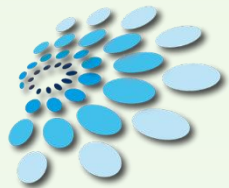




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI TRIESTE

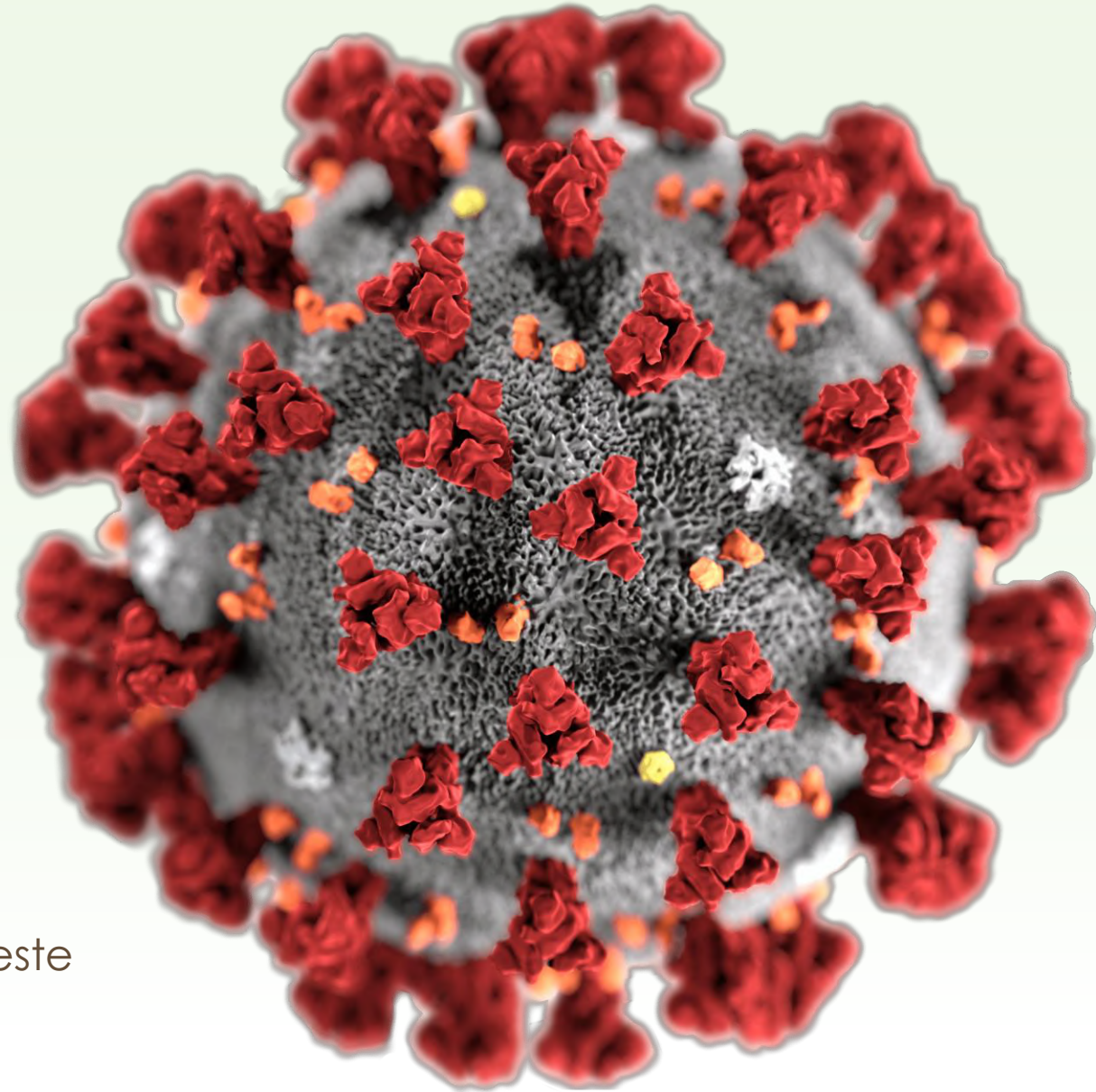


# SARS-CoV-2: una storia di zoonosi, varianti e sgradite sorprese

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



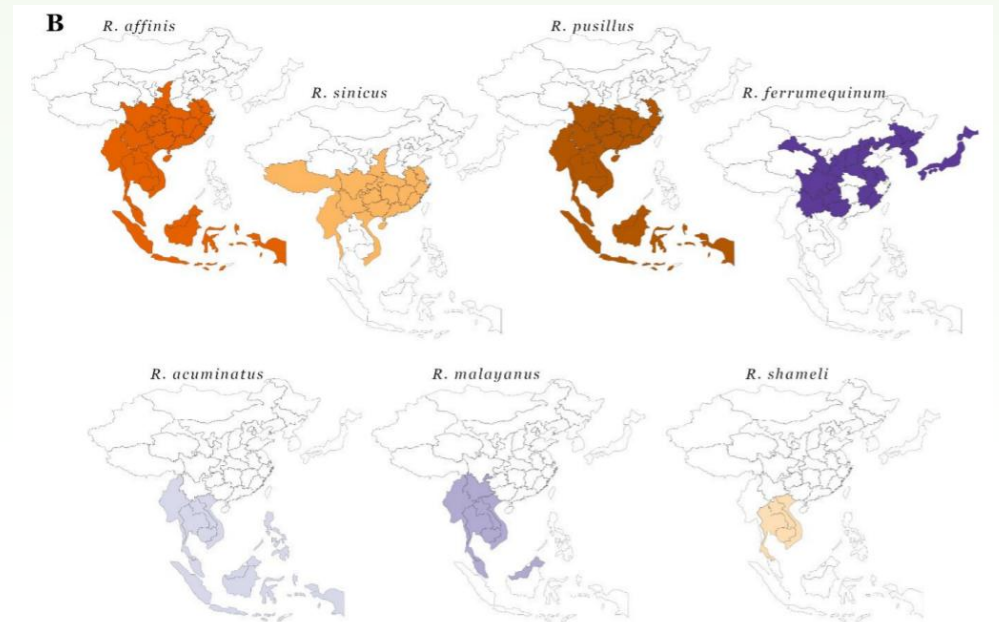
- I chirotteri sono il secondo gruppo animale più numeroso dopo i roditori
- Ampia distribuzione di pipistrelli del genere Rhinolophus nel sud-est asiatico
- Ampia sovrapposizione con aree densamente popolate dall'uomo

## Perspective

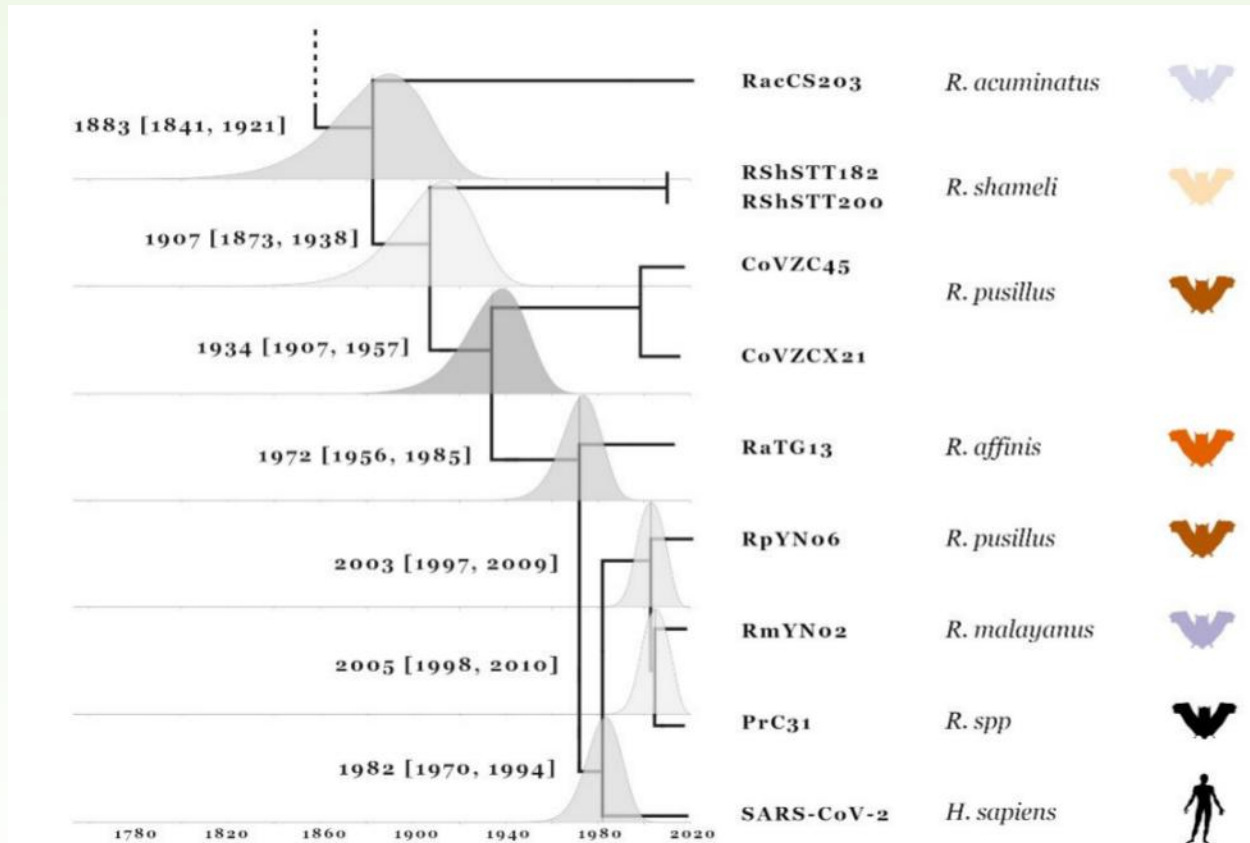
### Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir

<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</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»



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




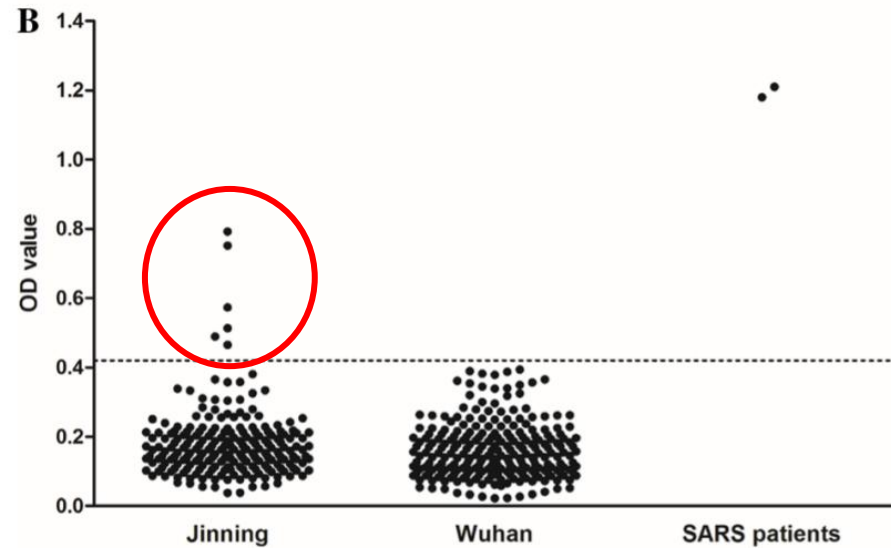
- La nostra visione della biodiversità dei coronavirus dei pipistrelli è molto limitata
- Nuove spedizioni stanno via via colmando i «buchi evolutivi» che separano SARS-CoV-2 dai suoi cugini
- Studiare l'evoluzione di SARS-CoV-2 non è facile! **Frequenti eventi di ricombinazione**
- Bastano i pipistrelli 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>4</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**

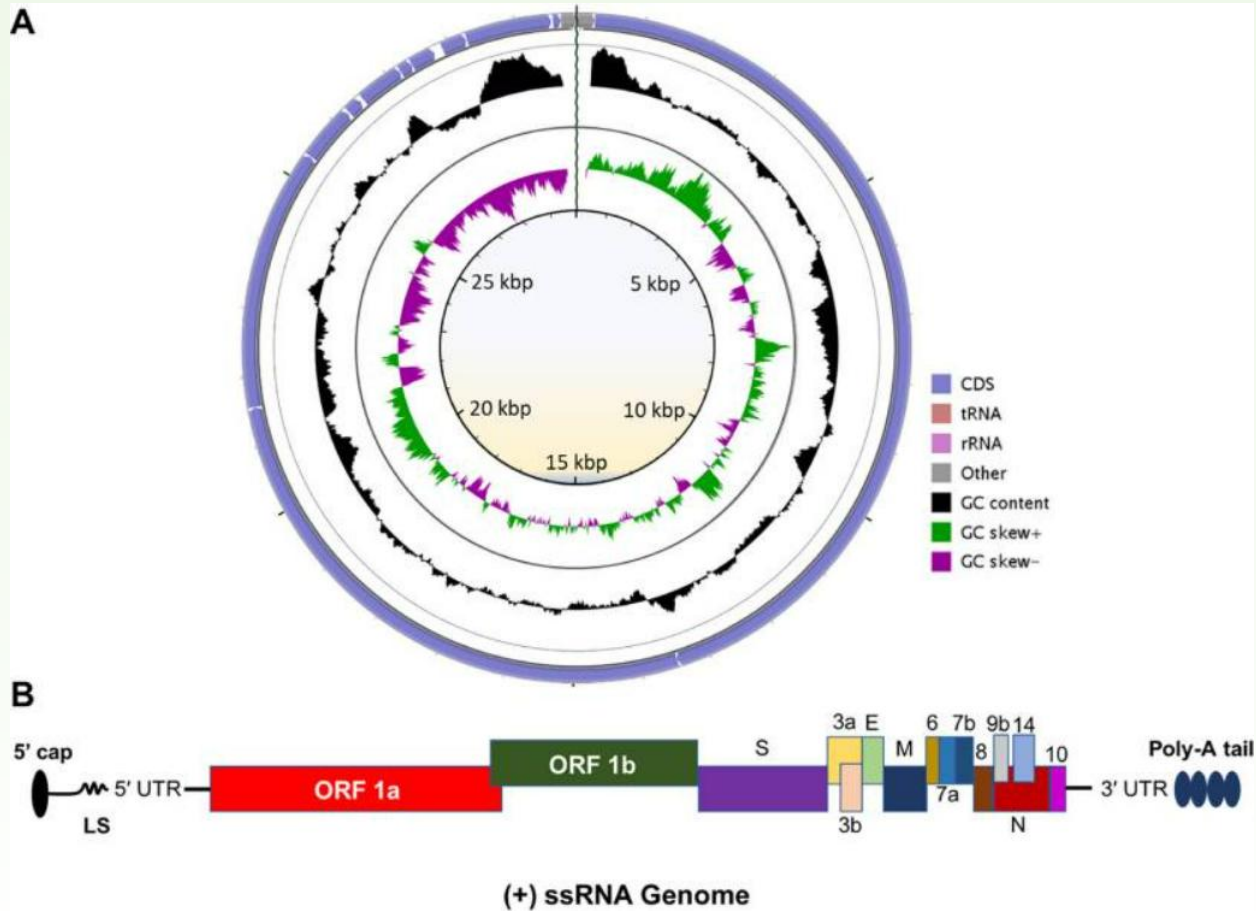
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>

**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

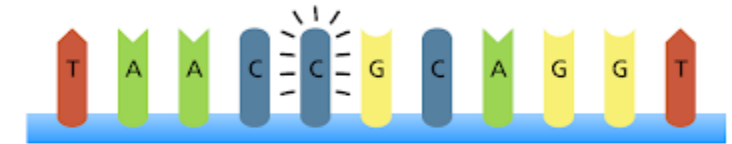
# Perché i virus mutano?

- ✓ 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

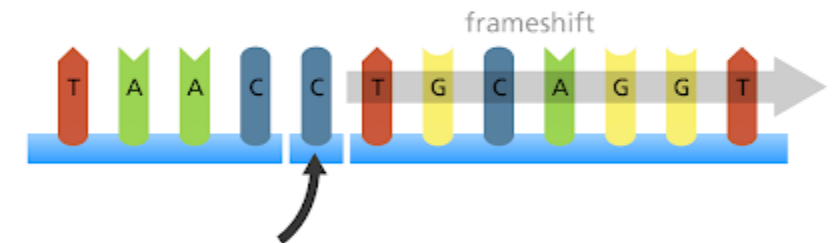
Original sequence



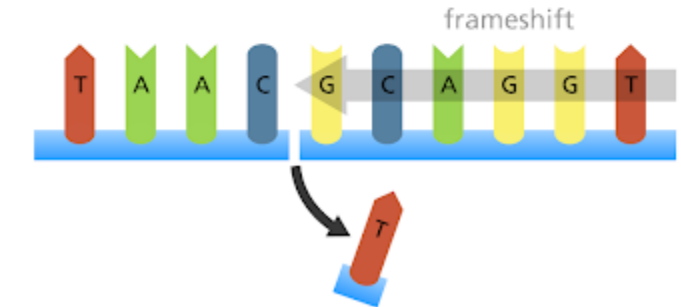
Base substitution



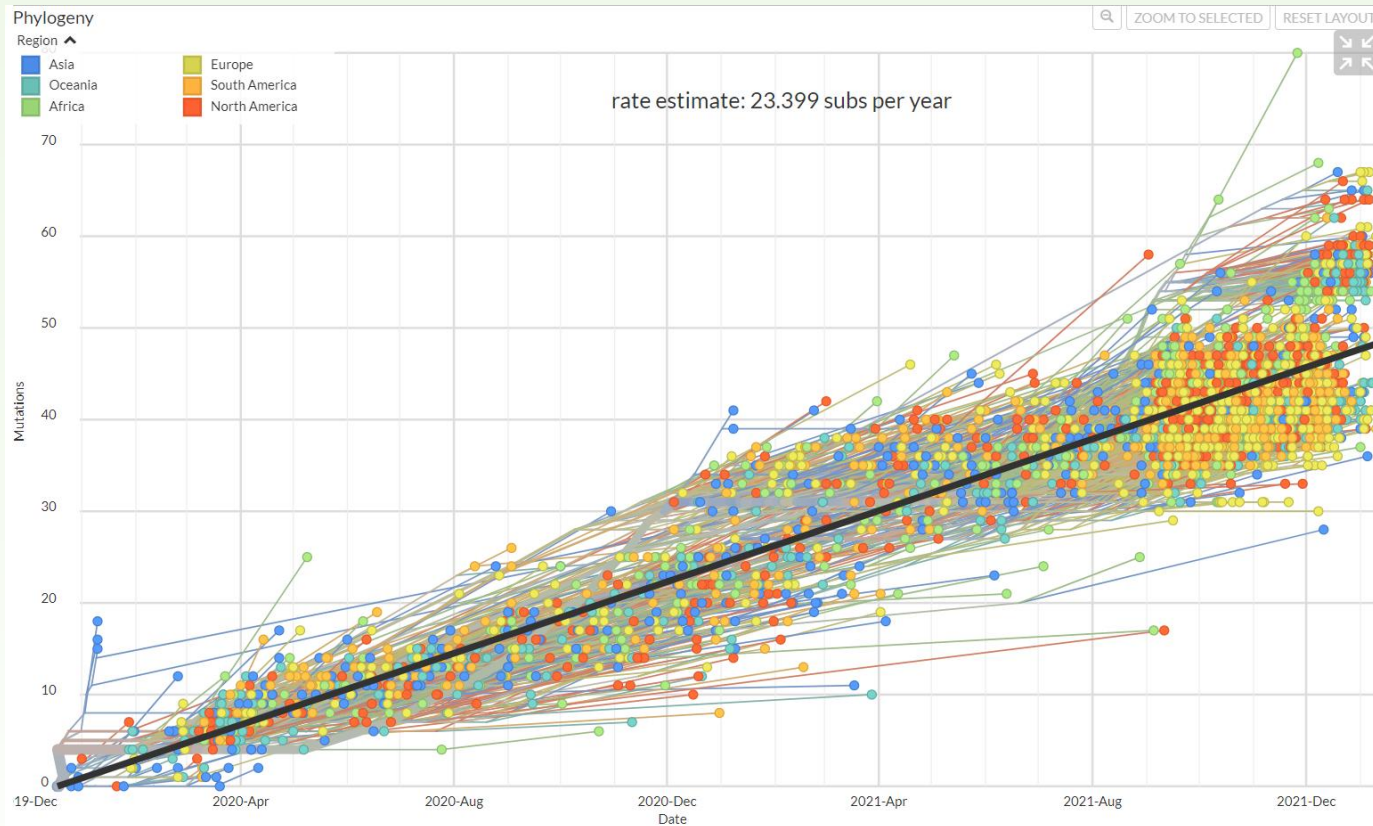
Base addition



Base deletion



# Quanto velocemente evolve SARS-CoV-2?



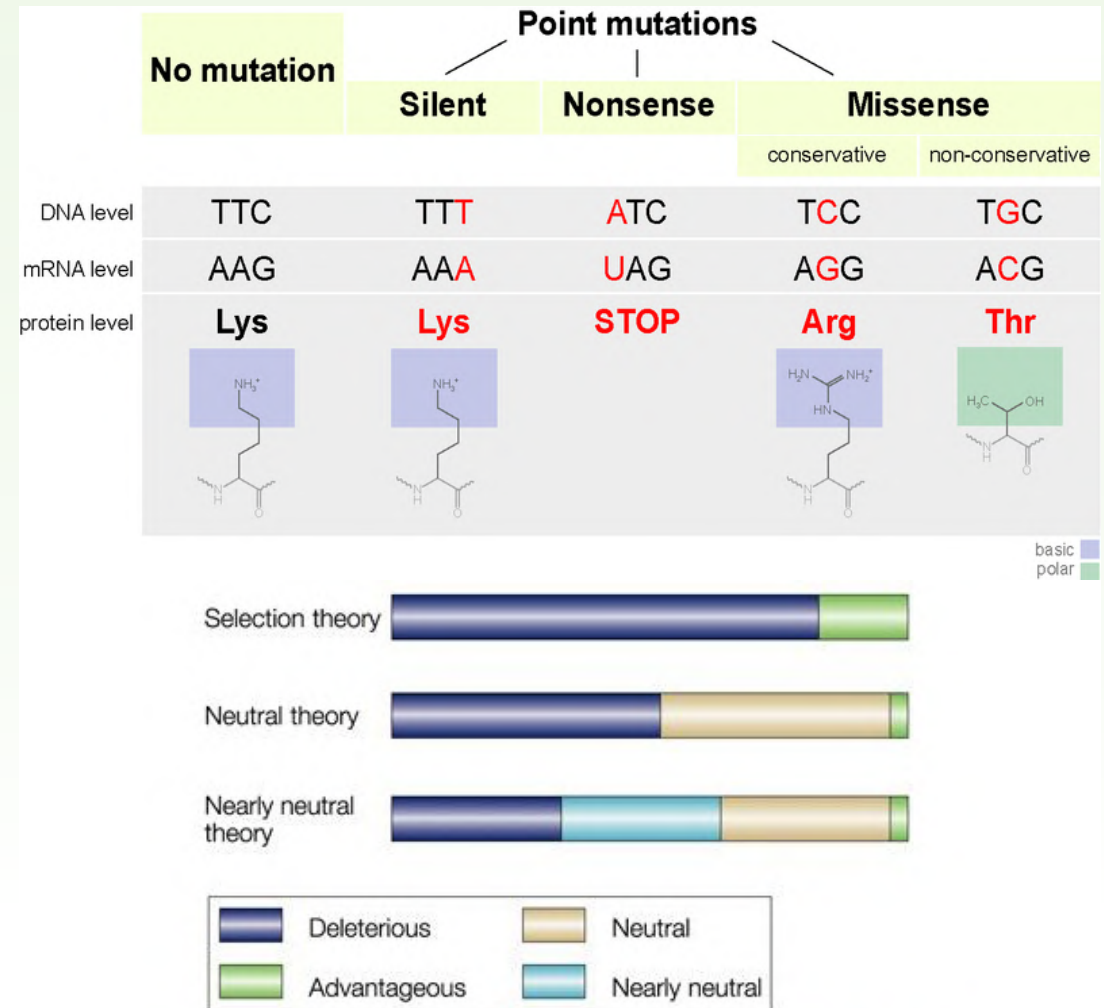
**~25 sostituzioni nucleotidiche all'anno (~2 al mese)**

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

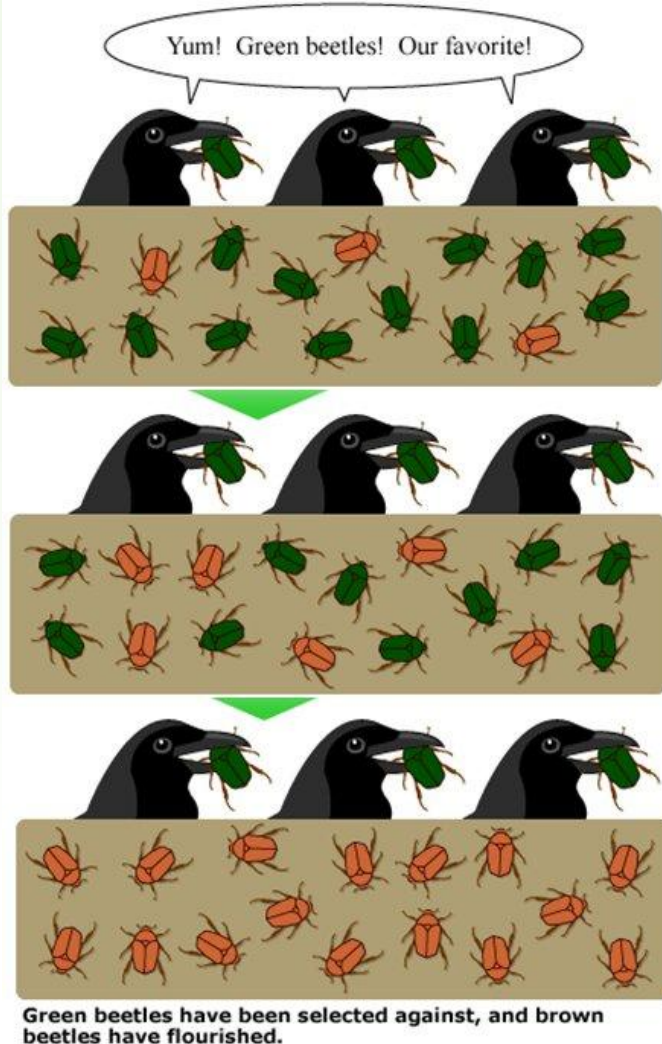
# Le mutazioni non sono tutte uguali

- ✓ 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)

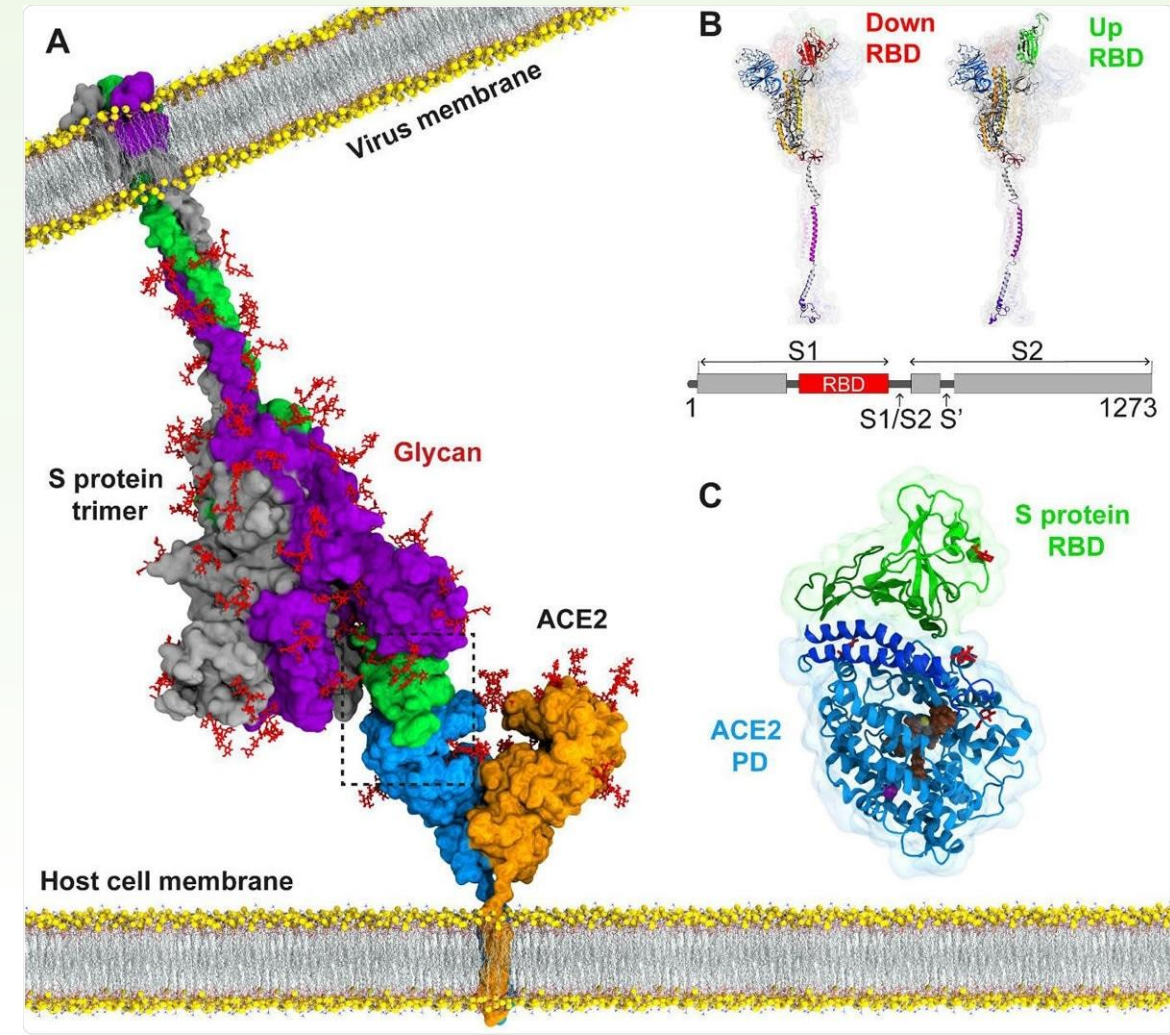
- ✓ I tratti fenotipici sono legati a caratteri genotipici (anche nei virus!)
- ✓ Individui in grado di sopravvivere meglio fino al raggiungimento dell'età riproduttiva saranno in grado di generare una **prole più numerosa**, a cui trasmetteranno il proprio patrimonio genetico
- ✓ Con il passare delle 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?

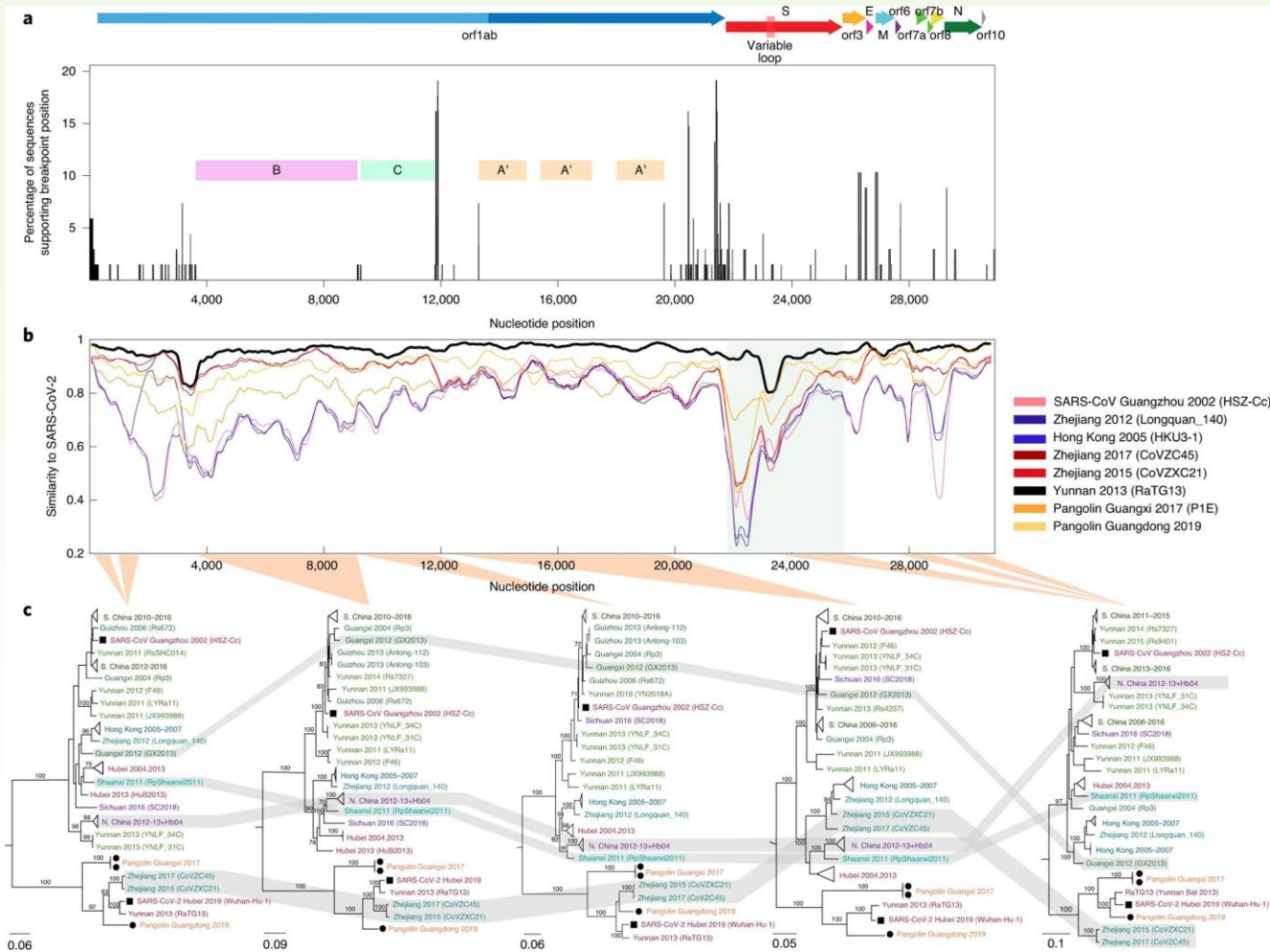
- ✓ **Migliore interazione tra spike ed il recettore ACE2** -> ingresso più efficiente nella cellula dell'ospite
- ✓ **Migliore efficienza del taglio proteolitico** -> maggiore capacità replicativa nei tessuti dell'ospite
- ✓ **Utilizzo di vie alternative per l'ingresso nelle cellule dell'ospite** ->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

## Incremento della TRASMISSIBILITA' INSTRINSECA

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



# Il ruolo chiave della proteina spike nell'evoluzione virale



- ✓ 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 naive»

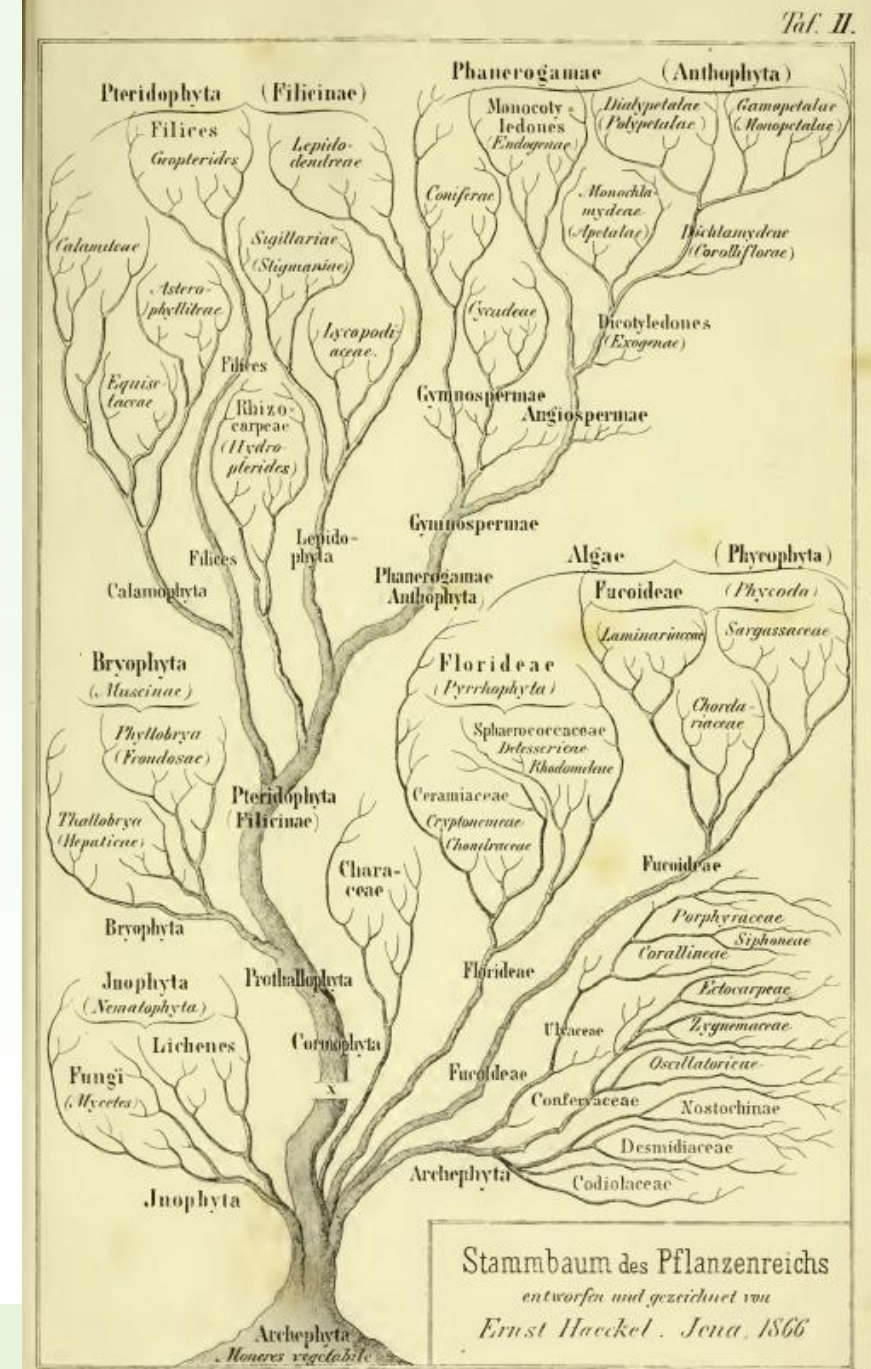
Molto importante in una popolazione con pochi soggetti suscettibili all'infezione

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

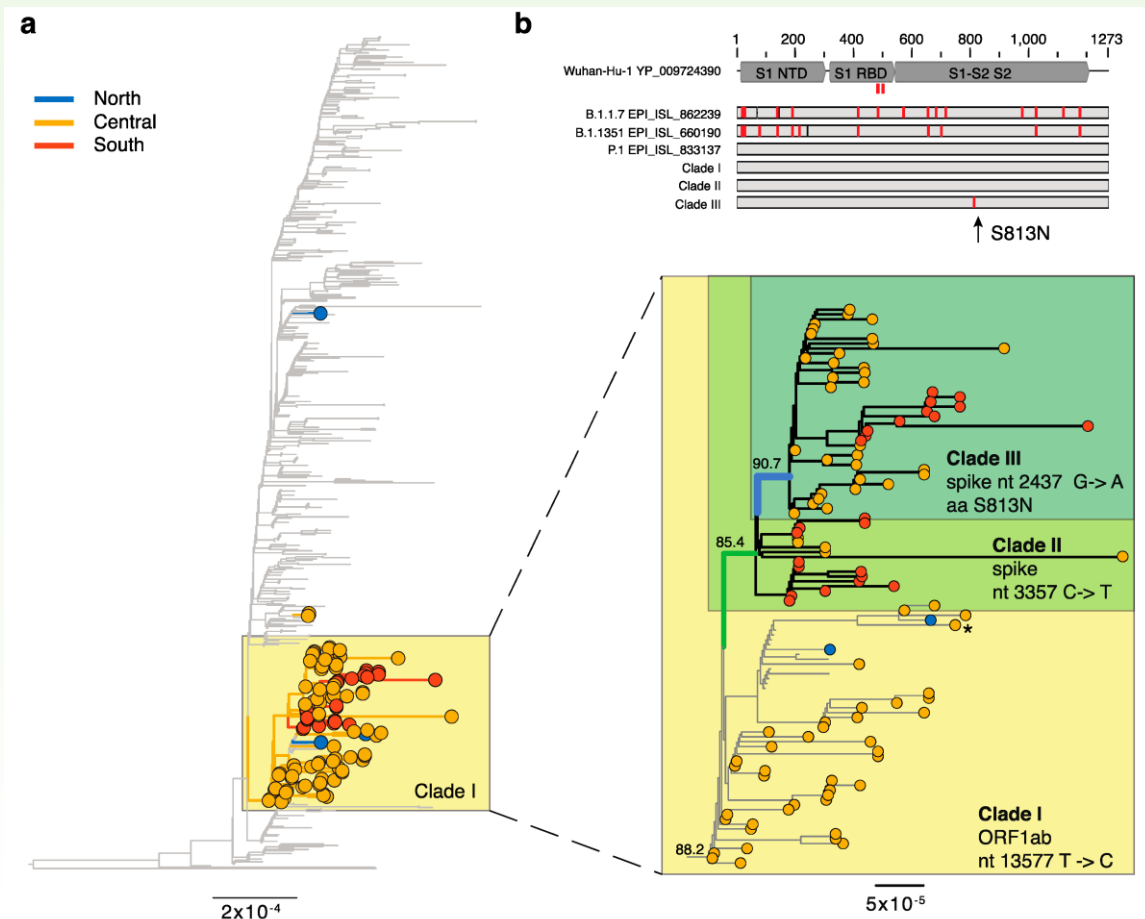
- La **filogenesi** è il processo di ricostruzione del percorso evolutivo che ha portato alla diversità di gruppi di organismi
- Classicamente, essa è sempre stata basata sull'osservazione di caratteri morfologici condivisi, che si può supporre siano derivati da un **antenato comune**
- In epoca moderna 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!

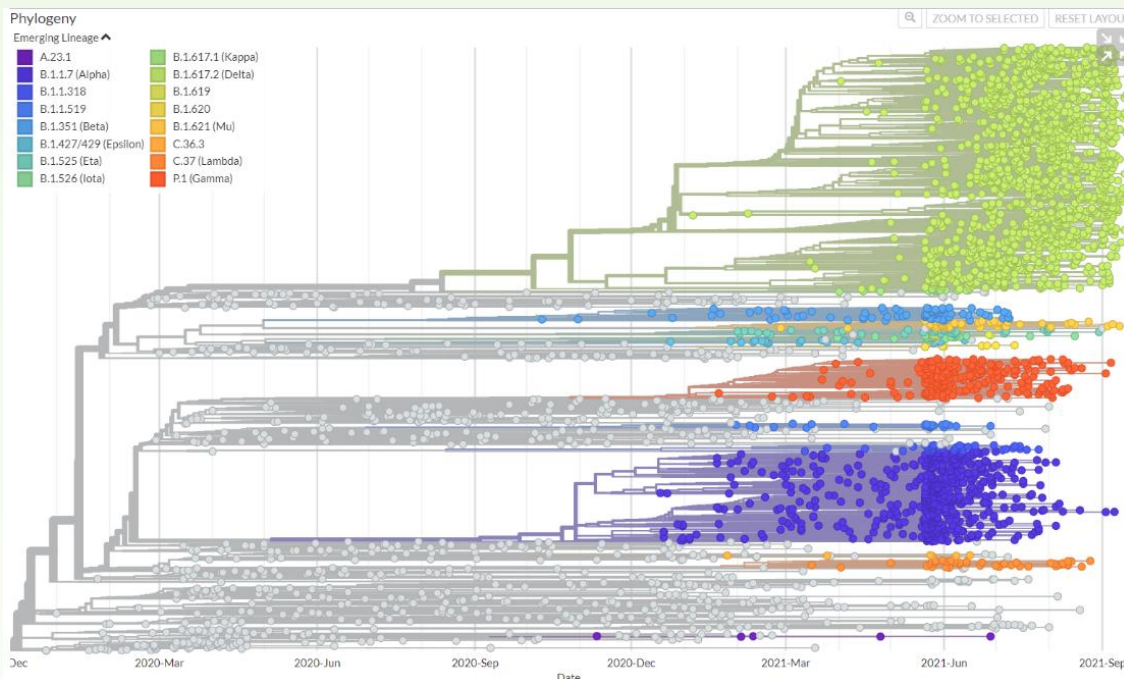
✓ Per mutazione si intende il singolo evento di modifica del codice genetico, indipendentemente dalla sua selezione

✓ 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 (**maggiore trasmissibilità/maggiore evasione immunitaria**)

# Varianti: la classificazione «semplificata» dell'OMS

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

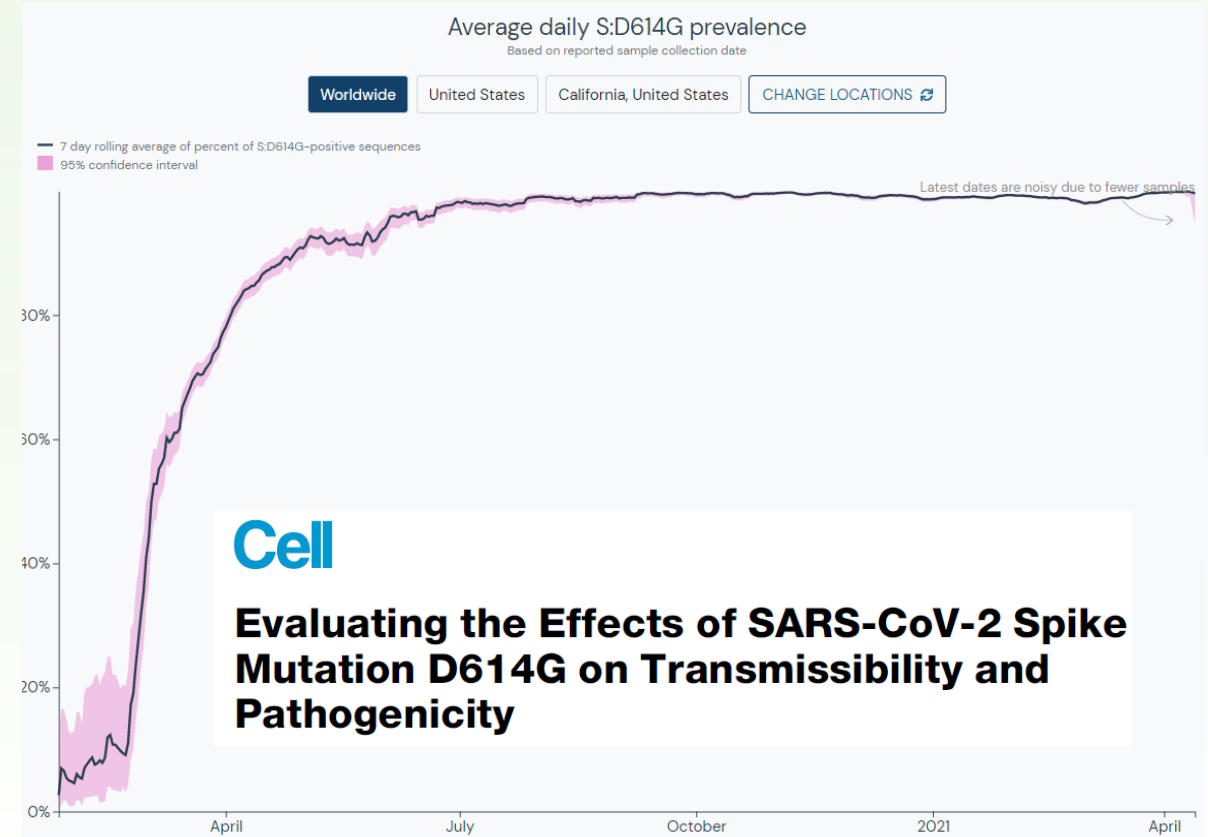
WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Additional amino acid changes monitored°	Earliest documented samples
Alpha	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	+S:484K +S:452R	United Kingdom, Sep-2020
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	+S:L18F	South Africa, May-2020
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	+S:681H	Brazil, 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

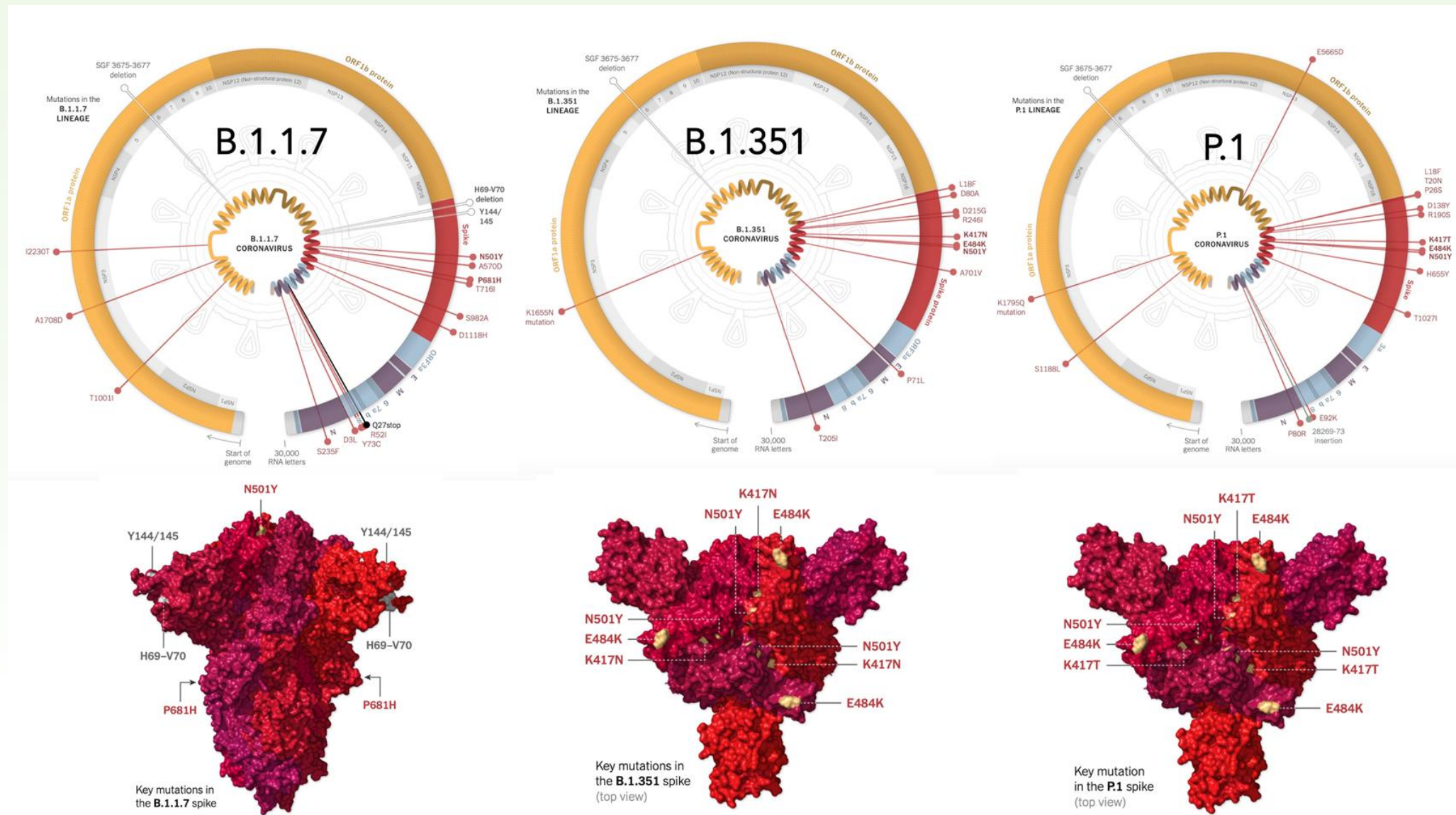
# D614G: la prima mutazione con forte impatto epidemiologico

- ✓ 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<sub>0</sub> 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)

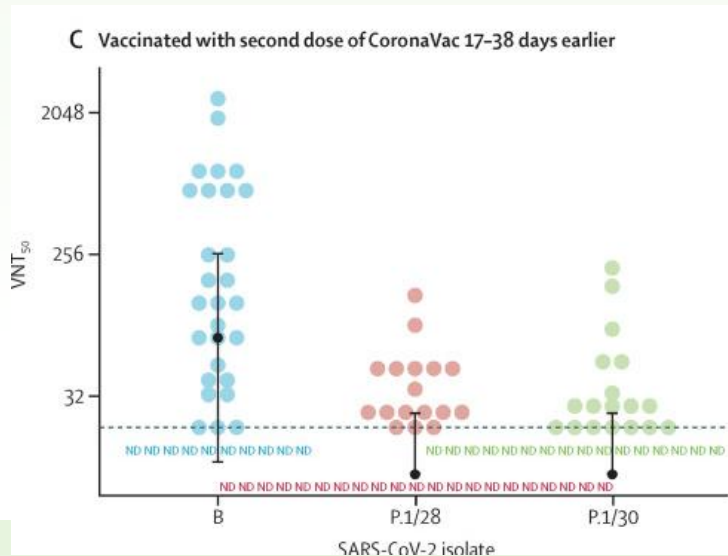
	B.1.1.7	B.1.351	P.1
Alternate name	501Y.V1	501Y.V2	501Y.V3
Country identified	United Kingdom	South Africa	Brazil
Mutations	23	21	17
Spike mutations	8	9	10
Key RBD, spike mutations beyond N501Y in all	E69/70 deletion, P681H 144Y deletion, A570D	E484K, K417N, orf1b deletion	E484K, K417T, orf1b deletion
Other mutations, including N-terminal	T716I, S982A, D1118H	L18F, D80A, D215G, Δ242-244, R264I, A701V	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I

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

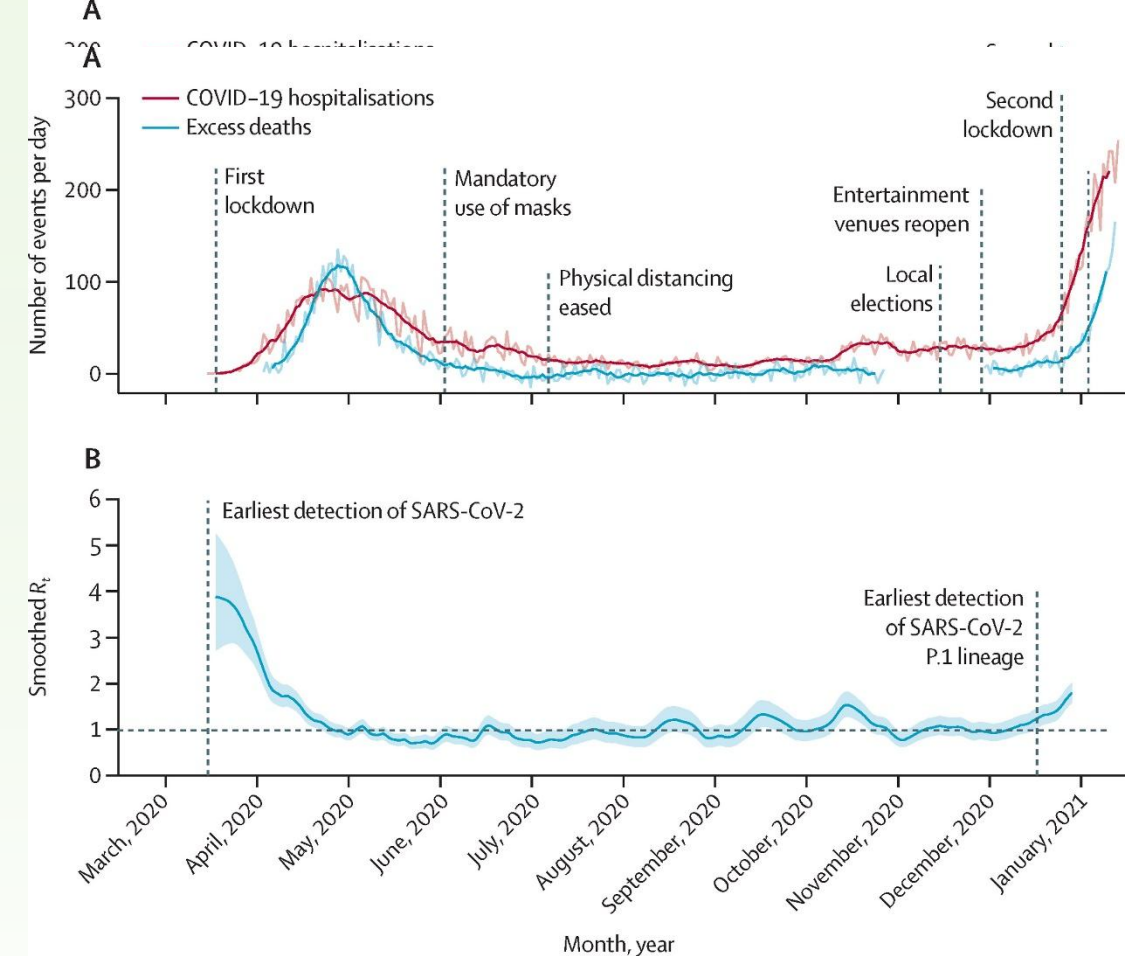
Quale è il contributo della trasmissibilità intrinseca? Quale quello dell'evasione immunitaria?

# Il caso di gamma in Brasile

- ✓ Emergenza iniziale nella zona di Manaus, in Amazonia
- ✓ 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

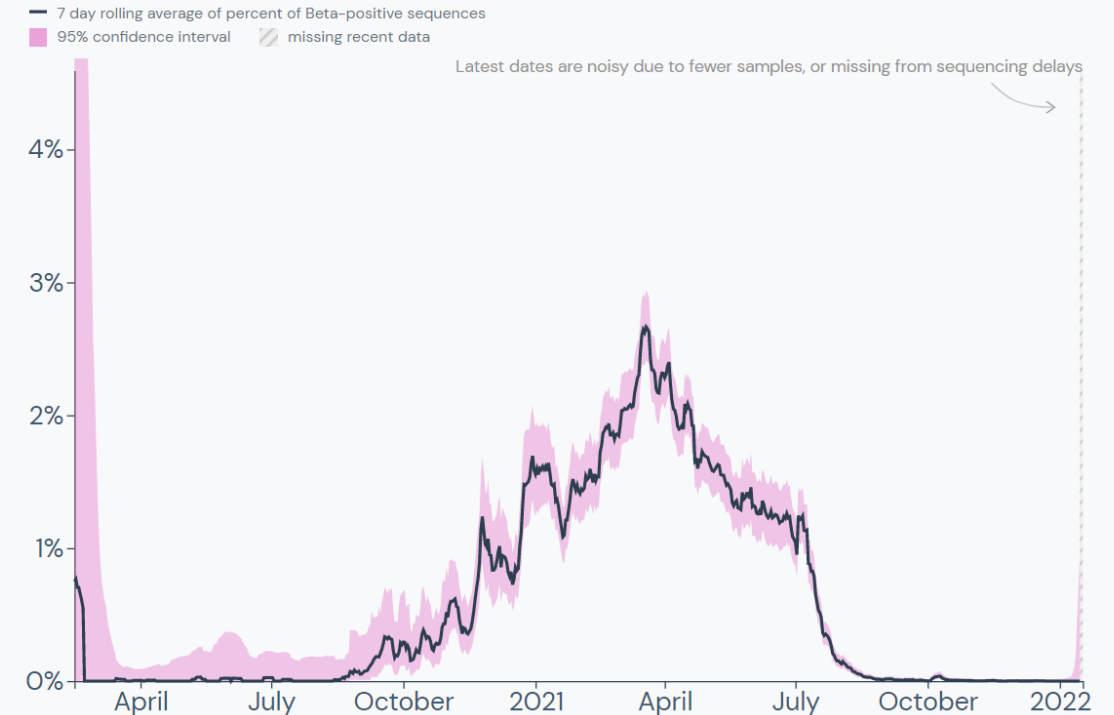
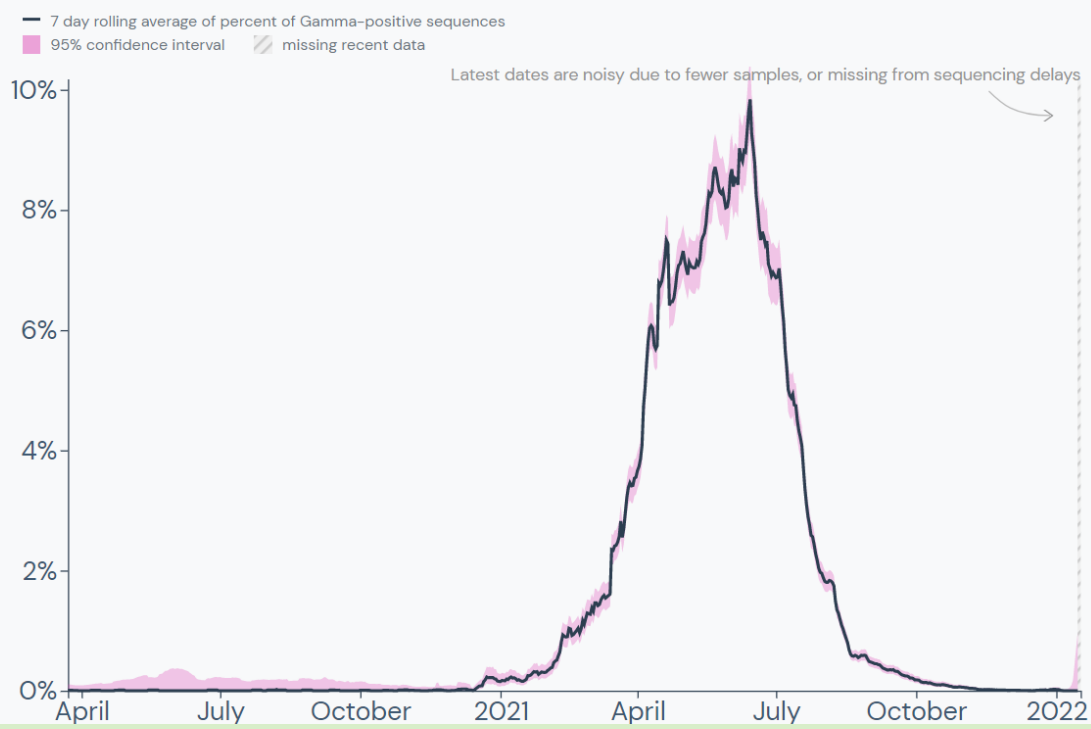
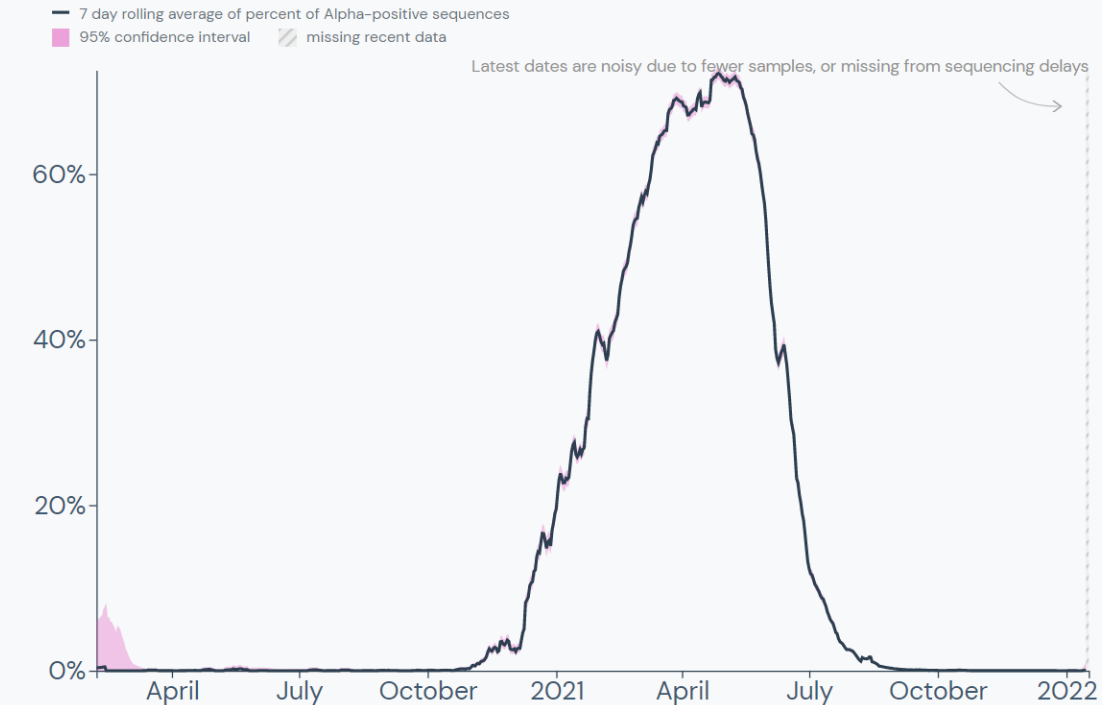


Souza et al. 2021, Lancet



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?



**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

The Delta variant may be taking hold in parts of Europe and North America

Modelled estimates of the Delta variant's share of all sequenced cases (%)



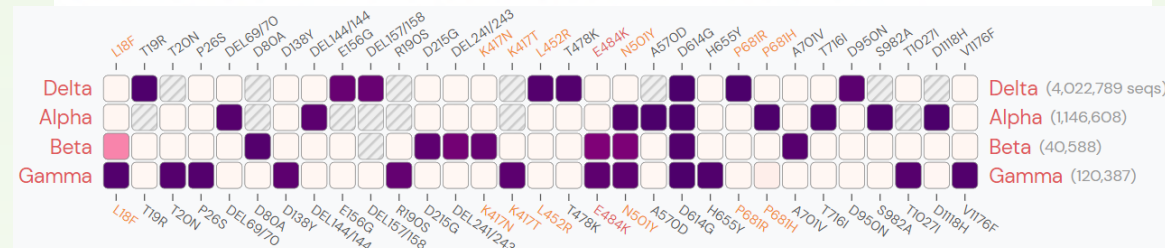
\*More than 90% of Russia's sequenced cases of Delta are from Saint Petersburg

Source: FT prevalence estimates based on data from GISAID, Sciensano, Belgian National Reference Laboratory. Method from Tom Wenseleers / @TWenseleers

© FT

## 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

## **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*

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

SALUTE > RICERCA

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"

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

## **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

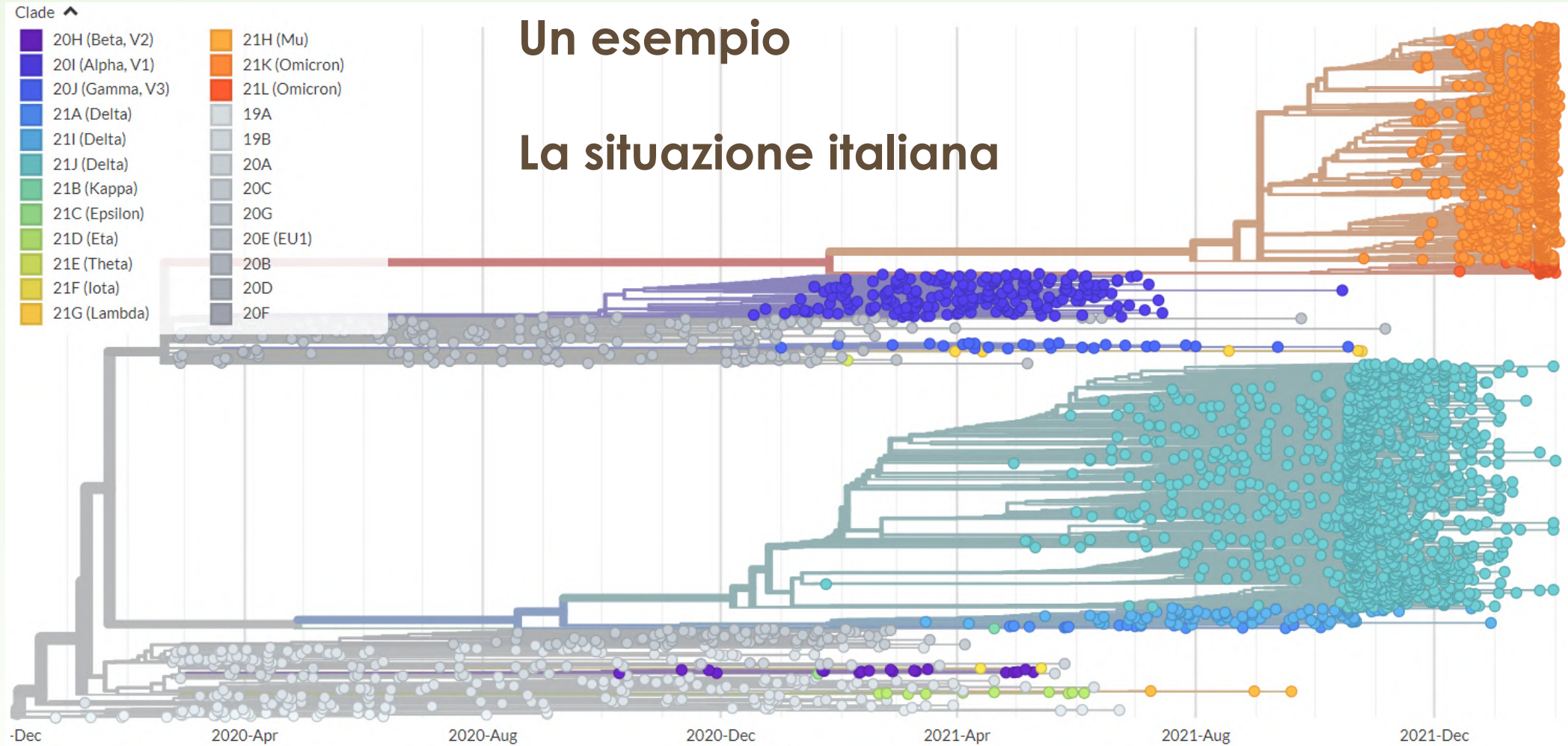
## **Variante nigeriana in Italia: "Ha parecchie mutazioni, la stiamo studiando.."**

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

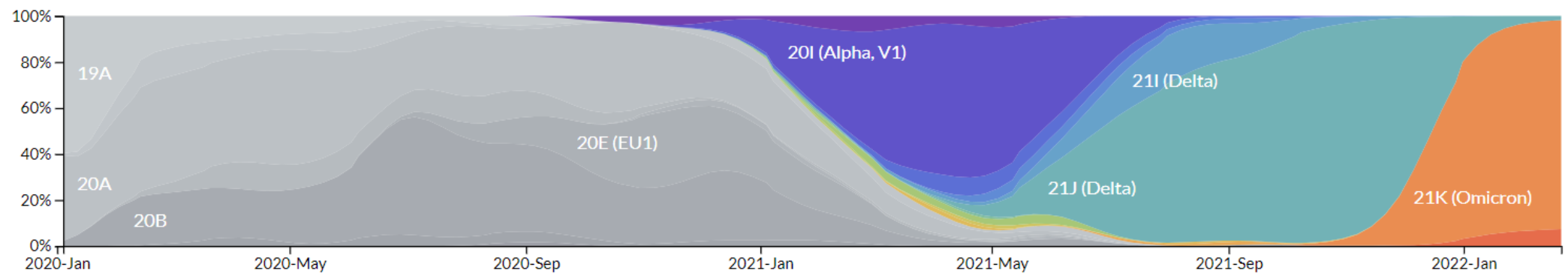
LA SCOPERTA DI UN LABORATORIO DI HELSINKI

# Un esempio

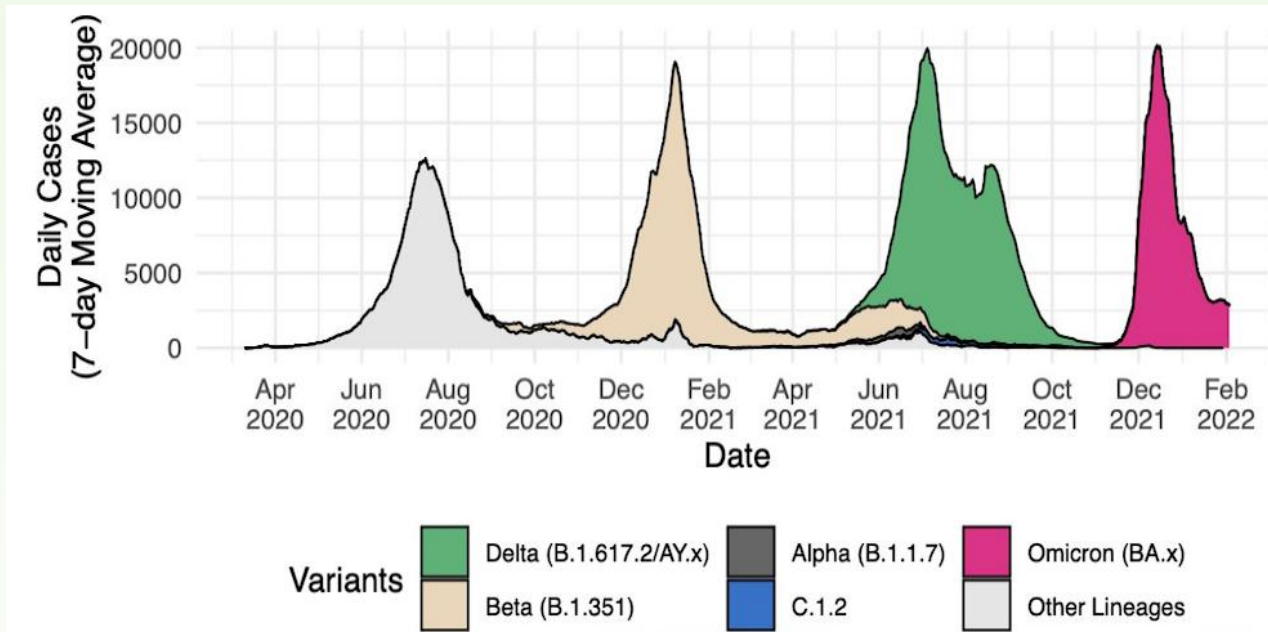
## La situazione italiana



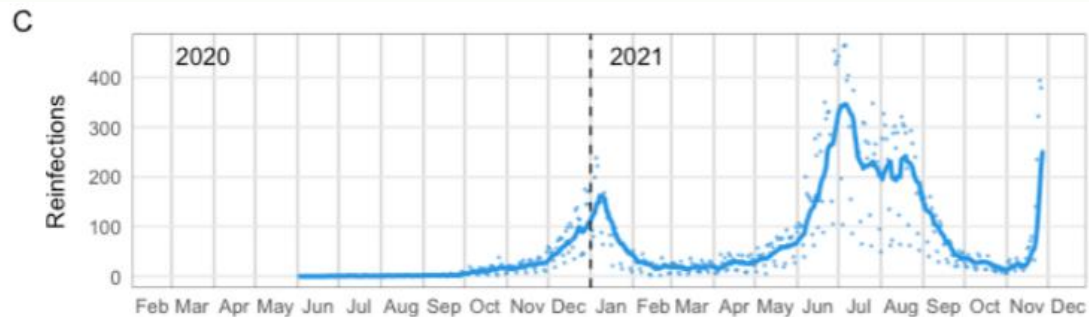
Frequencies (colored by Clade)



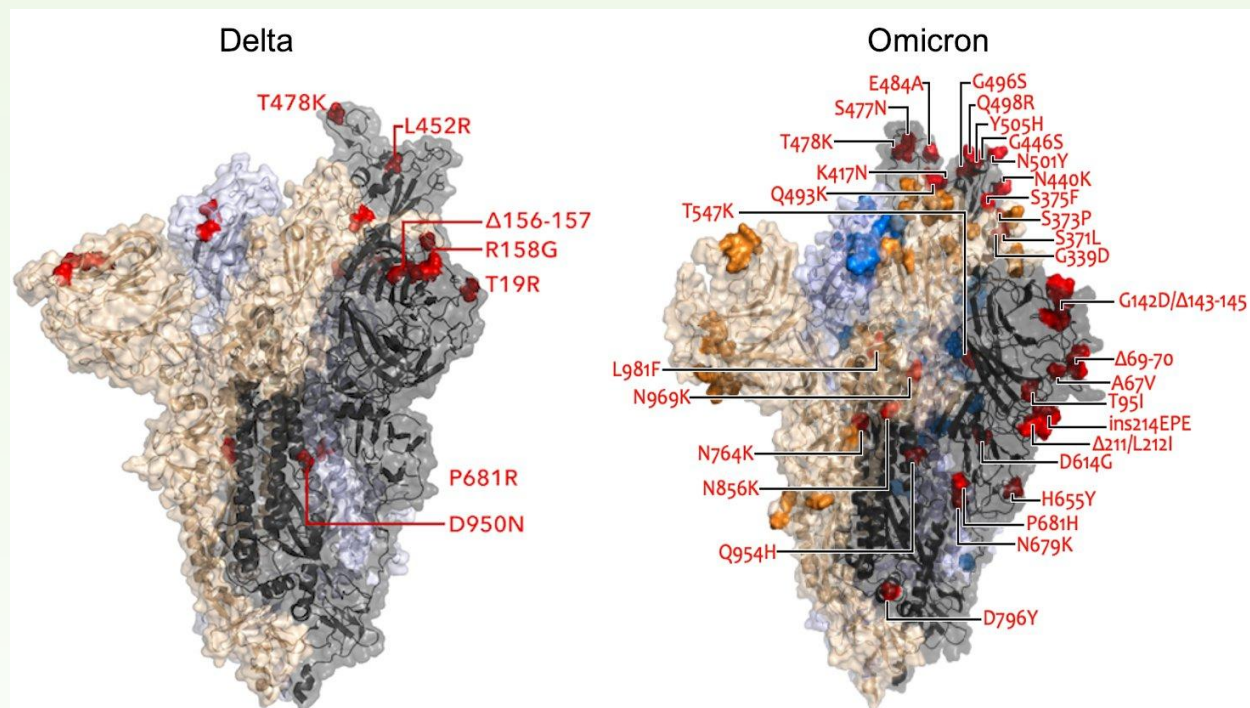
# Sud Africa – il contesto in cui è «nata» omicron



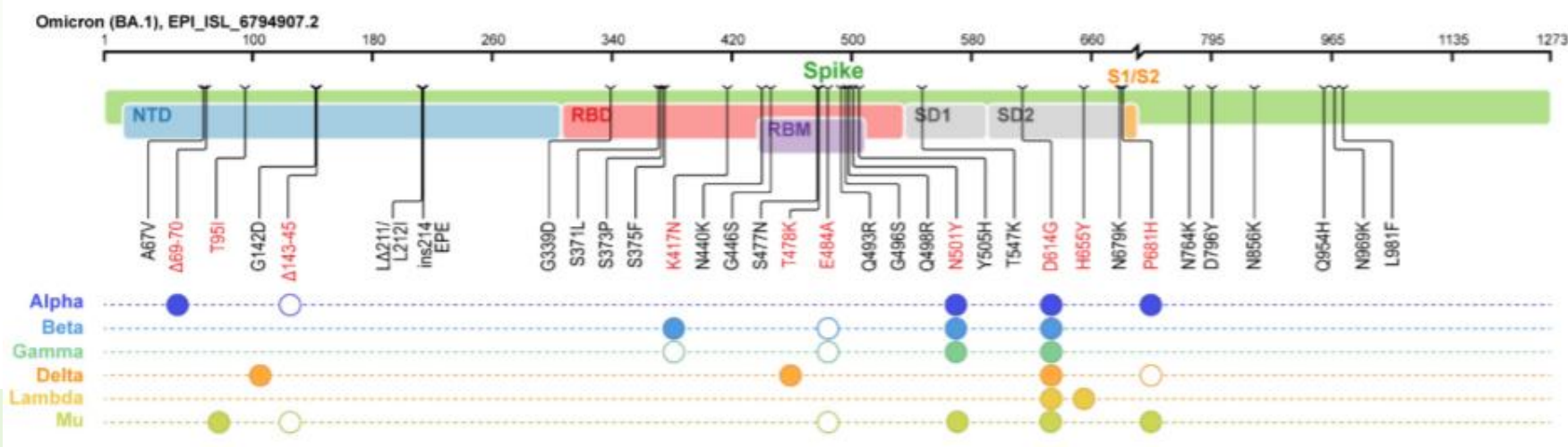
- Tre importanti ondate precedenti (virus «originale», beta e delta)
- **Sieroprevalenza molto alta nella popolazione (80%)**
- **Tasso di vaccinazione molto basso (25%)**
- **Rapido aumento nel numero dei casi, accompagnato dalla sostituzione di delta con omicron**
- **Quarta ondata «inattesa»** ->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



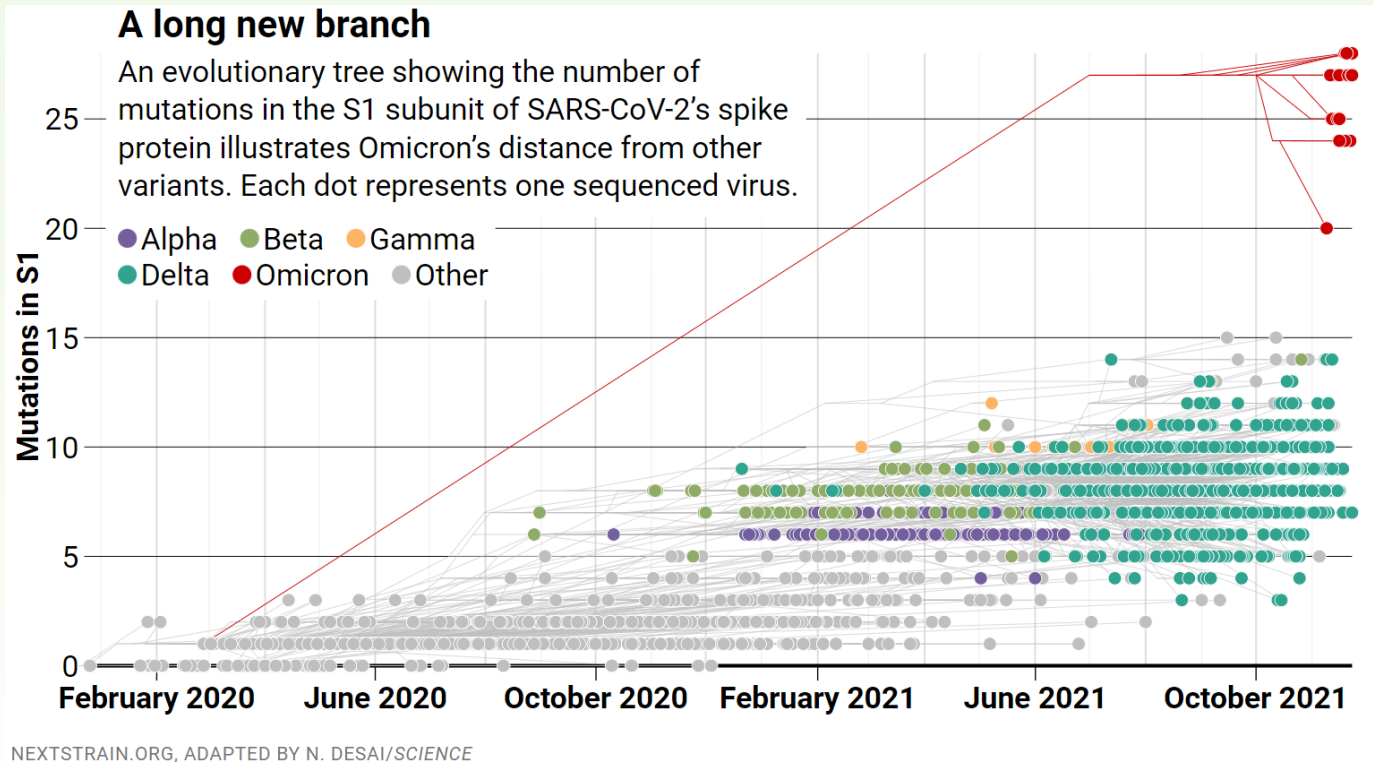
# Omicron – il profilo delle mutazioni della proteina spike



- 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

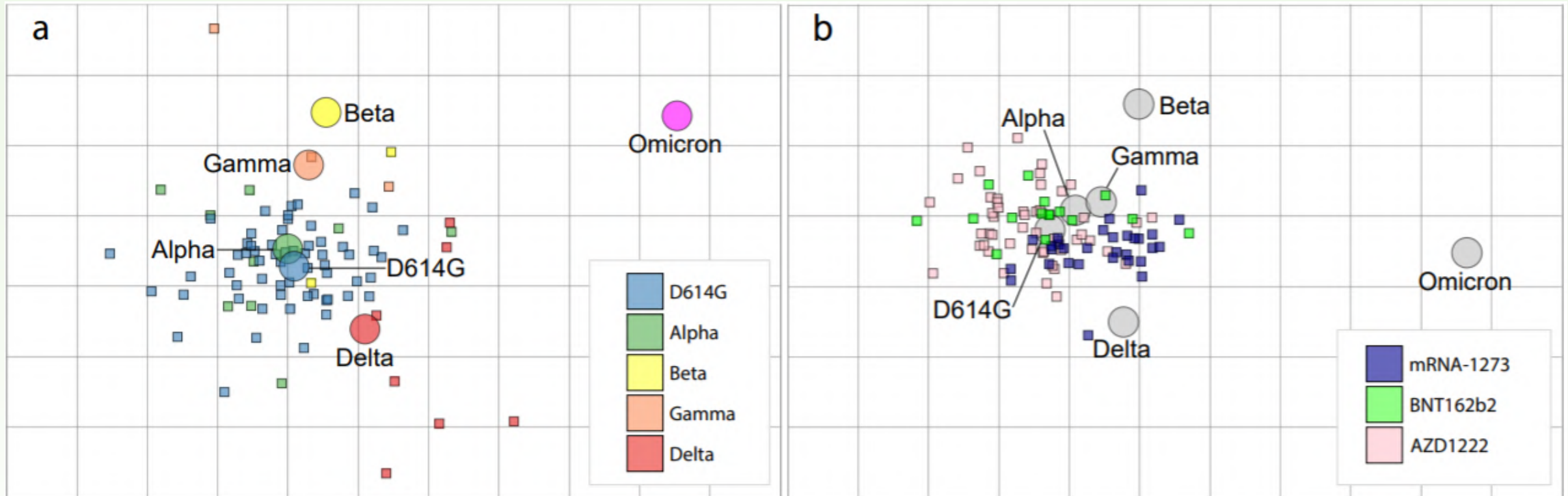


- La maggior parte delle VOC e VOI mostra poche (<15) mutazioni nella regione S1
- Omicron ne ha più di 20, più alcune **delezioni** ed una **inserzione**
- Alcuni virus dei pipistrelli sono più simili al virus di Wuhan di quanto non lo sia omicron!
- Molte mutazioni di omicron sono «inusuali» e non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

## 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

# Omicron appartiene ad un nuovo «cluster antigenico»

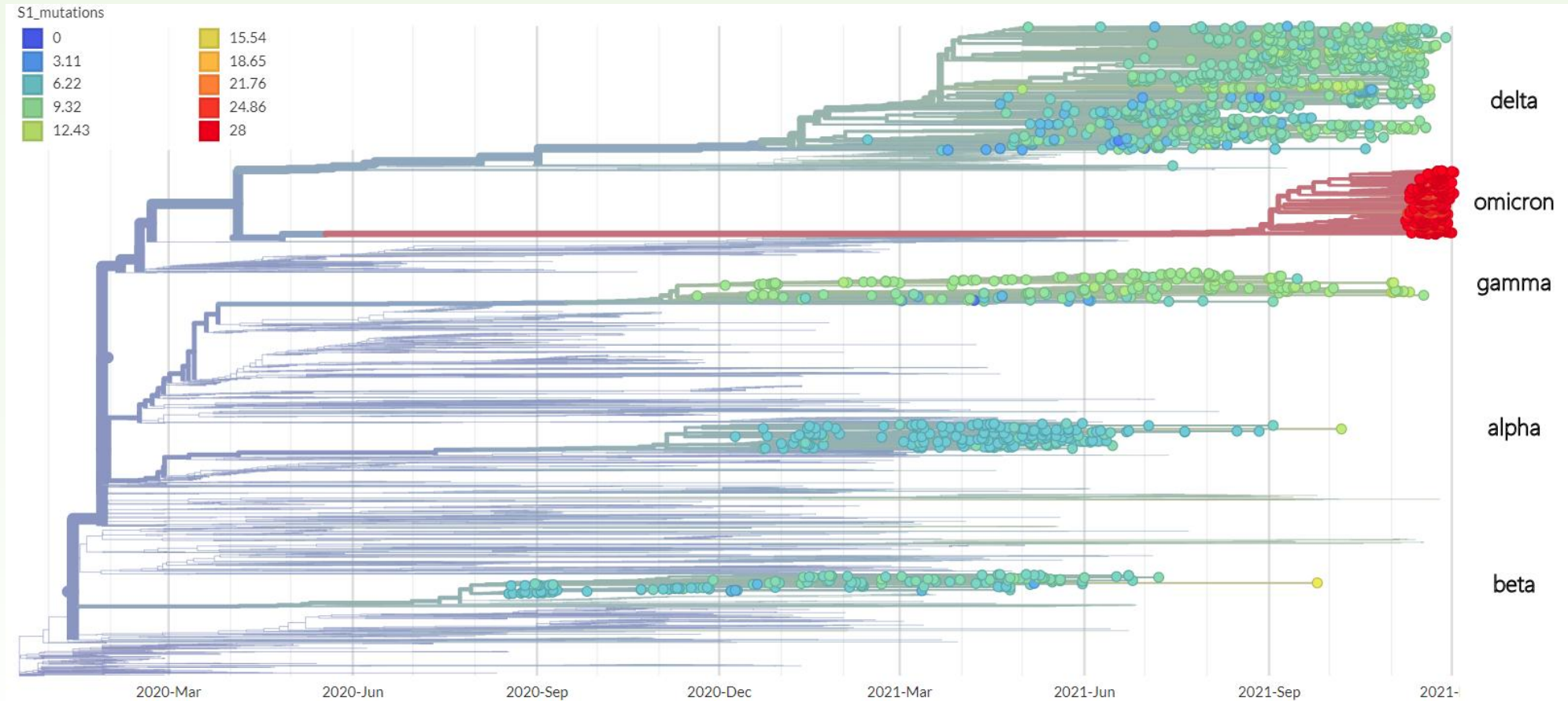


Van der Straten et al. 2022, Medrxiv

**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**

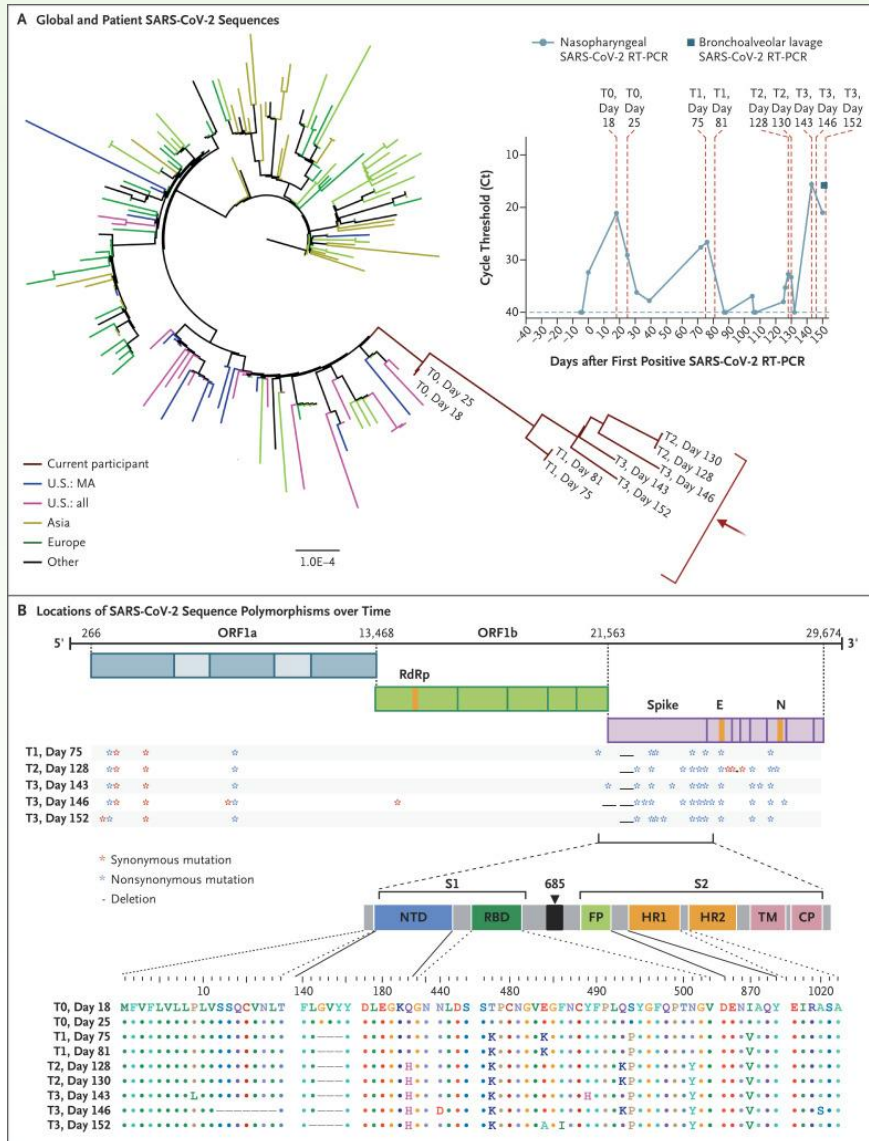
# Le «strane» origini di omicron



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?**

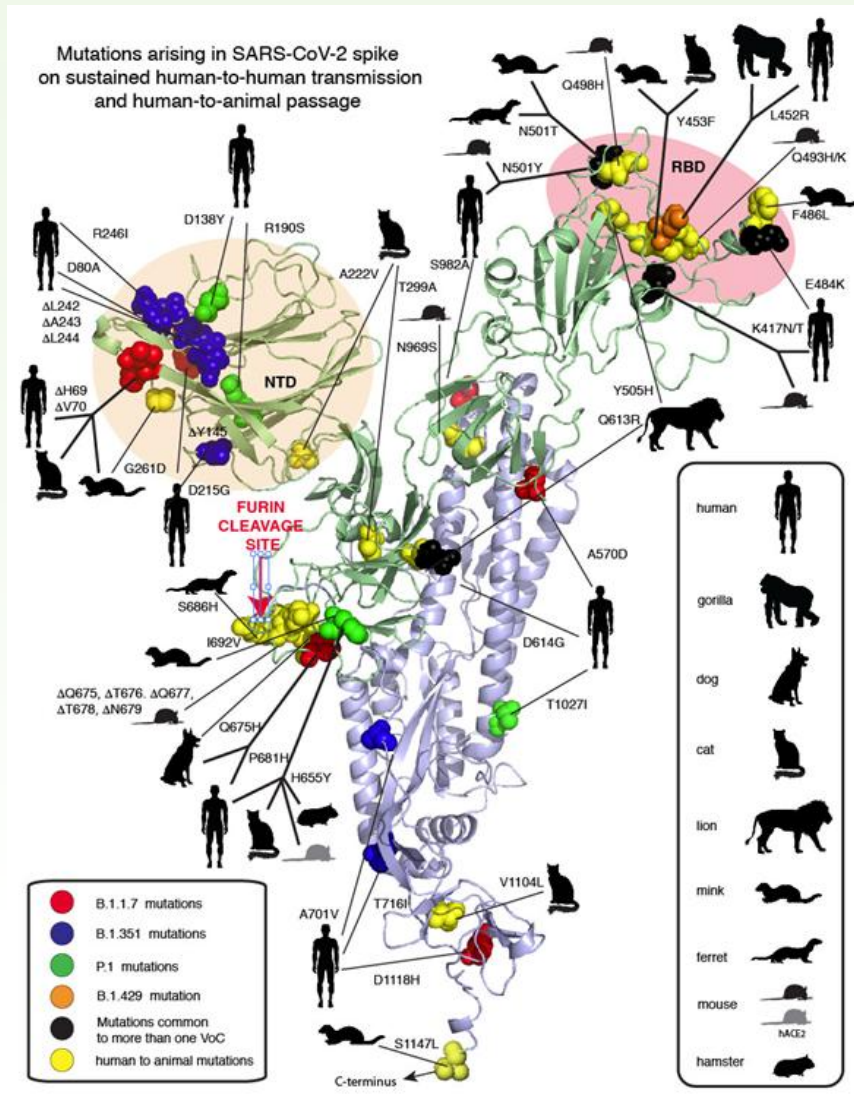
# Ipotesi #1: selezione in un paziente immunocompromesso



Choi et al. 2020, NEJM

- 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



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Journal of Genetics and Genomics**

Journal homepage: [www.journals.elsevier.com/journal-of-genetics-and-genomics/](http://www.journals.elsevier.com/journal-of-genetics-and-genomics/)



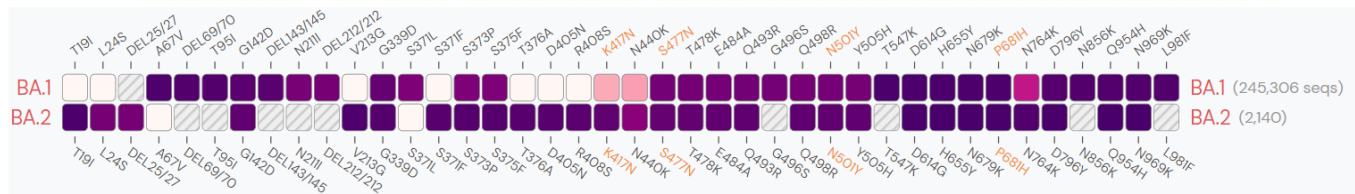
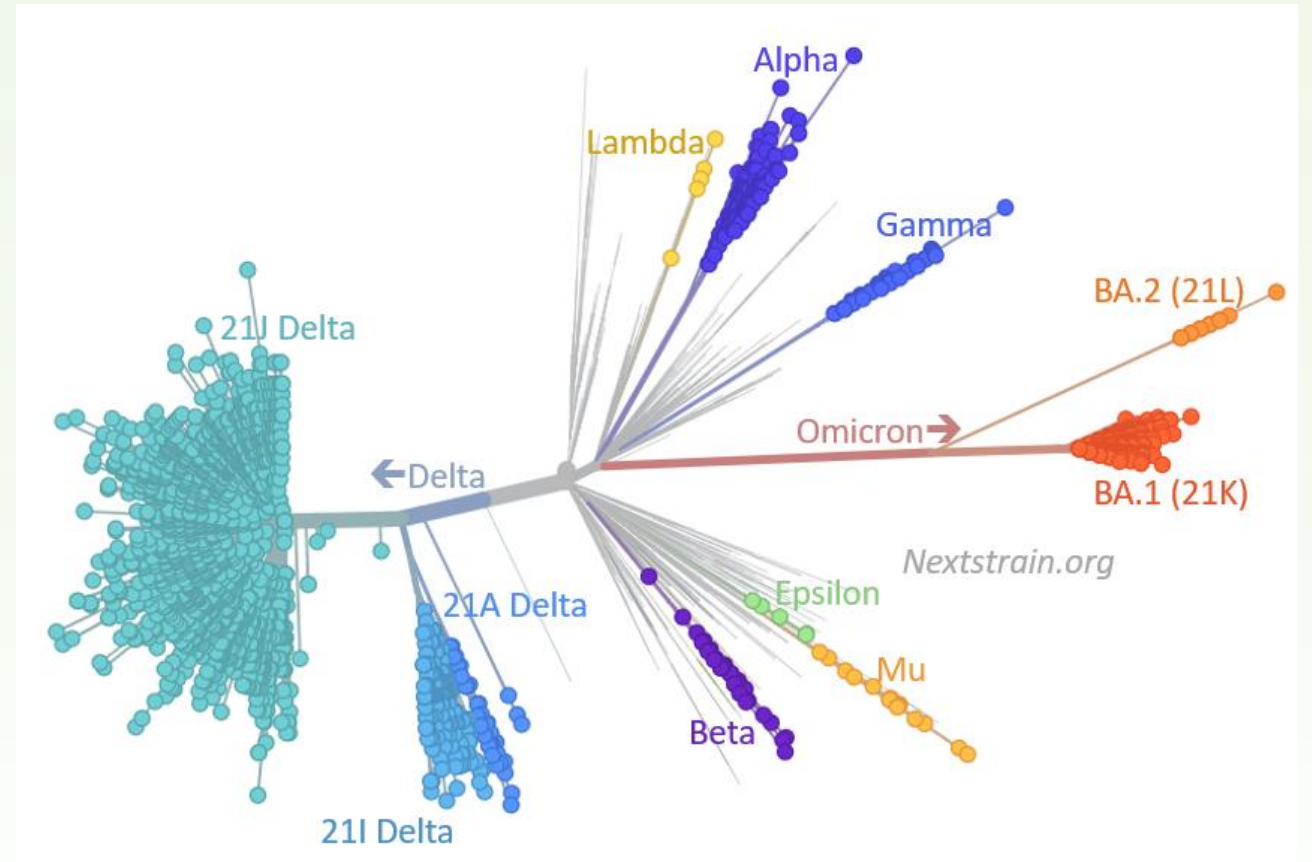
Original research

### 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 estinguerà del tutto



# Sarà necessario implementare un approccio one health

NEWS | 04 February 2022

How sneezing hamsters sparked a COVID outbreak in Hong Kong

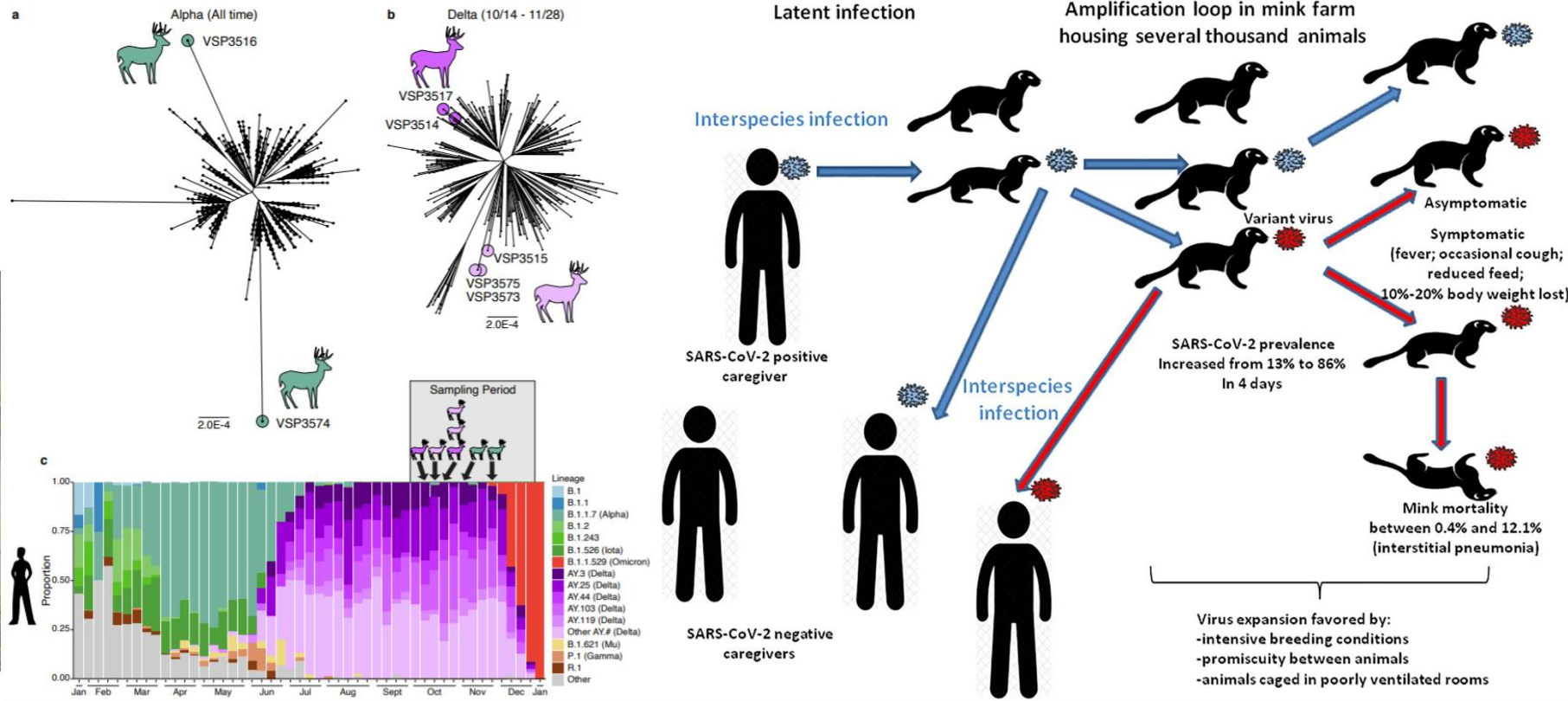
Hamsters are only the second species known to have spread SARS-CoV-2 to humans.

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

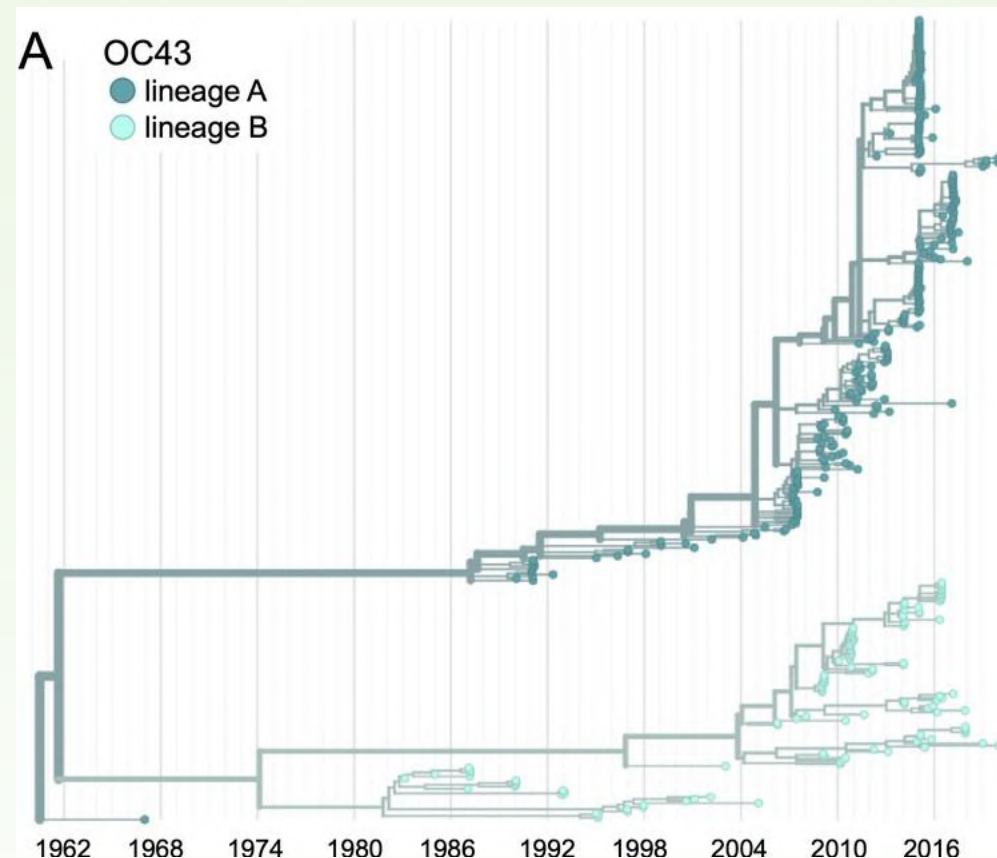


## A mysterious coronavirus variant has been found in New York City wastewater — and no one knows where it came from

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 trasmissibilità 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