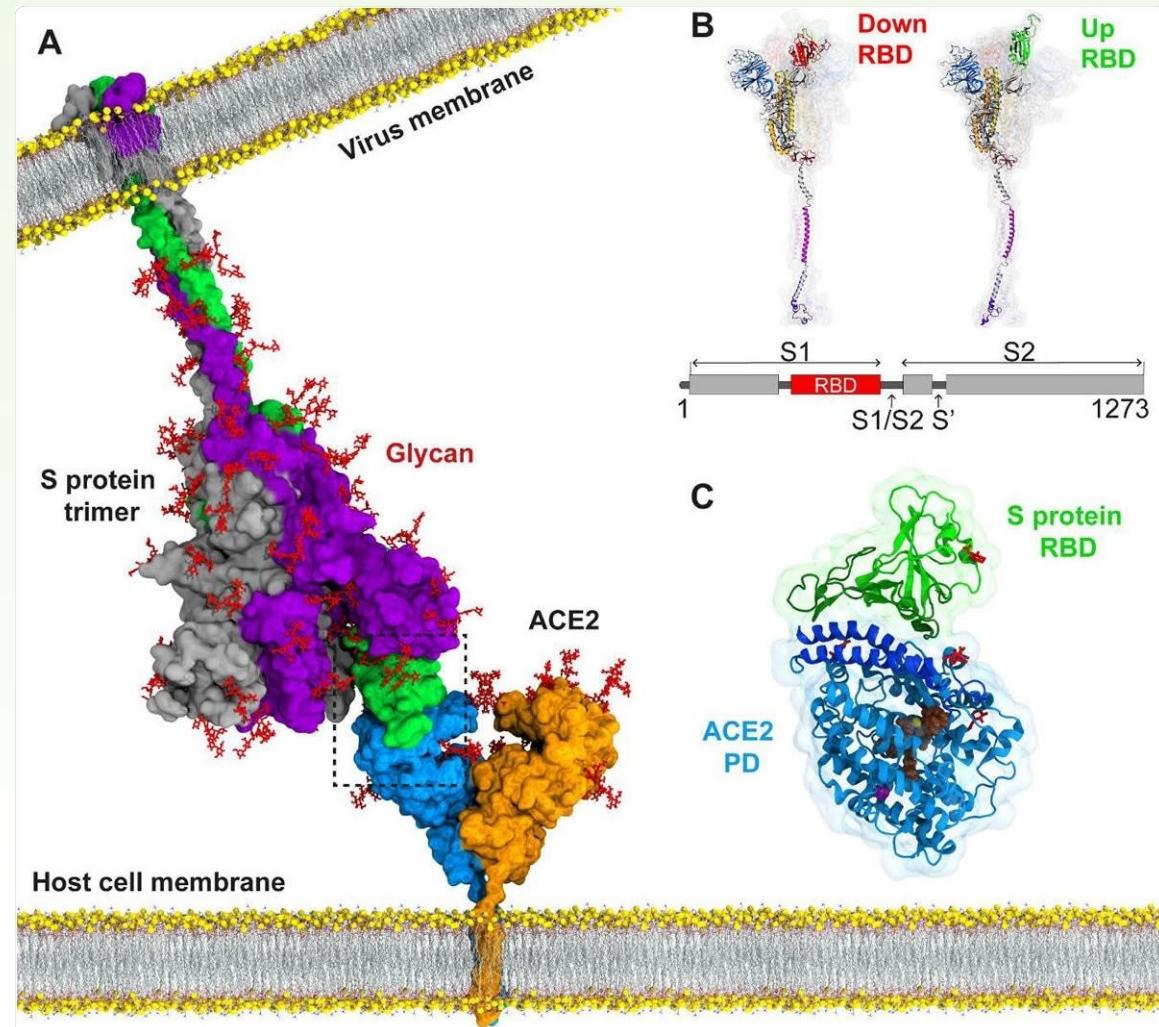
- ✓ I tratti fenotipici sono legati a caratteri genotipici (anche nei virus!)
- ✓ Individui in grado di sopravvivere meglio fino al raggiungimento dell'età riproduttiva saranno in grado di generare una **prole più numerosa**, a cui trasmetteranno il proprio patrimonio genetico
- ✓ Con il passare delle generazioni **il carattere più vantaggioso vedrà aumentare la propria frequenza nella popolazione** fino a divenire predominante

# Che cosa influenza la fitness di SARS-CoV-2?

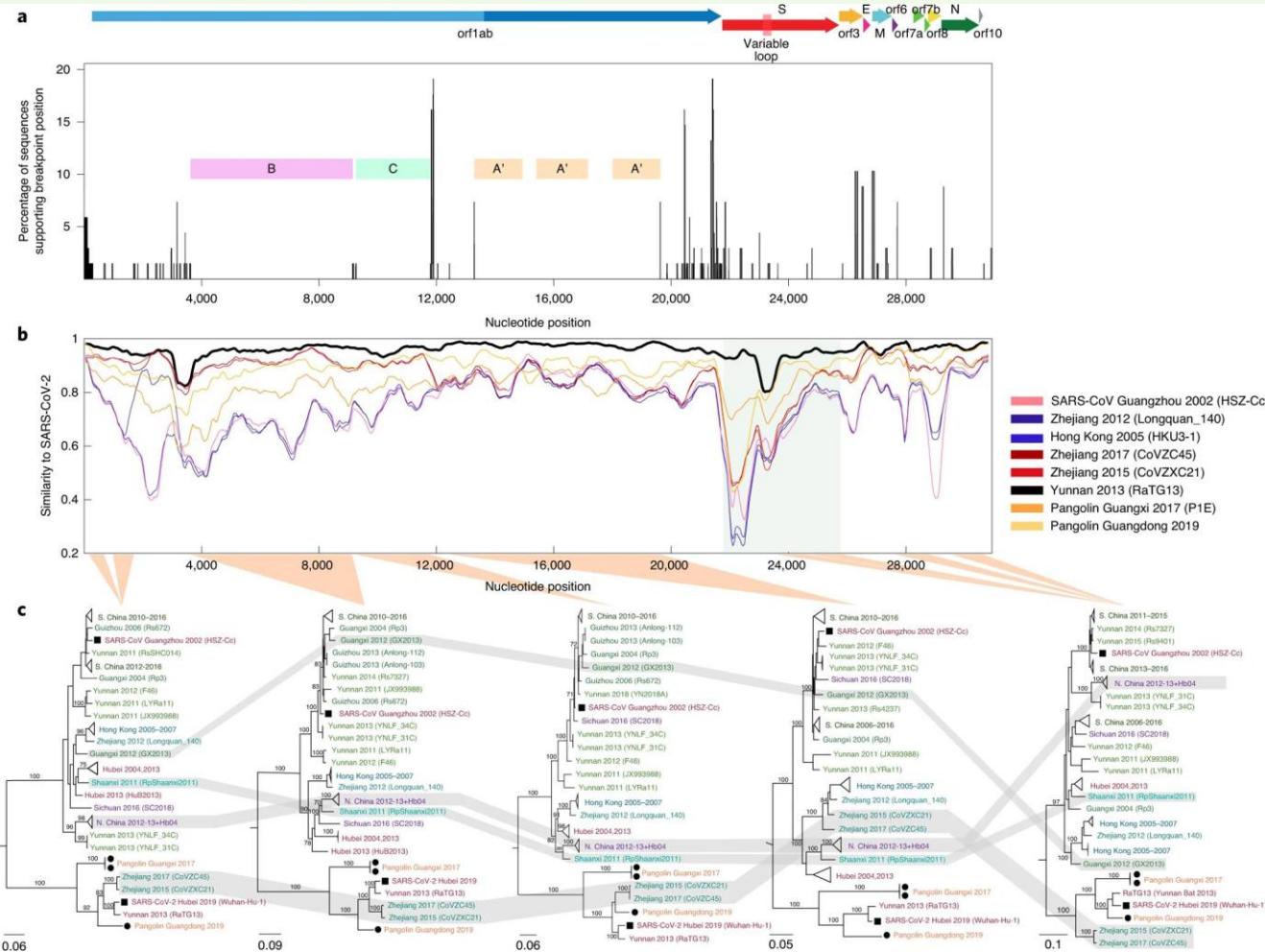
- ✓ **Migliore interazione tra spike ed il recettore ACE2** -> ingresso più efficiente nella cellula dell'ospite
- ✓ **Migliore efficienza del taglio proteolitico** -> maggiore capacità replicativa nei tessuti dell'ospite
- ✓ **Utilizzo di vie alternative per l'ingresso nelle cellule dell'ospite** -> alterazione del tropismo, replicazione in tessuti diversi, riduzione del tempo di incubazione, tempo di infettività, modalità di trasmissione

## Incremento della TRASMISSIBILITÀ INTRINSECA

Incremento di  $R_0$  (numero medio di infezioni secondarie generate da una persona contagiata)



# Il ruolo chiave della proteina spike nell'evoluzione virale



Boni et al. 2021, *Nature Microbiology* 2020

- ✓ Le mutazioni **non si distribuiscono in modo uniforme** lungo la sequenza del genoma
- ✓ Picco di elevata variabilità in corrispondenza del **gene S**, codificante la **proteina Spike**, ed in particolare nella subunità S1

## **Incremento dell'EVASIONE IMMUNITARIA**

## Poco importante in una popolazione «immunologicamente naïve»

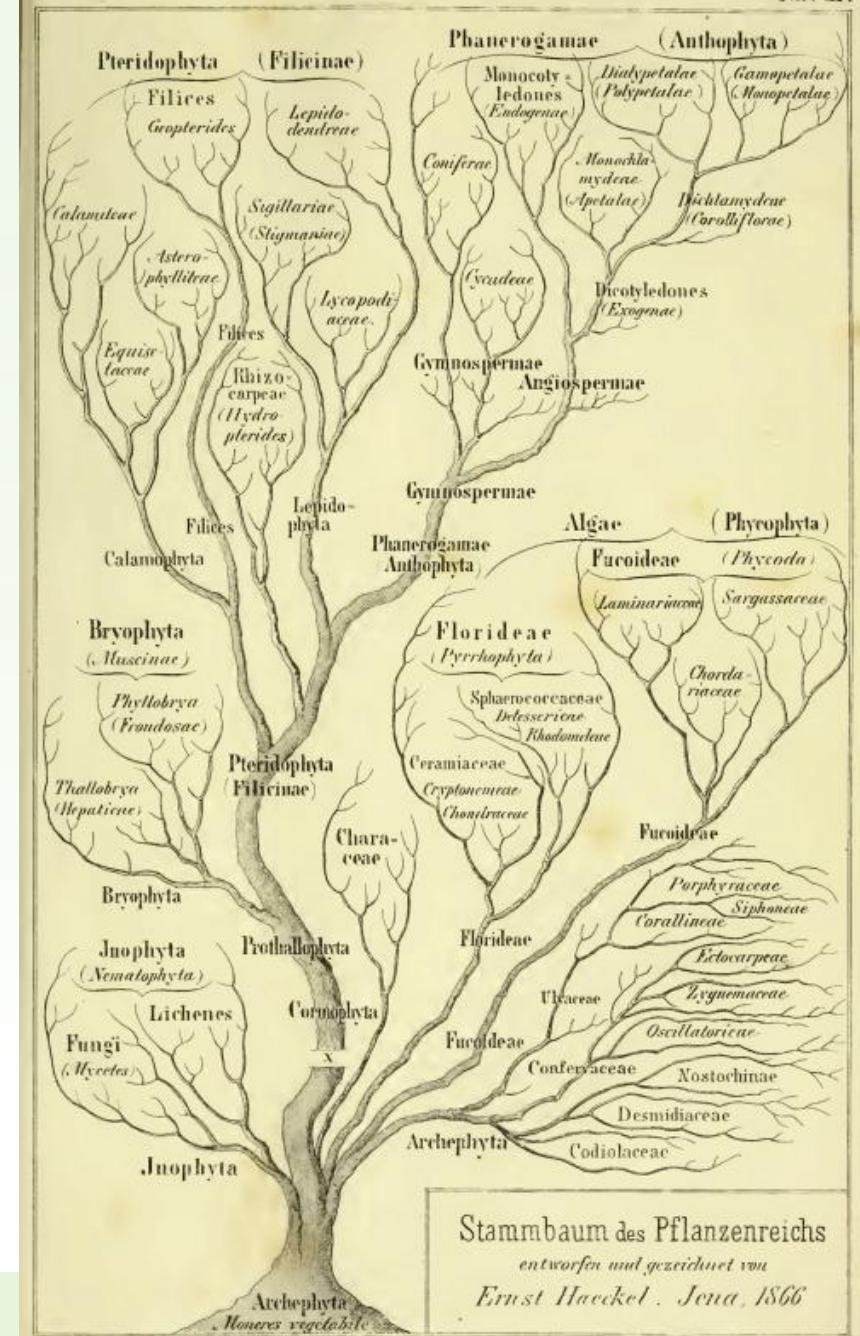
**Molto importante in una popolazione  
con pochi soggetti suscettibili  
all'infezione**

# La filogenesi molecolare: come studiare l'evoluzione del virus

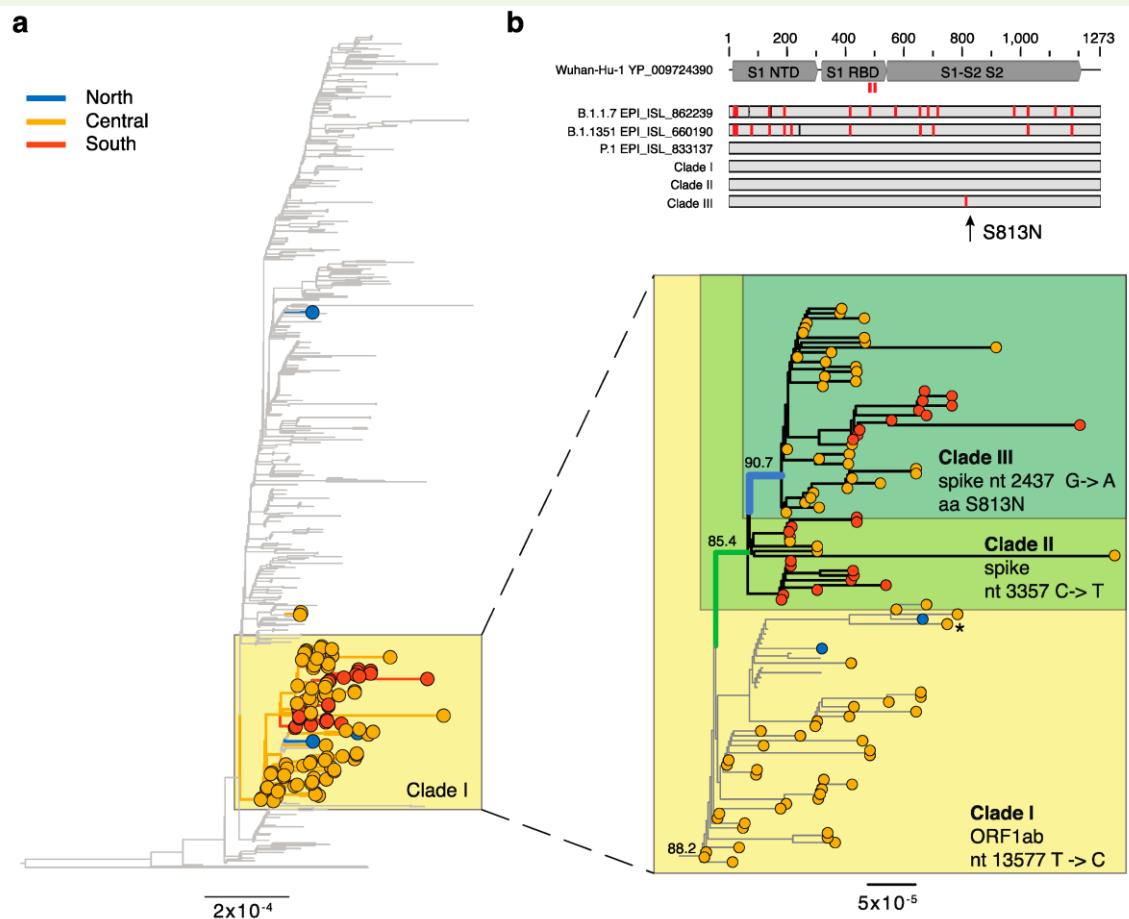
- La **filogenesi** è il processo di ricostruzione del percorso evolutivo che ha portato alla diversità di gruppi di organismi
- Classicamente, essa è sempre stata basata sull'osservazione di caratteri morfologici condivisi, che si può supporre siano derivati da un **antenato comune**
- In epoca moderna è possibile ricostruire queste relazioni grazie alla condivisione di **caratteri genetici** (mutazioni condivise)

**Questo processo è possibile anche per SARS-CoV-2**

**Gruppi di virus che condividono le stesse mutazioni hanno probabilmente una comune origine**



# Varianti vs mutazioni: una definizione

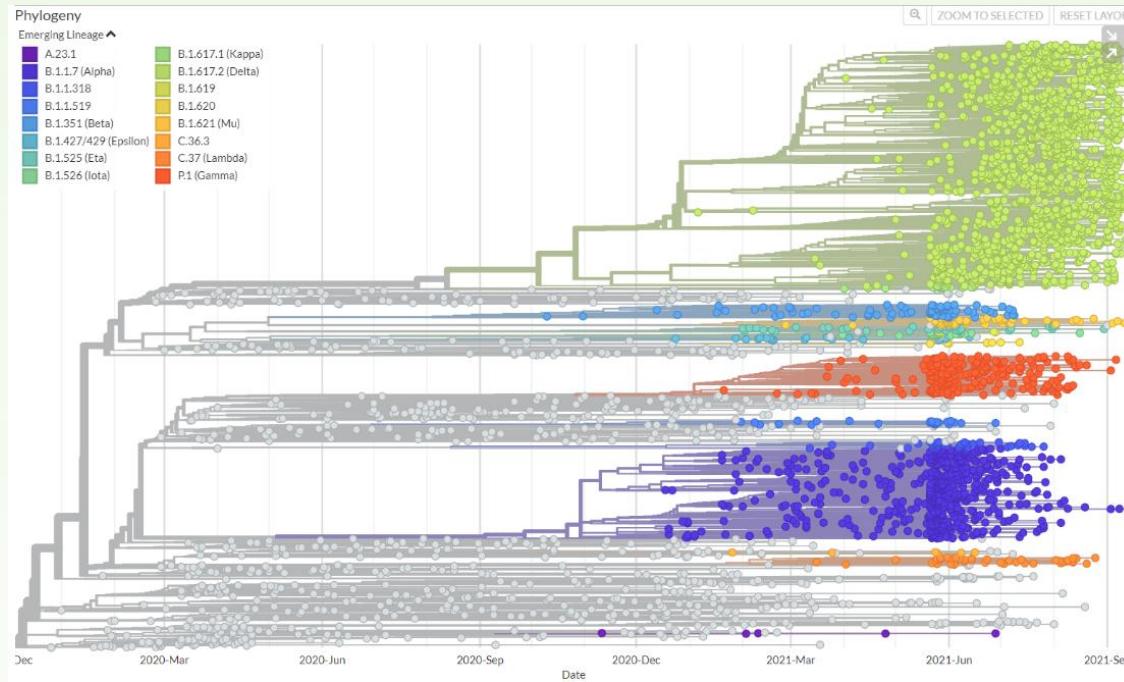


✓ **«Mutazione» e «variante» NON sono termini sinonimi!**

- ✓ Per mutazione si intende il singolo evento di modifica del codice genetico, indipendentemente dalla sua selezione
- ✓ Una variante è un gruppo di genotipi virali con origine evolutiva comune che condivide una o più mutazioni caratterizzanti che la distinguono da tutte le altre
- ✓ In sostanza ogni variante costituisce un **«lignaggio evolutivo»**

Per essere definita tale, una variante deve essere **filogeneticamente supportata** e collegata ad un **evento epidemiologico** (cluster di contagi, rapida diffusione locale, ecc.)

# Monitorare le varianti nel tempo



Grazie al sequenziamento possiamo monitorare l'emergenza e la diffusione di nuove varianti nel tempo

**Variants Under Monitoring (VUM)**



**Variants of Interest (VOI)**



**Variants of Concern (VOC)**

Solo una piccola frazione delle varianti identificate fino a questo momento sono state caratterizzate da proprietà biologiche significativamente diverse dalle altre (**maggior trasmissibilità/maggior evasione immunitaria**)

# Varianti: la classificazione «semplificata» dell'OMS

Currently designated variants of concern (VOCs)<sup>†</sup>:

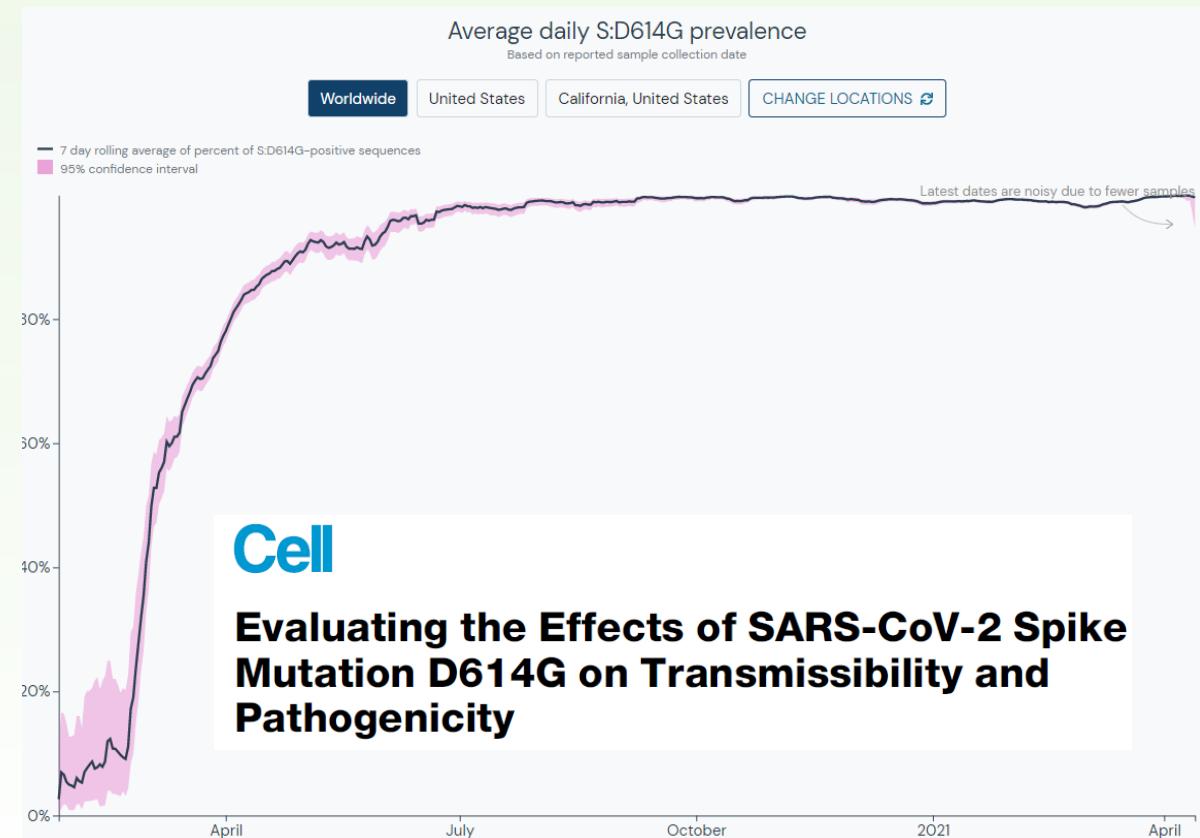
WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Additional amino acid changes monitored <sup>°</sup>	Earliest documented samples
Alpha	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	+S:484K +S:452R	United Kingdom, Sep-2020
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	+S:L18F	South Africa, May-2020
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	+S:681H	Brazil, Nov-2020
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	+S:417N +S:484K	India, Oct-2020
Omicron*	B.1.1.529	GRA	21K, 21L 21M	+S:R346K	Multiple countries, Nov-2021

**Complessivamente sono state descritte svariate centinaia di varianti**, rendendo la situazione troppo complessa per il grande pubblico (e per i media)

- Utilizzo di **lettere dell'alfabeto greco** per identificare soltanto le varianti di maggior rilievo epidemiologico
- Sistema di classificazione più «colloquiale» e adatto ad un utilizzo comunicativo da parte della stampa

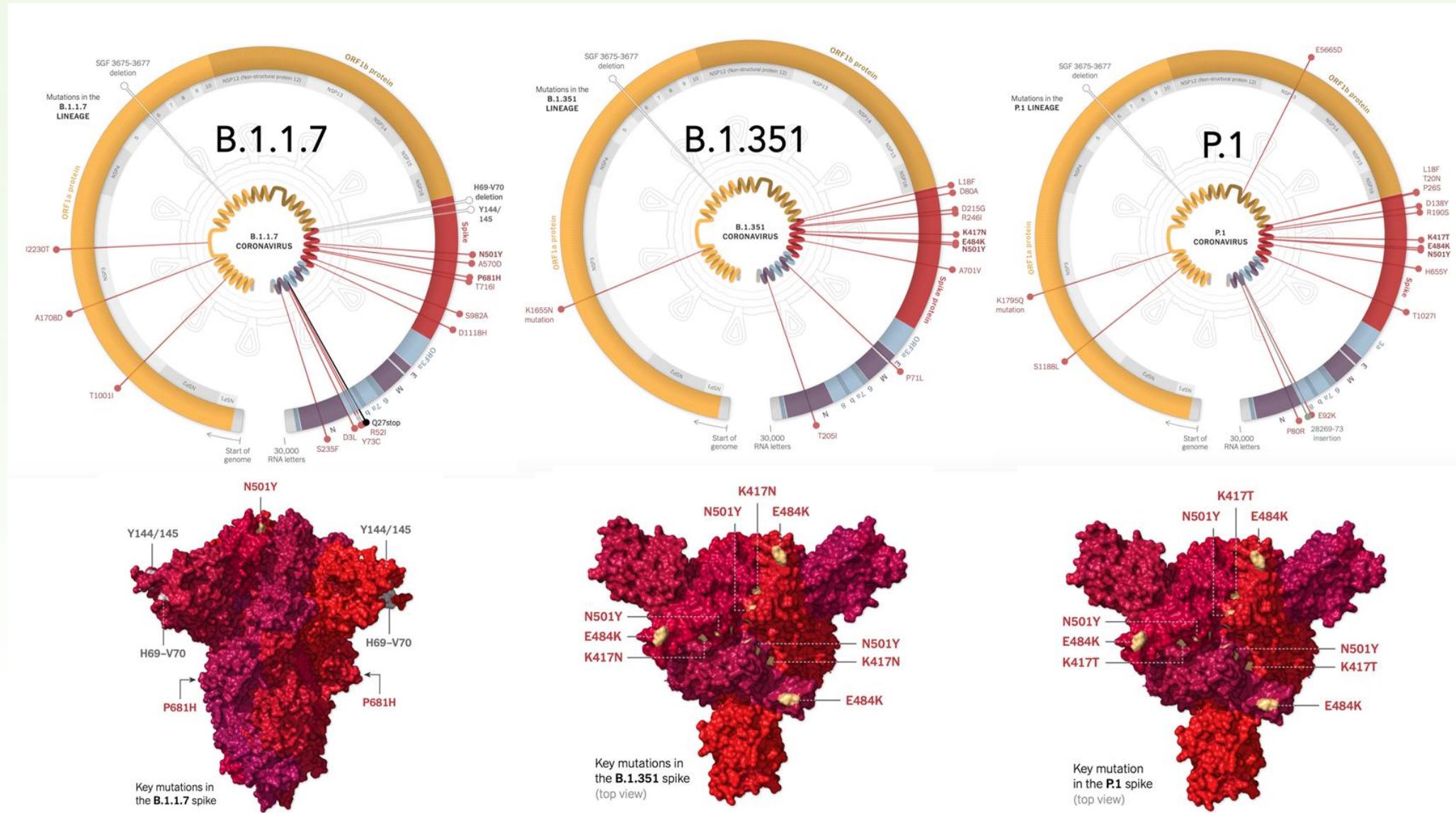
# D614G: la prima mutazione con forte impatto epidemiologico

- ✓ Pur non presente nel virus che ha caratterizzato l'outbreak di Wuhan, questa mutazione ha fin da subito caratterizzato la pandemia in Europa
- ✓ La sua frequenza è aumentata molto rapidamente nel tempo, fino a soppiantare quasi del tutto la variante originale
- ✓ D614G si ritrova oggi nella totalità dei casi sequenziati



E' ormai stabilito il nesso causale tra D614G ed un incremento di fitness -> maggiore capacità replicativa nei tessuti -> maggiore trasmissibilità intrinseca ->  $R_0$  più alto

# Alfa, beta e gamma: le prime VOC



# Alfa, beta e gamma: caratteristiche condivise

- **Epidemiologiche**: rapida diffusione con vantaggio competitivo rispetto alle varianti precedenti, grandi picchi di contagi e decessi in diversi contesti geografici
- **Genetiche**: accumulo di un numero considerevole di mutazioni non sinonime, in particolare nella proteina spike
- **Convergenza evolutiva (omoplasia)**: N501Y (tutte e 3), E484K (beta + gamma)  
K417N/T (beta + gamma)

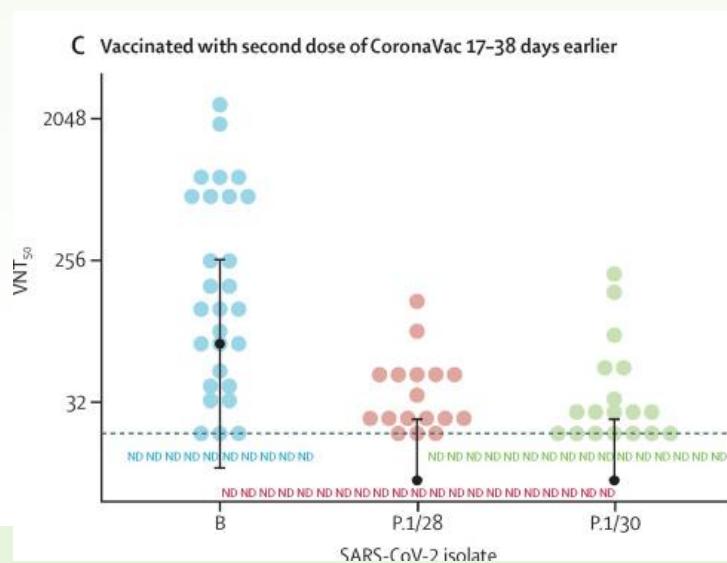
	B.1.1.7	B.1.351	P.1
Alternate name	501Y.V1	501Y.V2	501Y.V3
Country identified	United Kingdom	South Africa	Brazil
Mutations	23	21	17
Spike mutations	8	9	10
Key RBD, spike mutations beyond N501Y in all	E69/70 deletion, P681H 144Y deletion, A570D	E484K, K417N, orf1b deletion	E484K, K417T, orf1b deletion
Other mutations, including N-terminal	T7161, S982A, D1118H	L18F, D80A, D215G, Δ242-244, R264I, A701V	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T10271

**Chiaro incremento di fitness rispetto alle varianti precedenti**, ma per quale motivo?

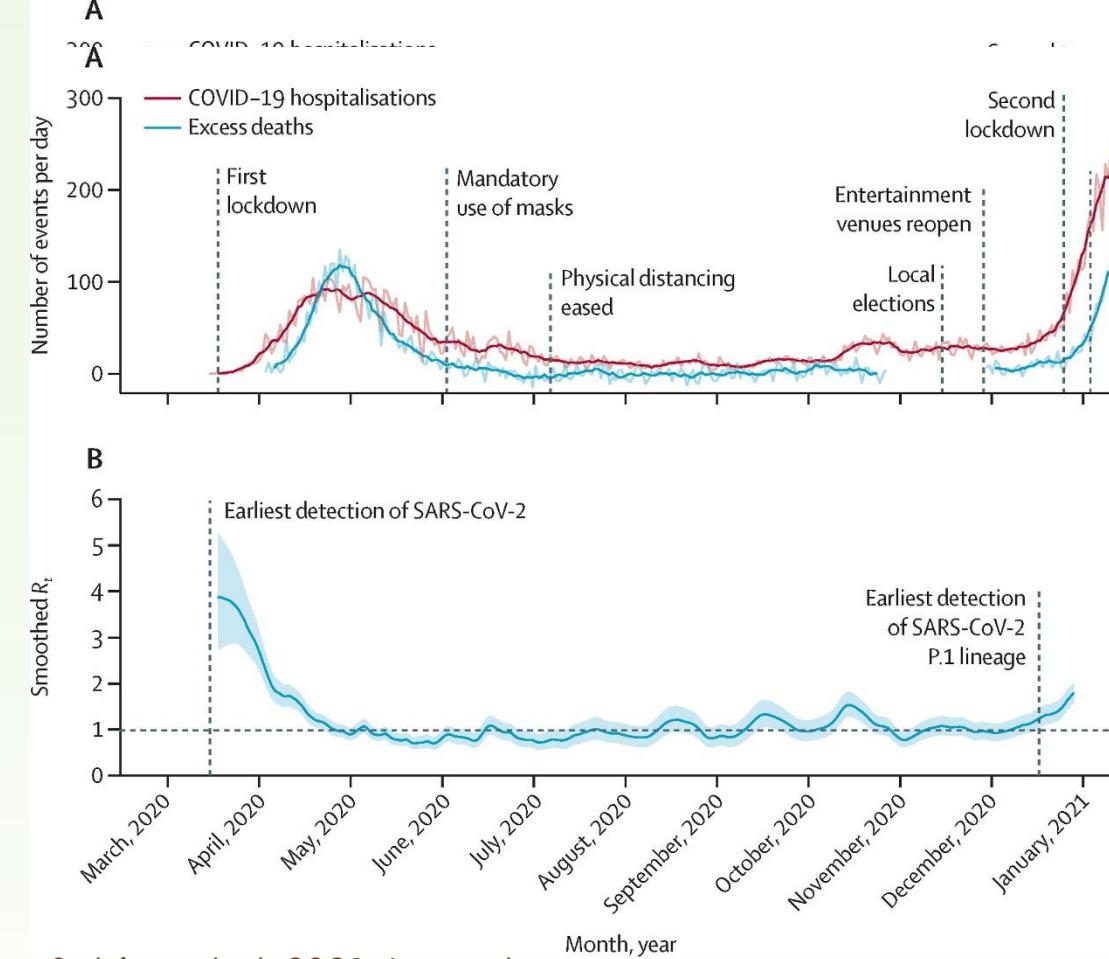
Quale è il contributo della trasmisibilità intrinseca? Quale quello dell'evasione immunitaria?

# Il caso di gamma in Brasile

- ✓ Emergenza iniziale nella zona di Manaus, in Amazzonia
- ✓ Associata ad un rapido aumento nel numero di casi, ricoveri e decessi in una zona già fortemente colpita dalla pandemia nei mesi precedenti
- ✓ **«Triplo mutante» RBD: K417T, E484K e N501Y:** quasi identiche alla variante beta, il che implica simili proprietà biologiche



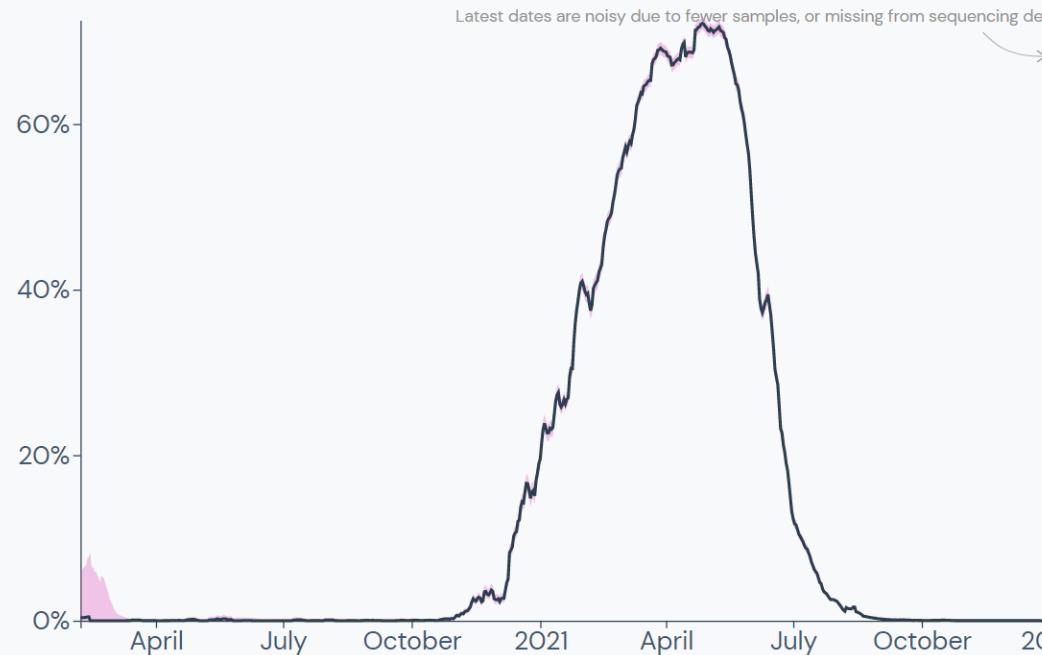
Souza et al. 2021, Lancet



Sabino et al. 2021, Lancet

- ✓ **Timori relativi all'evasione immunitaria**: riduzione significativa del titolo neutralizzante del siero di soggetti vaccinati o guariti
- ✓ Quanto frequenti sono le reinfezioni?

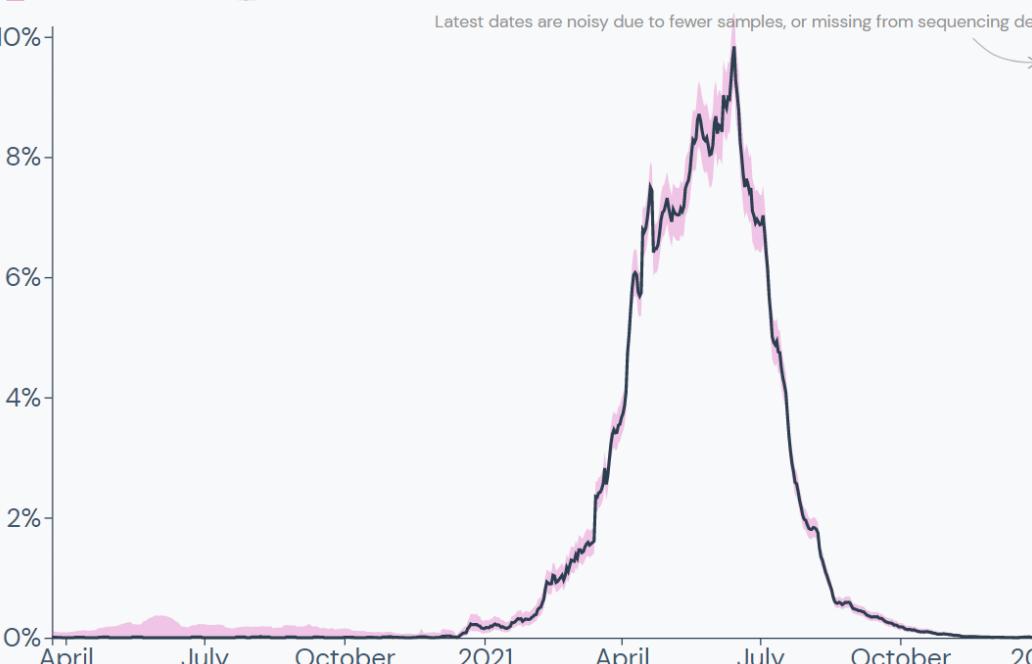
— 7 day rolling average of percent of Alpha-positive sequences  
■ 95% confidence interval  
▨ missing recent data



— 7 day rolling average of percent of Beta-positive sequences  
■ 95% confidence interval  
▨ missing recent data



— 7 day rolling average of percent of Gamma-positive sequences  
■ 95% confidence interval  
▨ missing recent data



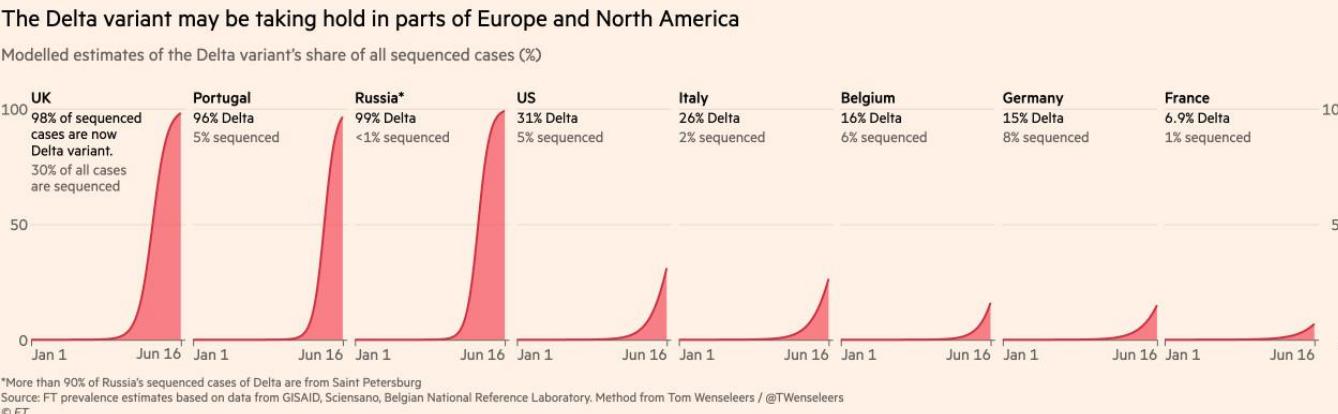
**Le tre VOC sono oggi quasi del tutto scomparse ed il crollo della loro frequenza è stato tanto rapido quanto lo era stato l'aumento in precedenza**

**Come è possibile spiegare questo trend?**

**Che cosa ha rimpiazzato alfa, beta e gamma?**

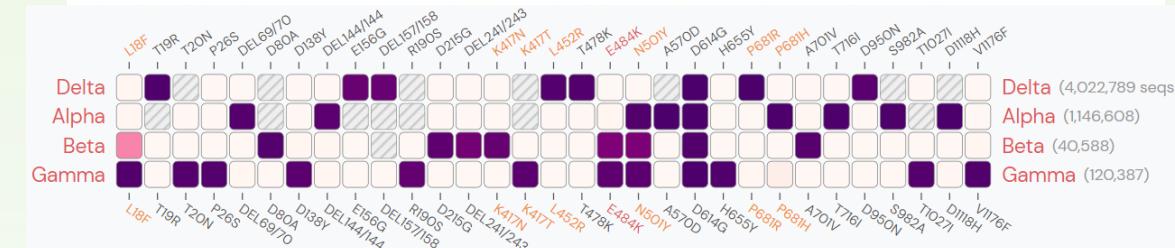
# L'ascesa mondiale di Delta

- ✓ **Rapida diffusione in India ed esportazione in tutto il mondo**
- ✓ Evidente vantaggio competitivo vs alfa, beta, gamma e tutte le altre varianti
- ✓ **Delta è stata la variante con il maggior impatto epidemiologico** (prima di omicron)
- ✓ Inizio novembre 2021 -> oltre il **98%** dei casi mondiali



## Article

### Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation



- ✓ Pattern di mutazioni DIVERSO da alfa, beta e gamma
- ✓ NO N501Y, NO E484K
- ✓ Presenti **L452R + T478K + P681R**

### Contributo dell'evasione immunitaria limitato, MA...

**Altissima capacità replicativa, cariche virali più elevate, aumento di R<sub>0</sub>**

# I tanti falsi allarmi: un problema di comunicazione

## Covid, a Varese scoperta rarissima variante: finora un solo caso in Thailandia

Identificata nel Laboratorio di microbiologia dell'Asst Sette Laghi

**Covid-19, la variante milanese fa paura: cosa cambia e come reagisce il corpo**

SALUTE > RICERCA

**Nuova variante Francia, il ceppo bretone sfuggito ai test: «È da monitorare»**

**Variante nigeriana in Italia: "Ha parecchie mutazioni, la stiamo studiando.."**

## Coronavirus, scoperta la variante veneta

*Oltre a quella inglese, nella nostra regione circolano altre due tipologie che paiono autoctone. Ad individuarle e studiarle l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie di Legnaro*

CRONACA

## "Isolato ceppo serbo del coronavirus, è molto aggressivo", dice Zaia

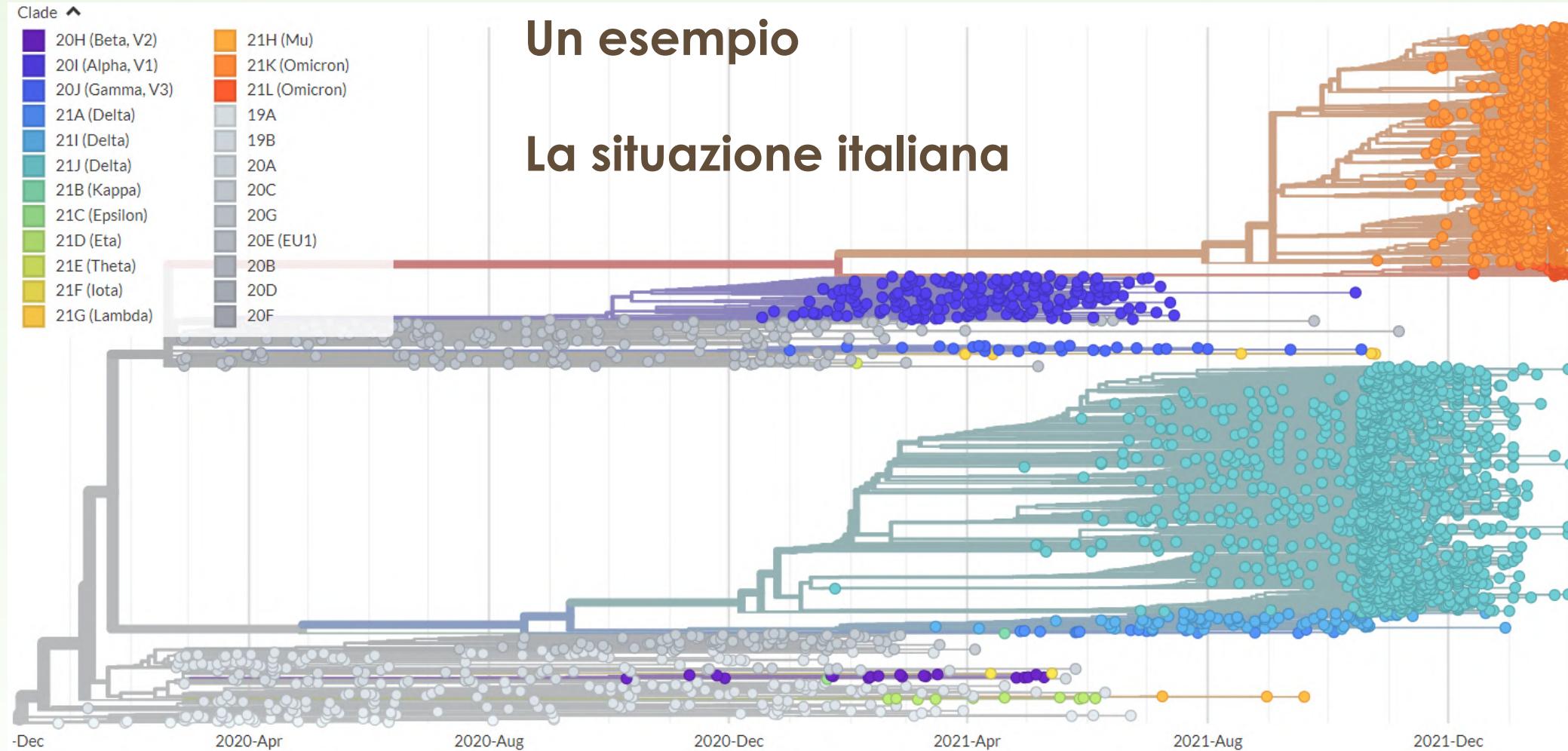
Il governatore del Veneto: "Il virus è appartenente al cluster serbo ed è ben diverso da quello isolato in Veneto e in Italia"

**Covid, cos'è la nuova super variante italiana e perché preoccupa**

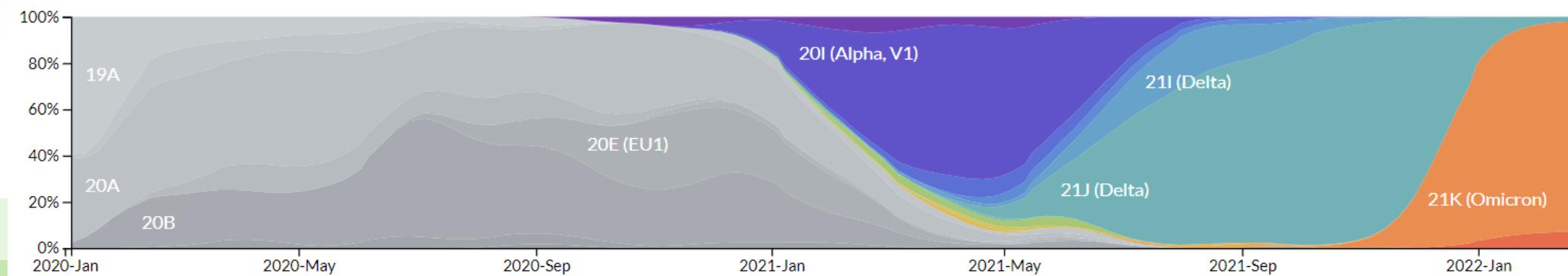
Il vaccino anti Covid potrebbe non essere efficace sulla nuova variante del coronavirus scoperta in una paziente in Piemonte

**Covid19, c'è anche la variante finlandese (con un problema in più)**

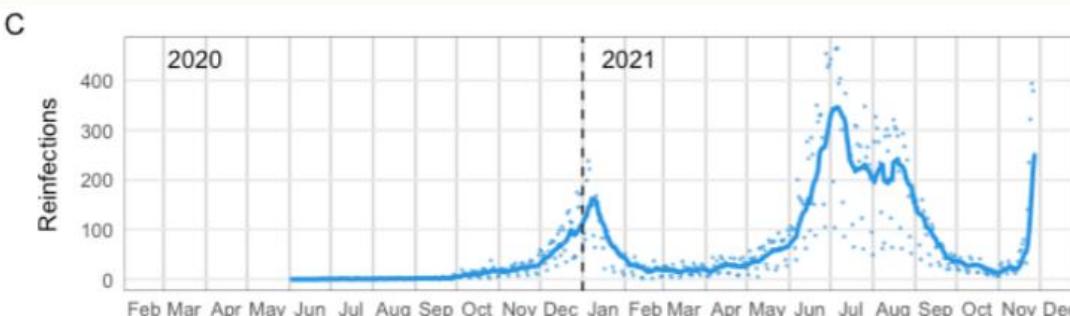
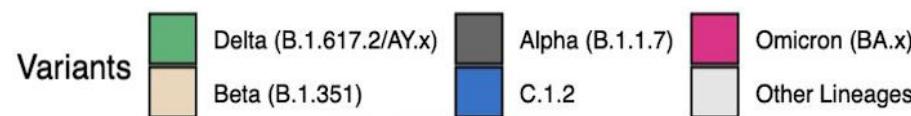
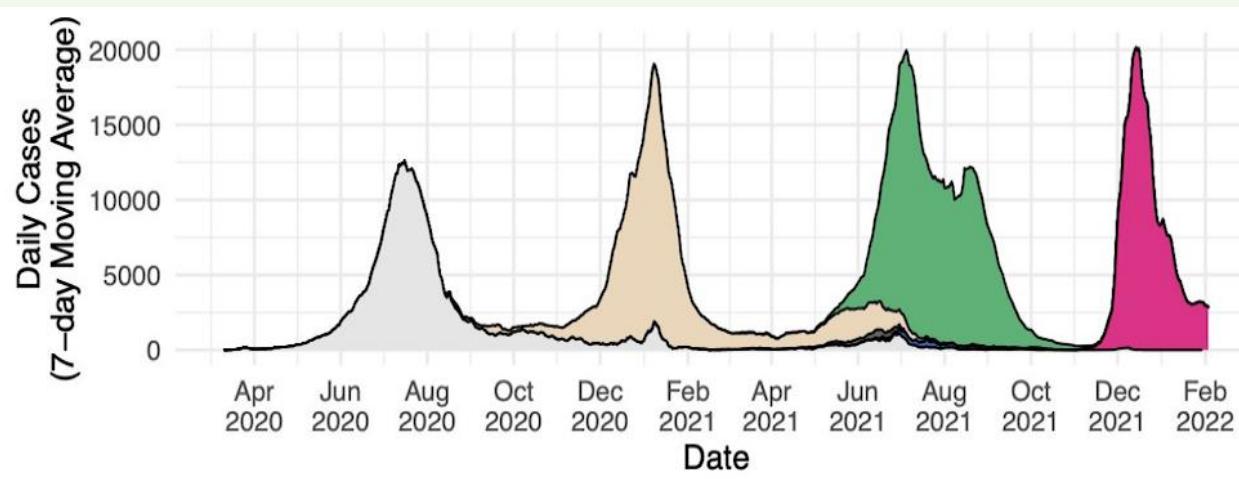
LA SCOPERTA DI UN LABORATORIO DI HELSINKI



Frequencies (colored by Clade)

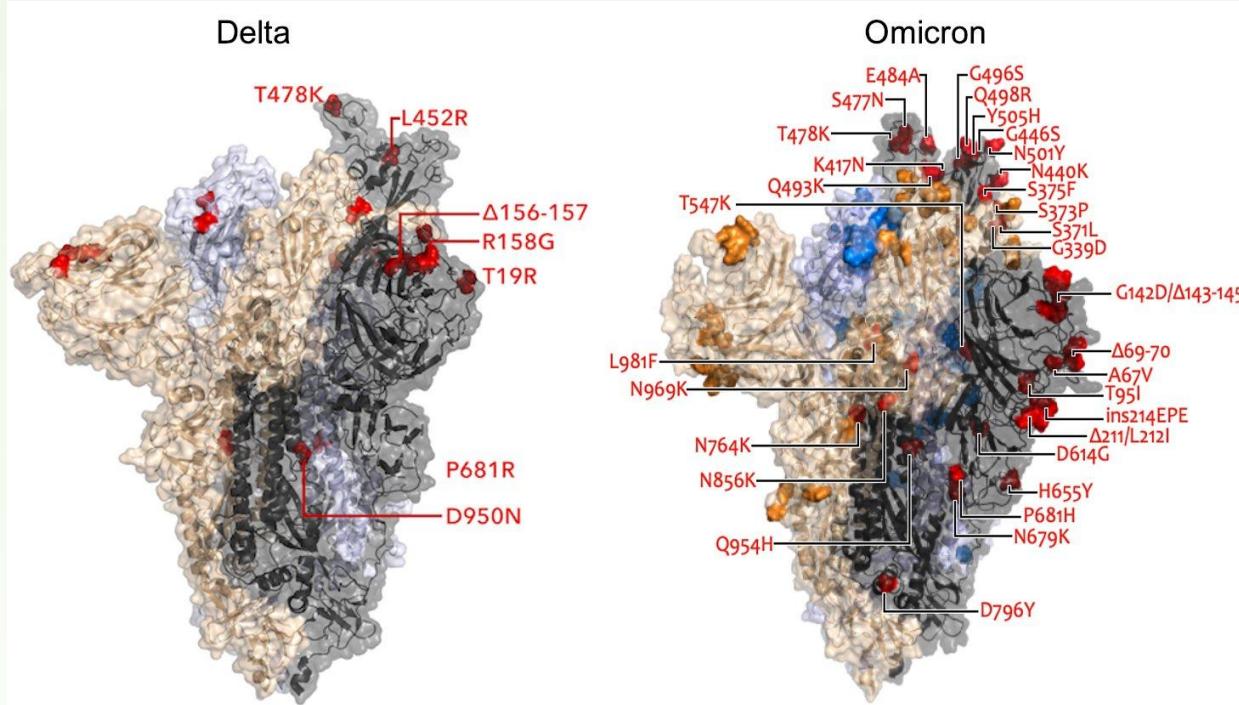


# Sud Africa – il contesto in cui è «nata» omicron

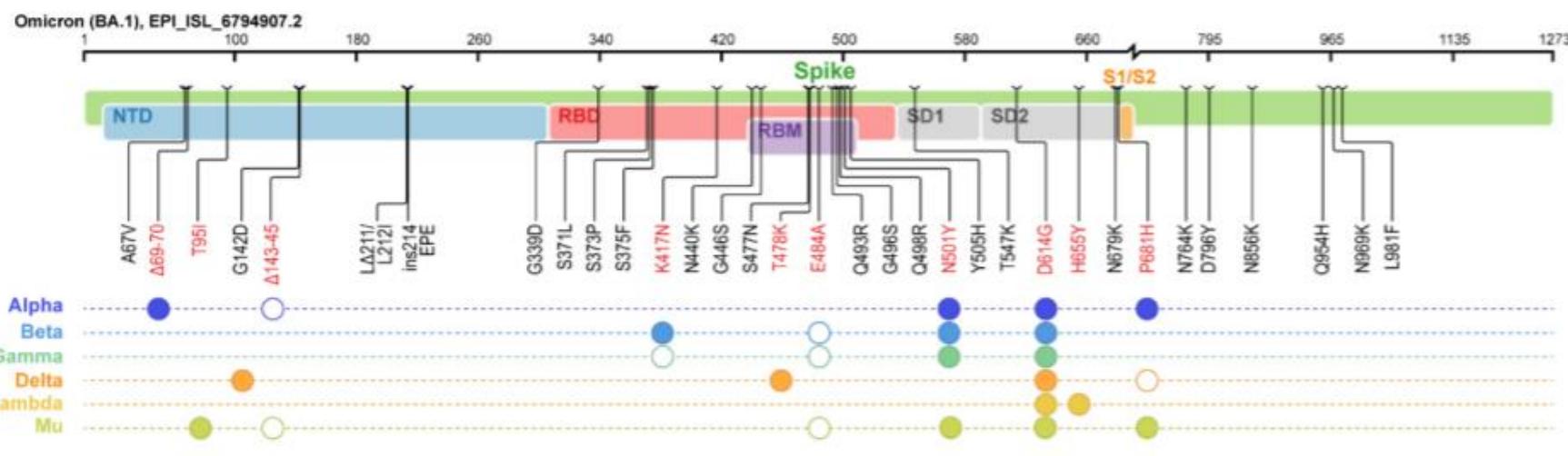


- Tre importanti ondate precedenti (virus «originale», beta e delta)
- **Sieroprevalenza molto alta nella popolazione (80%)**
- **Tasso di vaccinazione molto basso (25%)**
- **Rapido aumento nel numero dei casi, accompagnato dalla sostituzione di delta con omicron**
- **Quarta ondata «inattesa» -> probabili reinfezioni? (confermate molto rapidamente, Pulliam et al.)**

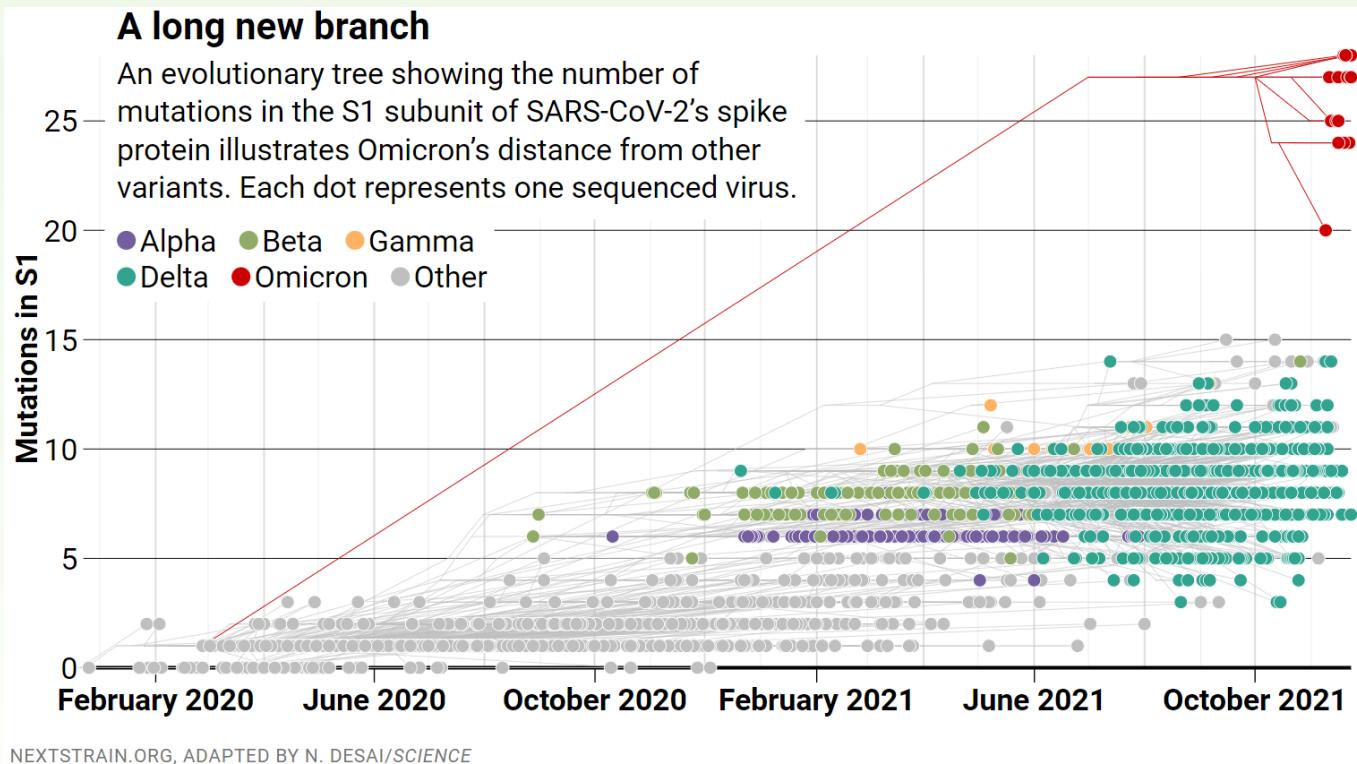
# Omicron – il profilo delle mutazioni della proteina spike



- Numero molto elevato di mutazioni, spesso condivise da altre VOI e VOC
- **Mutazioni del NTD** → evasione immunitaria
- **Mutazioni del RBD** → miglior legame di ACE2 + evasione immunitaria
- Mutazioni vicine al «sito polibasico» di taglio furinico → maggiore trasmissibilità



# La proteina spike di omicron mostra forti segnali di selezione positiva

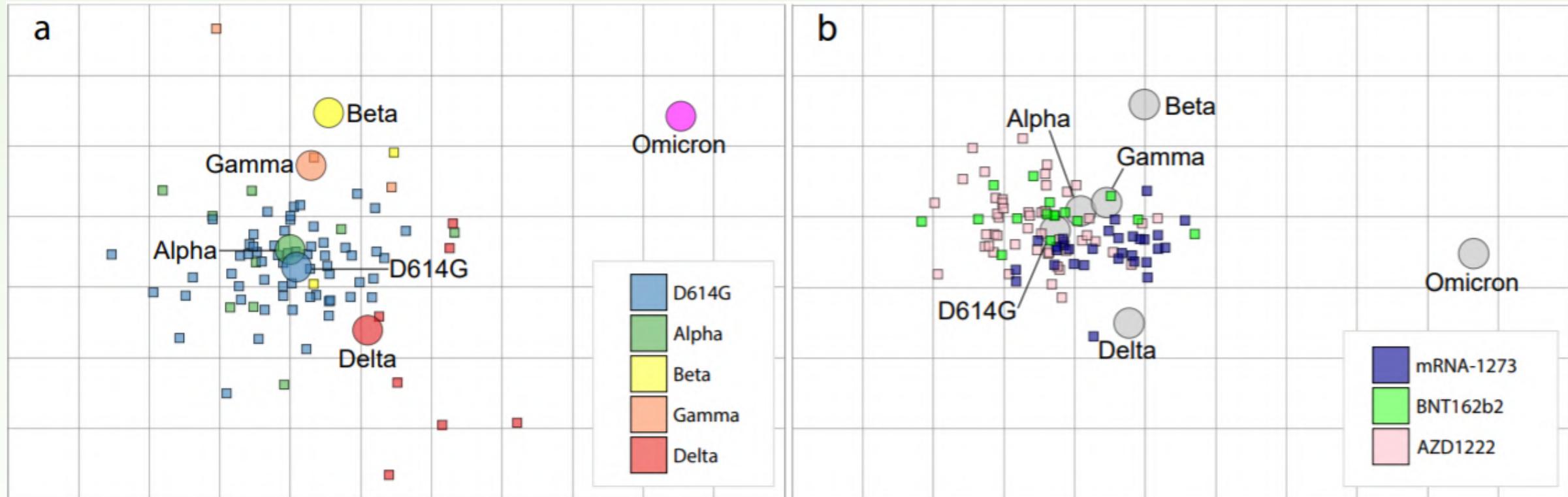


Ci sono tracce di ipervariabilità in corrispondenza di epitopi riconosciuti dagli anticorpi

E' probabile che il sistema immunitario dell'ospite abbia giocato un ruolo fondamentale nell'evoluzione di omicron

- La maggior parte delle VOC e VOI mostra poche (<15) mutazioni nella regione S1
- Omicron ne ha più di 20, più alcune **delezioni** ed una **inserzione**
- Alcuni virus dei pipistrelli sono più simili al virus di Wuhan di quanto non lo sia omicron!
- Molte mutazioni di omicron sono «inusuali» e non si trovano né in altre varianti, né in altri betacoronavirus dei pipistrelli

# Omicron appartiene ad un nuovo «cluster antigenico»

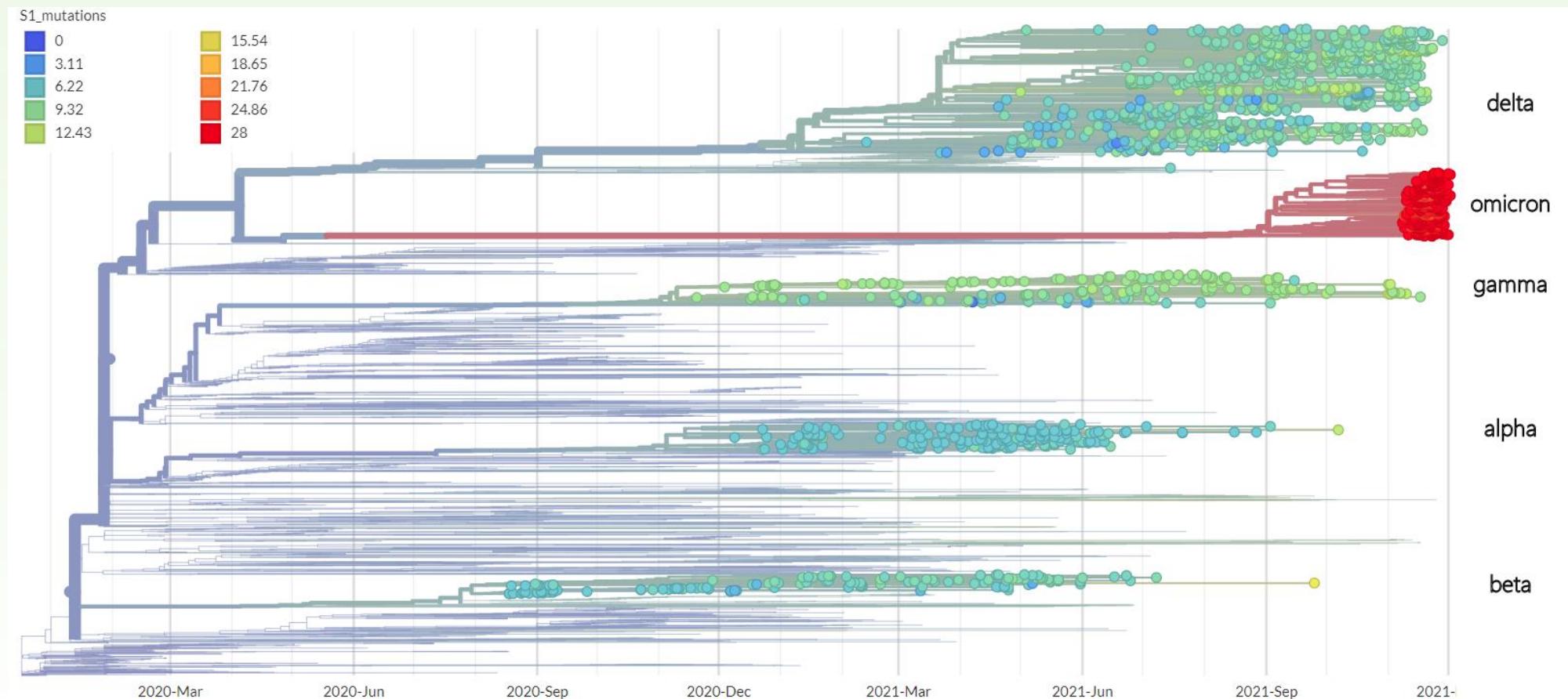


Van der Straten et al. 2022, Medrxiv

I risultati di studi *in vitro* indicano una riduzione significativa del titolo anticorpale del siero di pazienti guariti da precedente infezione oppure vaccinati

Questo avviene in misura molto superiore a quanto non fosse avvenuto in precedenza per le altre varianti -> la «distanza antigenica» di omicron suggerisce che sia opportuno mettere a punto **vaccini aggiornati**

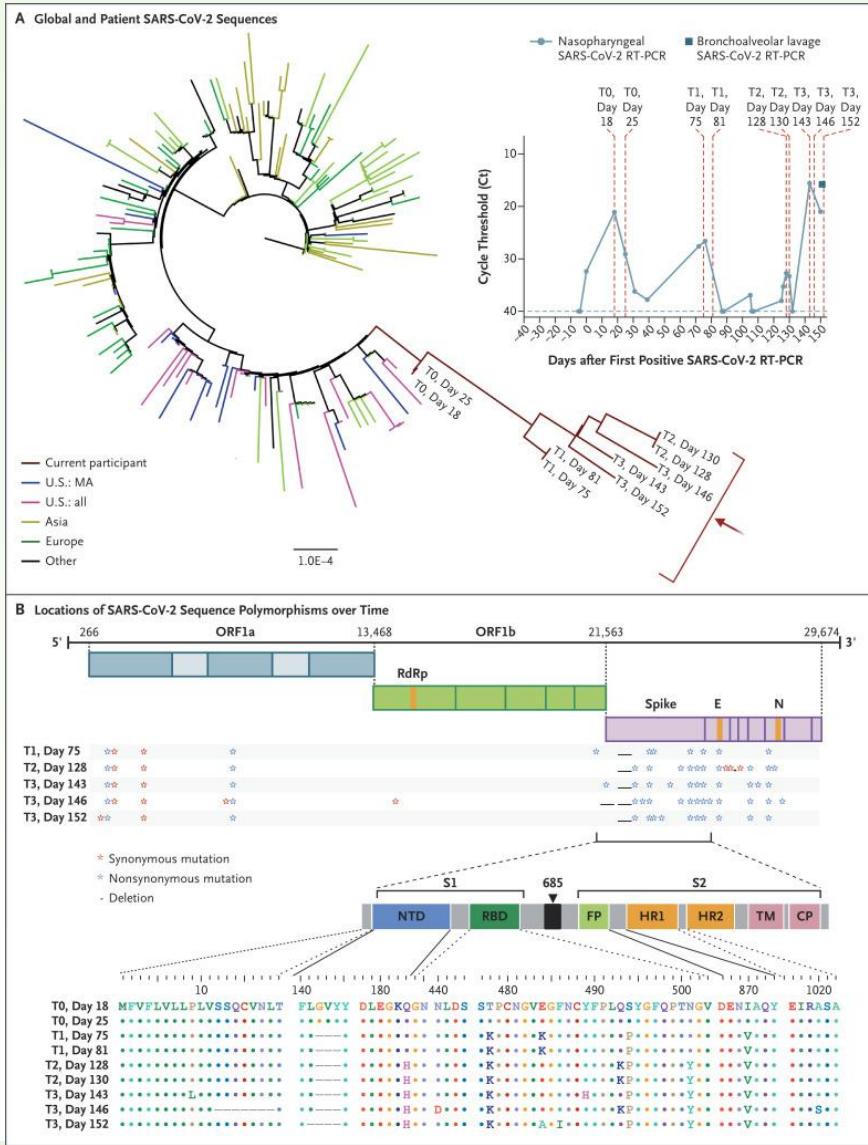
# Le «strane» origini di omicron



Non c'è alcuna chiara relazione con le altre principali varianti che ci hanno fatto compagnia in questi 2 anni è molto distante. **Origini molto lontane nel tempo, metà del 2020?**

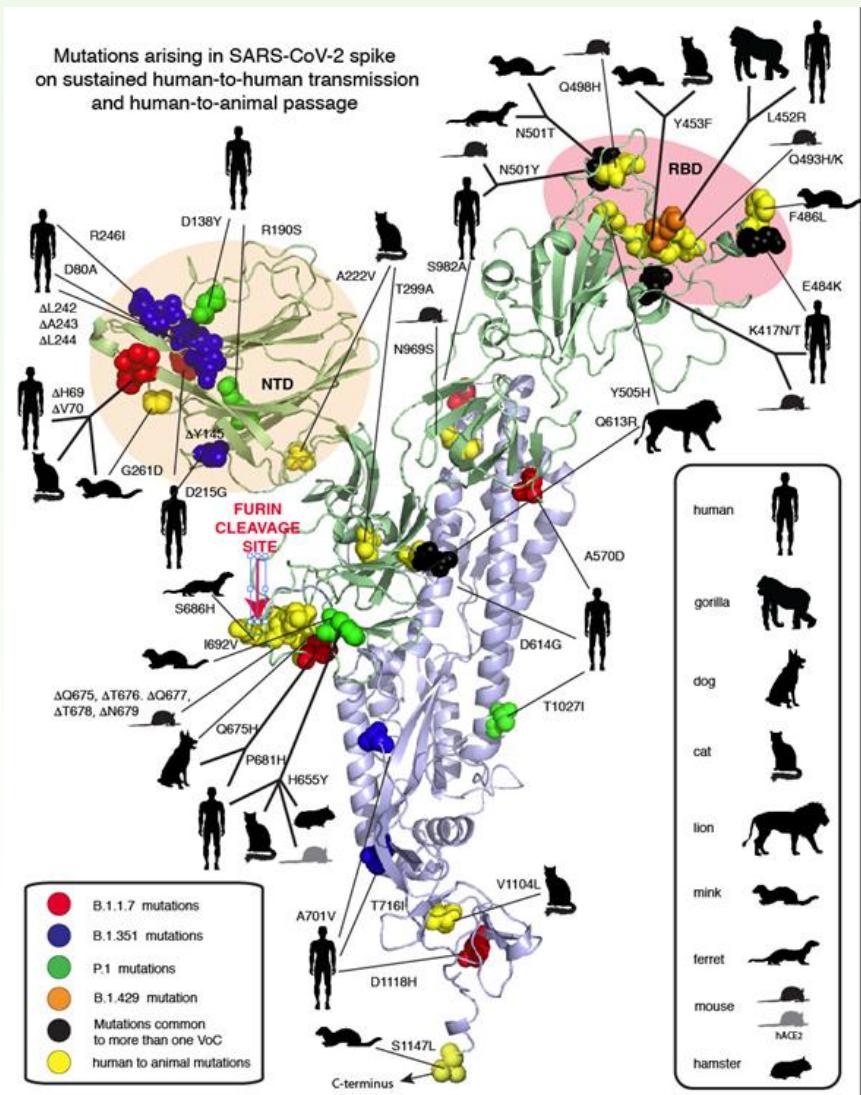
**Domanda chiave: come è possibile che non ci siamo accorti della sua esistenza per oltre 12 mesi?**

# Ipotesi #1: selezione in un paziente immunocompromesso



- Infezioni di lunghissima durata (oltre 200 giorni) sono state documentate occasionalmente
- **Pazienti affetti da HIV** (molto comuni in Africa), pazienti con **cancro** or sottoposti a **terapie immuno-soppressive**
- Condizioni spesso combinate con trattamenti terapeutici poco efficienti (plasma iperimmune, Remdesivir, etc.)
- Questo può portare a forti pressioni selettive -> accumulo di mutazioni immuno-evasive
- **Queste forze selettive sono molto diverse da quelle che agiscono sulla trasmissione inter-personale**

## Ipotesi #2: selezione in un serbatoio animale



- Diverse mutazioni di omicron sono state **precedentemente osservate in altri animali**, favorendo un migliore legame con ACE2 (N501Y in topi e ratti)
- Alcuni ospiti animali sono molto suscettibili all'infezione da parte di SARS-CoV-2** (visoni in Danimarca, cervi della Virginia, ecc.)
- Zoonosi inversa nel 2020?**: trasmissione uomo -> animale
- Selezione nel nuovo ospite animale** -> circolazione «sotto traccia» di omicron per molti mesi
- Evento recente di **zoonosi secondaria**: trasmissione animale -> uomo



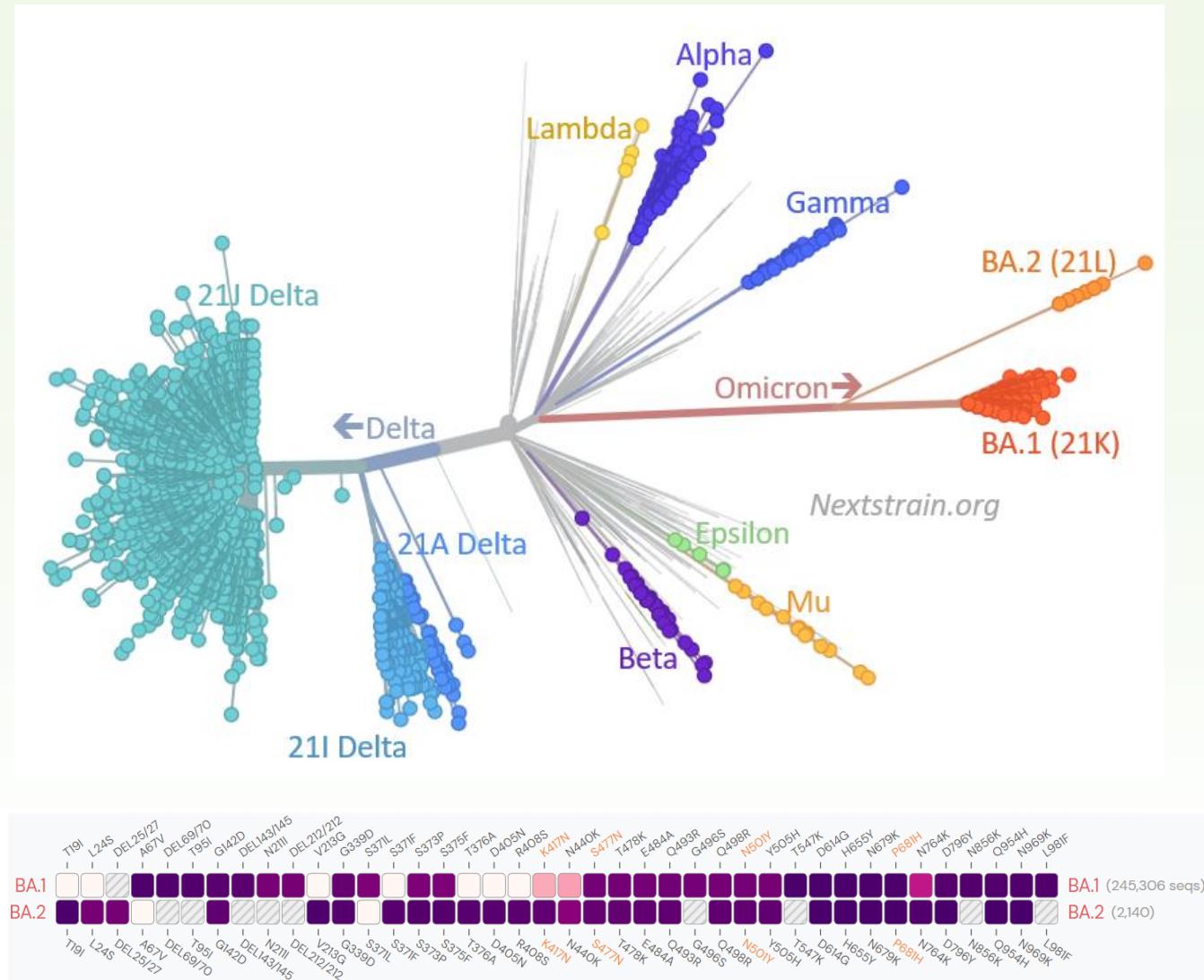
Original research

### Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant

Changshuo Wei <sup>a, b, 1</sup>, Ke-Jia Shan <sup>a, b, 1</sup>, Weiguang Wang <sup>a, b, 1</sup>, Shuya Zhang <sup>a, b</sup>,  
Qing Huan <sup>a, \*</sup>, Wenfeng Qian <sup>a, b, \*</sup>

# Omicron non sarà il capolinea

- ✓ Omicron comprende già due lignaggi principali, **BA.1 e BA.2**
- ✓ BA.1 è il responsabile dell'attuale ondata e l'unico per cui siano disponibili dati funzionali
- ✓ BA.2 è diventato dominante in Danimarca e lo sta crescendo velocemente dovunque
- ✓ Maggiore trasmissibilità intrinseca di BA.2, no maggiore evasione immunitaria
- ✓ In futuro vedremo sicuramente altre varianti derivanti da omicron, ma non è certo che delta si estinguera del tutto



# Sarà necessario implementare un approccio one health

NEWS | 04 February 2022

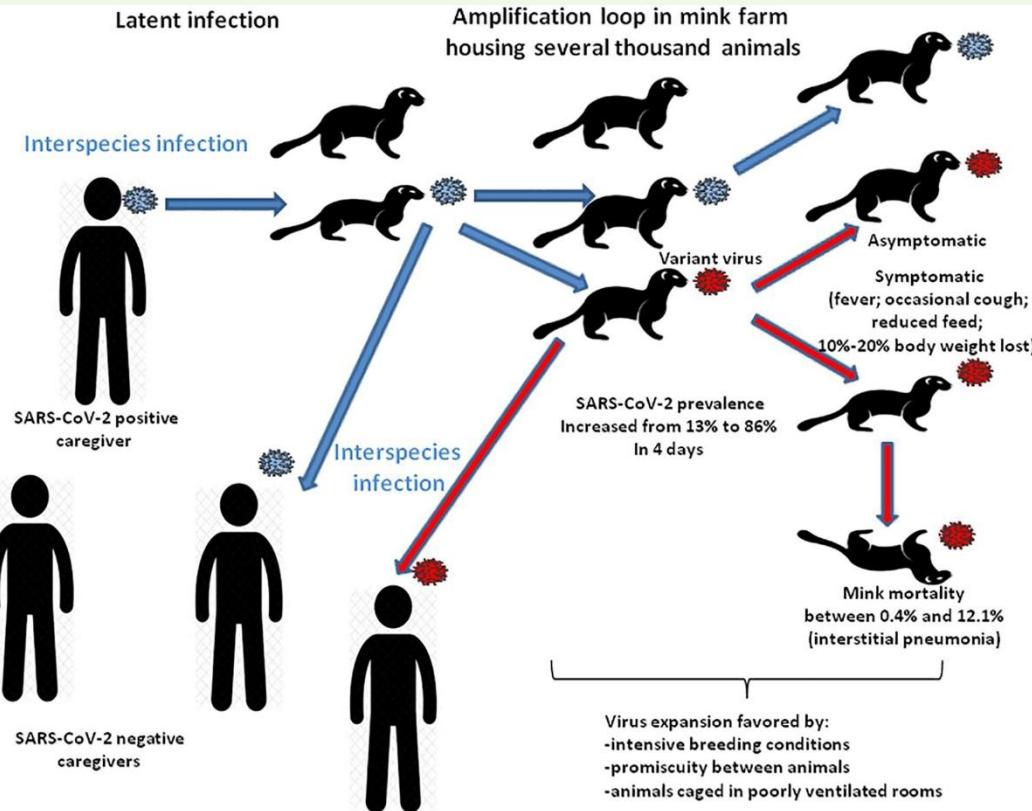
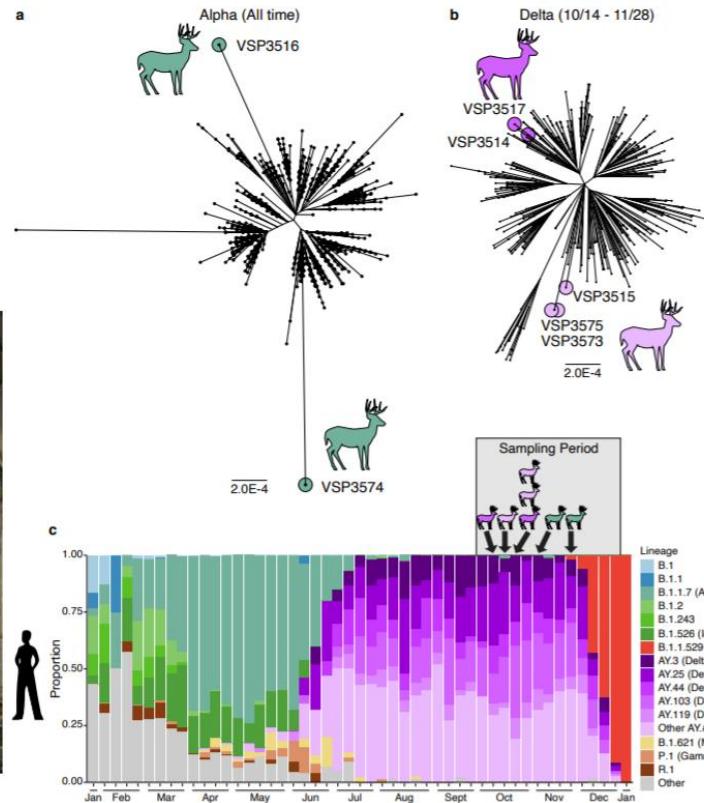
## How sneezing hamsters sparked a COVID outbreak in Hong Kong

Hamsters are only the second species known to have spread SARS-CoV-2 to humans.

Smriti Mallapaty



A suspected outbreak at a pet shop in January led to a hamster cull in Hong Kong. Credit: Chan Long Hei/Bloomberg/Getty

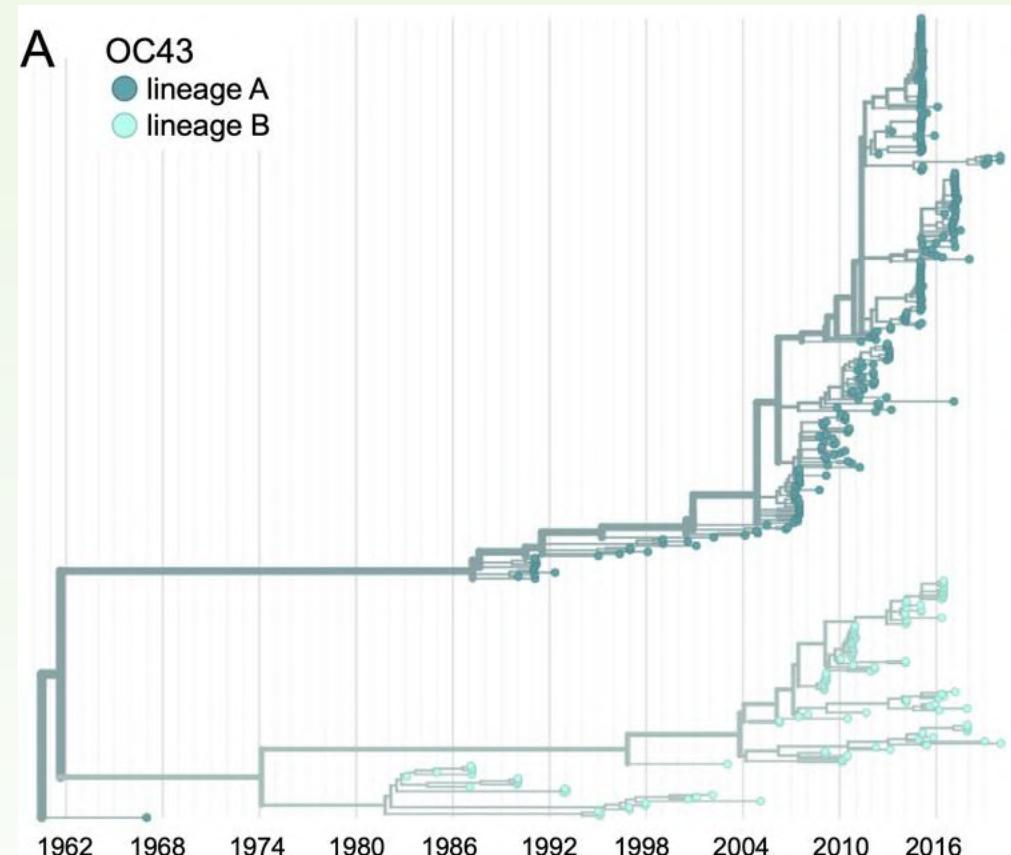


## A mysterious coronavirus variant has been found in New York City wastewater — and no one knows where it came from

New York City officials observed a potential new variant in wastewater, but say it is no threat to people

# Che cosa ci riserverà il futuro?

- ✓ Non bisogna illudersi che possa essere raggiunta una **«stasi evolutiva»**
- ✓ Continueranno ad essere selezionate mutazioni che garantiscono il raggiungimento di una **fitness più elevata in un determinato contesto**
- ✓ Il contesto cambia nel tempo: immunizzazione più diffusa, diverse strategie vaccinali, ecc.
- ✓ Ulteriori aumenti della trasmisività intrinseca dovrebbero dare scarsi vantaggi in termini di fitness -> **selezione nella direzione dell'evasione immunitaria?**



Kistler & Bedford, eLife 2021

**Non possiamo prevedere con certezza  
l'evoluzione futura di SARS-CoV-2**

Ma possiamo ipotizzare degli scenari possibili  
studiando ciò che è accaduto in passato