

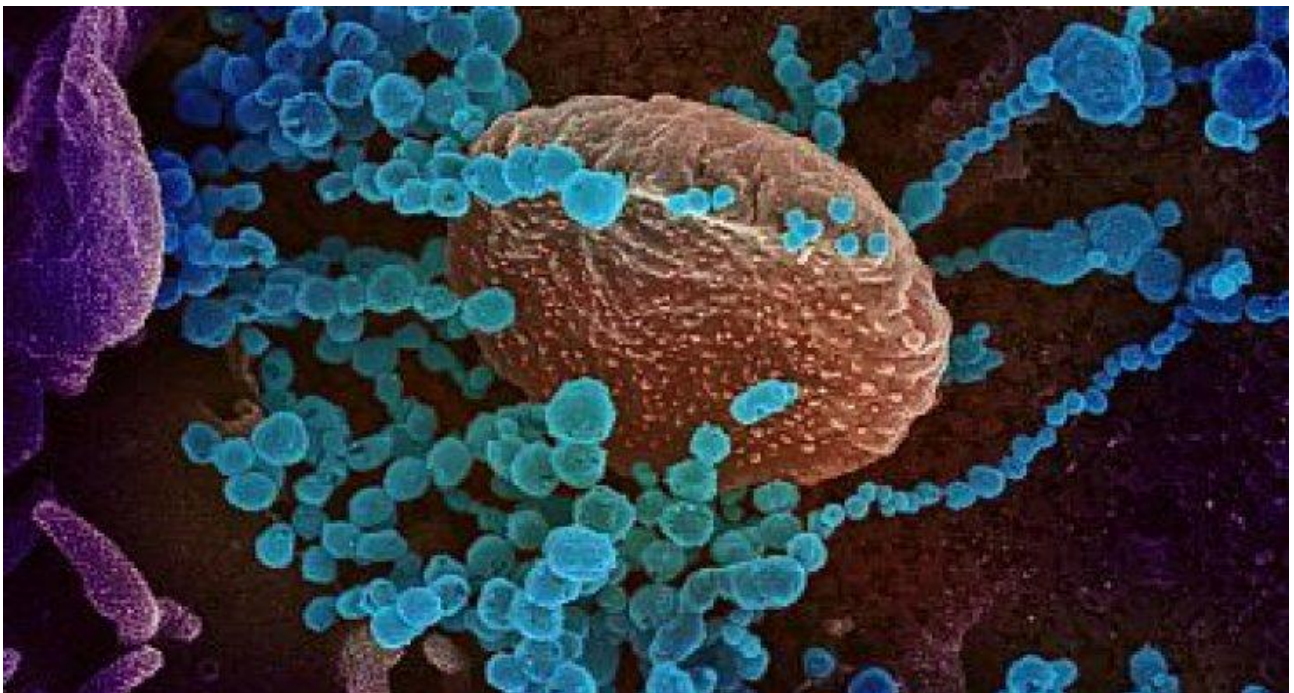
MUTAZIONI DI PARTICOLARE INTERESSE DELLA PROTEINA SPIKE DEL VIRUS SARS-COV-2

Parte seconda

SOMMARIO

Il SARS-COV-2 ha un'elevata tendenza alla ricombinazione. Un virus nel quale si verificano specifiche mutazioni o combinazioni di mutazioni può diffondere più rapidamente in una popolazione per una maggiore infettività o trasmissibilità. Gruppi di persone che sembrano avere casi d'infezione più gravi pongono interrogativi cui è necessario dare risposte con l'utilizzo di test di sequenziamento e analisi dei genomi.

Lo sviluppo di vaccini per la prevenzione della malattia è avvenuto rapidamente, ma ancora poco si sa delle correlazioni immunitarie relative alla protezione o dell'abilità del virus di evitare la risposta dell'ospite, attraverso mutazioni e ricombinazioni. Man mano che viene praticata la profilassi vaccinale sarà importante sequenziare il SARS-CoV-2 da persone infette già vaccinate, o che si infettano per la seconda volta col virus, con l'obiettivo di "scovare" nuove varianti che hanno eluso il sistema immunitario con meccanismi derivati dalla precedente infezione o dalla vaccinazione.



Le zoonosi possono diventare pandemie

Quando un virus presente in un serbatoio animale ha un'affinità con dei recettori presenti su organi, tessuti o cellule presenti nell'organismo umano, c'è il contatto tra uomo e animale infetto (salto di specie) e il virus **si trasmette diffusamente nella popolazione umana si ha una pandemia**. Le questioni relative al ruolo delle specie reservoir, alla ricombinazione e la diversità del SARS-CoV-2 agente della malattia nell'uomo COVID-19 rispetto ai coronavirus presenti nel serbatoio animale, sono ancora aperte.

Un'analisi globale delle malattie infettive umane emergenti, suggerisce che queste patologie trovano spesso **terreno fertile per la loro diffusione nelle falle di sistemi sanitari e di sorveglianza inappropriati**. Sulla base di queste considerazioni, appare evidente che le azioni umane per la prevenzione e il monitoraggio delle malattie infettive emergenti, dovrebbero essere maggiormente concentrate nelle regioni del nostro Pianeta ad elevata biodiversità, in cui i fenomeni di espansione demografica incontrano infrastrutture sanitarie pubbliche inadeguate e risorse economiche limitate o assenti, per il controllo delle zoonosi.

Analoga accuratezza dovrebbe essere prestata all'inizio della comparsa di focolai di malattia causati da conosciuti o potenziali agenti di pandemia, per **evidenziare precocemente il pericolo testando la popolazione con metodiche affidabili, isolare gli infetti** con rigide quarantene per limitare il contagio, **curare le persone colpite** con protocolli farmacologici efficaci e verificare periodicamente l'efficacia delle misure messe in atto.

Nei focolai di malattia dovuti a patogeni zoonotici è **fondamentale l'identificazione della fonte dell'infezione**, per permettere alle autorità sanitarie di tenere separata la popolazione umana, da fonti di rischio rappresentate dai reservoir del mondo animale selvatico o domestico.

Nei casi in cui non è possibile fermare il focolaio nella fase iniziale, come nel caso dell'epidemia di COVID-19 iniziata nel distretto cinese di Hubei, **l'identificazione dell'origine e del punto d'insorgenza è altrettanto importante** per gli obiettivi di contenimento della comparsa e diffusione di altri focolai nelle altre province (zone) limitrofe.¹

Si sa che i **sarbecovirus**, sottogenere virale che comprende SARS-CoV e SARS-CoV-2 sono **soggetti a frequenti ricombinazioni** e hanno mostrato fin dall'inizio del loro studio in Cina, una diversità genetica spazialmente strutturata su base regionale.¹

Il 10 gennaio 2020 *Wu, F. et al.* hanno descritto per primi la sequenza genomica del SARS-CoV-2, il nuovo coronavirus associato alla malattia respiratoria apparsa in Cina; immediata è stata l'analisi relativa alla sua origine ancestrale.

Le sequenze genomiche di SARS-CoV-2 sono state classificate in **due lineage principali**: A e B. Il lineage A si distingue in 5 ulteriori lineage (A.1-A.5) e due sub-lineage, mentre nel lineage B si distinguono 9 lineage (B.1-B.9) e molteplici sub-lineage.¹

Genotipizzazione e sequenziamento sono due tecniche per ottenere informazioni sugli acidi nucleici, principalmente sul DNA o RNA di un organismo; la genotipizzazione permette di definire la variante genetica usando dei marcatori, il sequenziamento determina l'ordine corretto della sequenza nucleotidica all'interno del frammento di DNA o di RNA.

Le sequenze genomiche sono registrate anche nel database pubblico GISAID che utilizza, per la definizione dei lineage, una numerazione riferita alla struttura genomica del primo virus SARS-CoV-2 il Whuan-Hu-1/2019.

In relazione al **fenomeno di espansione naturale di diversità genetica di SARS-CoV-2** è stato predisposto da *Rambaut et al. (2020)*, un sistema di nomenclatura consultabile su <https://cov-lineages.org>

Si può avere una **variante virale come conseguenza di combinazioni di diverse mutazioni che possono essere sopravvenute in modo indipendente le une alle altre**. La variante virale riguarda modifiche sostanziali della sequenza genica iniziale e la conseguente **formazione di un genoma virale diverso da quello iniziale**.

Eziologia di SARS-CoV-2

Il SARS-CoV-2 è un virus del diametro approssimativo di 60-140nm, la cui forma può essere sferica, ellittica o pleiomorfica, il cui genoma è costituito da un singolo filamento di RNA (virus monocatenario) a polarità positiva, di grande taglia (da 27 a 32 kb nei diversi virus). Questo grande genoma può essere sommariamente **diviso in due regioni**: la prima sezione di circa due terzi, contenente un grande gene di replicazione che codifica le proteine responsabili della replicazione e trascrizione dell'RNA virale e un terzo terminale che codifica le proteine strutturali e accessorie.¹

L'RNA dà origine a proteine strutturali ed accessorie. Le più importanti proteine strutturali che compongono il virus SARS-CoV-2 sono la M (membrana glicoproteica) costituita da due estremi che attraversano il rivestimento esterno (envelope) denominati dominio N-terminale corto (N-terminal) e un estremo C-terminale largo (C-terminal) che interagiscono rispettivamente all'esterno e all'interno del virione con il complesso RNA-proteina; la parte C-terminale sembra giocare un ruolo importante nell'assemblamento del virus. La glicoproteina N (nucleo capsida) associato all'RNA genomico è presumibilmente coinvolta nella regolazione della sintesi dell'RNA aumentandone la stabilità ed interagisce con la proteina M al momento della replicazione virale. La glicoproteina E (envelope) funziona come porina formando canali ionici e partecipa all'assemblamento del virus.

La glicoproteina HE (dimero emagglutinina-esterasi) del rivestimento, più piccola della glicoproteina S, svolge una funzione importante durante la fase di rilascio del virus all'interno della cellula ospite.

La glicoproteina S (spike, dall'inglese punta, spuntone) unita in tripletta (trimero), si proietta attraverso l'envelope virale e forma le proiezioni di superficie (corona), della lunghezza di circa 20nm. utili al virus per unirsi attraverso un recettore denominato receptor-binding-domain (RBD al recettore ACE2 (angiotensin converting enzyme 2), presente in particolare nelle cellule dei capillari degli epiteli respiratori e gastroenterici.

La glicoproteina S si compone di due subunità, S1 e S2. La prima determina il tropismo cellulare, la seconda media la fusione della membrana cellulare del virus.

Successivamente alla fusione della membrana del virus con la cellula infettata, si formano delle vescicole citoplasmatiche a doppia membrana (DMVs), nelle quali sono ancorati i complessi replicazione-trascrizione RTCs) che permettono al virus di replicarsi in continuazione. I genomi della maggior parte delle specie virali hanno dei geni definiti overlapping genes, formati da due o più proteine codificate dalla stessa sequenza nucleotidica. Quasi tutti i costituenti del complesso RTCs dei coronavirus sono codificati dal grande gene replicasi incorniciato all'interno di geni overlapping, denominati open reading frames ORF1a e ORF1b.

Durante la replicazione del genoma virale si assiste ad una produzione affiancata di mRNAs sub genomici che codificano le proteine S, E, M e N ed almeno altre nove proteine accessorie, alcune delle quali tipiche del solo SARS-CoV-2.¹

Il virus utilizza un complesso enzimatico denominato RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), molto simile a quello già utilizzato dal virus SARS-COV 2002, per la replicazione del suo genoma e la trascrizione dei suoi geni. Il complesso RdRp è a sua volta costituito da tre sub unità denominate nsp12, nsp8 e nsp7 che permettono in successione la replicazione della lunga catena di RNA del coronavirus.

Il complesso RdRp è il bersaglio degli inibitori analoghi nucleotidici, in particolare del remdesivir, che hanno evidenziato attività antivirale in colture cellulari e nei modelli animali.²

Si è visto che SARS-CoV-2 utilizza la glicoproteina omotrimerica spike (S) con il suo recettore RBD per legarsi al recettore funzionale umano angiotensin-converting enzyme (ACE2); il recettore RBD è stato scelto come principale bersaglio delle varie strategie messe in atto, per la cura e la prevenzione della malattia in modo da bloccare l'entrata del virus. Gli studi sul recettore RBD hanno molta importanza per i gruppi di lavoro che si occupano di immunologia cellulare e molecolare.

In particolare sono stati analizzati funzionalmente i principali amino acidi residui che si trovano attorno al recettore RBD, che possono interagire con il recettore ACE2 e gli anticorpi neutralizzanti disponibili.⁴

Patogenesi di SARS-COV-2

Anche se non è possibile riportare l'ampia gamma delle conseguenze provocate nei pazienti COVID-19, durante le fasi iniziali (fase 1 e 2) della malattia, **la risposta immunitaria adattativa dell'individuo infetto tende ad eliminare il virus nel punto di entrata, evitando così la progressione del danno sull'organismo ospite.**

Esistono differenze genetiche, che possono influenzare le variazioni della risposta immunitaria degli individui al patogeno.

Nella fase 3 si genera un **importante danno polmonare**, per la comparsa della sindrome da liberazione di citochine (cytokine storm syndrome), caratterizzata nei casi gravi da una fulminante e a volte fatale iper-citochinemia. **Lo stato generale del paziente dovuto alla sensibilità genetica e la presenza di altre patologie concomitanti, facilitano la propagazione del virus** e il tropismo per gli organi dotati di recettori ACE 2, così come l'aumento della produzione, nei casi gravi, di citochine IL-6, IL1 (Interleuchine 1 e 6) e di TNF- α (Fattore di Necrosi Tumorale).

Il grave stato di infermità dei pazienti si caratterizza per la polmonite, linfopenia, sindrome da liberazione di citochine che attivano un'esagerata risposta immunitaria con danni a livello locale e sistemico. Dopo che il SARS-COV-2 è penetrato all'interno della cellula ospite e aver liberato il suo materiale genetico (RNA), viene riconosciuto dai recettori dell'immunità innata localizzati all'interno della cellula ad esempio i Toll 7 (TLR7), RIG-1 y MDA 5, attivando una cascata di segnali chimici che determina l'espressione degli interferoni IFN tipo I (α e β) il cui scopo è impedire la replicazione virale. Dall'altra parte, gli antigeni virali processati dalle cellule specifiche che presentano l'antigene (APC dall'inglese Antigen-Presenting Cell, in grado di esporre gli antigeni sulla propria superficie) mediante il sistema MHC-I (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) attraverso il recettore (TCR) del linfocita T CD8+ liberano i loro enzimi proteolitici (Linfocita T citotossico). Nello stesso istante inizia un aumento della sintesi di mediatori pro infiammatori (tempesta citochinica) derivata dalla liberazione di Interleuchine, IL-1B (attivazione dei neutrofili e pirogeno endogeno), IL-6 (attivazione dei neutrofili), IL-7 (differenziazione dei linfociti T), IL-8 (attivazione dei neutrofili), IL-9 (fattore di accrescimento dei linfociti), IL-10 (soppressione della proliferazione e produzione di citochine linfocitarie e TNF- α (che attiva la risposta dei neutrofili e incrementa la sintesi di PCR).²

Per gli aspetti riguardanti l'immunità umorale, si è visto che nel plasma di pazienti convalescenti, le cellule B producono anticorpi specifici contro la glicoproteina S del SARS-CoV-2.

Xueto CA e collaboratori hanno riferiscono che pazienti con sintomi gravi hanno livelli maggiori di IgG e titoli più alti di anticorpi locali associati a prognosi peggiori.

La tempesta di citochine è il fenomeno che determina i danni peggiori all'epitelio respiratorio. I pazienti che necessitano di terapia intensiva presentano un aumento molto importante di IL-6 e GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), fattore importante per la riparazione dell'epitelio alveolare danneggiato da lesioni causate dall'iperossia ed infiammatorie del polmone). Studi istopatologici dimostrano che nel polmone avviene un'infiltrazione massiva di neutrofili e macrofagi, si instaura un danno alveolare diffuso con formazione di membrane ialine ed ingrossamento della parete alveolare, necrosi dei gangli linfatici conseguente ad un fenomeno immuno-mediato.²

In un lavoro scientifico pubblicato dal King's College nel mese di novembre del 2020, sono riportati i risultati di esami anatomico-patologici effettuati su 41 pazienti deceduti da COVID-19 per evidenziare i danni polmonari provocati dal virus. In quasi il 90% dei pazienti erano evidenti delle lesioni da considerare tipiche del COVID-19 se comparate ad altre forme di polmonite. Per prima cosa era evidente un'estesa coagulazione nelle arterie e vene polmonari (trombosi); molte cellule polmonari erano abnormemente ingrossate con all'interno molti nuclei, segno di fusione di diverse cellule. Questa formazione di cellule diverse (sincizi) è provocata dalla proteina virale spike, utilizzata dal virus per entrare nella cellula. L'infiammazione e la trombosi potrebbero essere

causate dalla proteina del COVID-19 presente sulla superficie della cellula infetta, che stimola la fusione con le cellule polmonari normali che la circondano.³

L'11 dicembre 2020 nel sito ARS Toscana C. Silvestri e C. Stasi hanno pubblicato il punto sulle terapie in uso per la malattia da SARS-CoV2 riportando una tavola tratta dall'articolo *Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. *JAMA published online ahead of print, 2020 Apr 13* <https://www.ars.toscana.it/2-articoli/4306-nuovo-coronavirus-punto-vaccino-terapie-covid-19-sars-cov-2-trattamenti-sperimentazione-vaccini-cure.html#cosa-e-nuovo-coronavirus>

Per informazioni web relative alle ultime evidenze scientifiche riferite al COVID-19, si può consultare il sito ECDC: <https://www.ecdc.europa.eu/en/2019-ncov-background-disease>

La variabilità di SARS-CoV-2

Il sarbecovirus del pipistrello RaTG13, isolato da *Rhinolophus affinis* horseshoe (un pipistrello di medie dimensioni che vive nell'India settentrionale, Nepal, Cina meridionale, Sumatra e Borneo) studiato nel 2013 nella provincia di Yunnan, presenta cluster di SARS-CoV-2 in quasi tutte le regioni genomiche; circa il 96% della sequenza genomica è identica.

Attorno alla grande regione del genoma virale di SARS-CoV-2, corrispondente approssimativamente alla regione ORF1b, si è visto che non vi erano corrispondenze con altri coronavirus conosciuti, facendo presumere che un fenomeno di ricombinazione aveva giocato un ruolo chiave nell'evoluzione del virus.

Zhou et al. hanno ipotizzato, sulla base della forte somiglianza genetica di SARS-CoV-2 con RaTG13, che l'origine dell'attuale focolaio di COVID-19, sia il pipistrello.

I dati relativi alle diversità tra SARS-CoV-2 e i sarbecovirus presenti nel serbatoio dei pipistrelli, indicano che la linea genetica che ha dato origine al SARS-CoV-2 ha circolato per decenni nei pipistrelli senza essere mai stata notificata.¹

Nel rimanente 4% di diversità genomica del SARS-CoV-2 e delle sue nuove varianti, sono presenti meccanismi di ricombinazione genica e di attività legate all'azione di mRNAs che si stanno studiando con l'utilizzo di tecniche proteomiche (tandem mass spectrometry-based proteomics) e transcriptomiche (PIT) per poter verificare i cambiamenti dei siti di fosforilazione della glicoproteina S. Questi studi sono importanti per valutare l'impatto sulla popolazione determinato dalle modifiche presenti nelle nuove varianti del virus SARS-CoV-2 e nei contesti di preparazione e somministrazione di profilassi con vaccini basati sull'utilizzo di questa proteina.⁵

Lo sviluppo di vaccini per la prevenzione della malattia causata da infezione SARS-CoV-2 è avvenuto rapidamente, ma ancora poco si sa delle correlazioni immunitarie relative alla protezione o dell'abilità del virus di evitare la risposta immunitaria dell'ospite, attraverso mutazioni e ricombinazioni.

La variabilità dei virus si manifesta all'interno di uno stesso ospite (intraspecifica), o in più ospiti (intraspecifica). La variante più frequente che troviamo in natura è il virus "selvaggio" (wild type).

La sequenza nucleotidica più spesso riscontrata nel virus selvaggio viene definita sequenza consensus, un nucleotide teorico rappresentativo o una sequenza specifica di amino acidi, nella quale ogni nucleotide o amino acido è quello che si trova più frequentemente in quel sito, nelle differenti sequenze riscontrabili in natura; le combinazioni genomiche e amino acidiche rispetto al virus selvaggio si definiscono mutanti.

Mediante l'analisi filogenetica si individuano le linee evolutive delle specie virali, evidenziando i genotipi ed i sottotipi. Diversi genotipi o sottotipi possono avere proprietà diverse es. la patogenicità, la sensibilità ai farmaci compresi gli anticorpi (esogeni-terapia con plasma) o endogeni (a seguito di stimolazione vaccinale).

Un virus omogeneo può essere perfettamente adatto a replicare nella condizione standard (wild type); se la condizione cambia (es. aggiunta di un farmaco), quel virus può soccombere rapidamente o modificarsi in una condizione quasispecies.

M. Eigen, nel 1989 introdusse il termine quasispecies, per definire una distribuzione di mutanti generata da una mutazione definita nell'ambito del processo di selezione. La condizione di quasispecies garantisce che all'interno della popolazione virale ci sia, o si possa facilmente evolvere, una variante adatta ad ogni nuova condizione.

La mutazione è può avvenire per errori durante le fasi di replicazione e in risposta ad una pressione selettiva determinata da fattori esogeni, risposte che il virus mette in atto per difendersi da situazioni sfavorevoli.

Queste risposte si manifestano con variazioni di uno o più nucleotidi nel genoma dell'RNA virale (delezione, evento correlato ad un nuovo inserimento nel genoma stesso) e/o ad un cambiamento di uno o più amino acidi mediante sostituzione o rimpiazzo.

Per convenzione, un cambiamento aminoacidico viene registrato con un numero progressivo e una sigla formata da una sequenza di lettere e numeri es. N501Y registra la sostituzione (rimpiazzo) rispetto al virus di riferimento Whuan-Hu-1/2009 dell'amino acido asparagina (N) con il nuovo amino acido tirosina (Y) al sito 501 nella sequenza amino acidica della proteina S1. **La delezione, chiamata anche delezione genetica o mutazione per delezione è una mutazione che, nel caso dei coronavirus, riguarda l'RNA virale.** Questa mutazione viene riportata graficamente con la sigla DEL (del) o con il simbolo Δ relativa alla posizione in cui avviene la sostituzione di una sequenza nucleotidica H69del/V70del o $\Delta 69/\Delta V70$.

Col termine delezione "out of frame" o mutazione "frame-shift" s'intende la rimozione o l'aggiunta di uno o più nucleotidi con grave distruzione della produzione di proteina, fenomeno che avviene ad esempio in alcune mutazioni legate alla distrofia muscolare di Duchenne. Il risultato di questa delezione è che la proteina prodotta è resa completamente non funzionale all'attività iniziale, oppure non viene prodotta.

Per **lineage** (nuova linea genetica) s'intendono **modifiche genetiche singole o multiple che non cambiano sostanzialmente le risposte degli individui infetti** e vengono registrati e descritti combinando dati genetici ed epidemiologici.

SARS-COV 2, virus a RNA monocatenario con genoma lungo e complesso di oltre 29.000 basi a catena positiva è altamente ricombinogenico. I virus influenzali RNA a catena negativa con genoma segmentato hanno un'evoluzione basata su mutazioni e subiscono fenomeni di riassortimento, ma non subiscono la ricombinazione omologa dei segmenti dell'RNA; gli aspetti riguardanti la nuova comparsa di focolai d'influenza umana, si possono ridurre a fenomeni di riassortimento di ognuno degli otto segmenti di RNA che formano i virus influenzali. **Per i coronavirus, invece, gioca un ruolo importante la ricombinazione di piccole subregioni genomiche, fenomeno molto comune che si verifica frequentemente ed indipendentemente dai segmenti di RNA.**¹

Le ricombinazioni sono identificabili se si hanno a disposizione sufficienti campioni di comparazione dei virus presenti negli animali serbatoio, in modo che si possa supportare la ricerca sulla loro circolazione endemica e la co-infezione.

Le linee genetiche e le varianti virali del SARS-CoV-2 vengono valutate mediante studi di perturbazione dell'energia libera (Free energy perturbation-FEP) e dinamiche molecolari (MD) che eseguono ad esempio serie calcoli sull'interazione del recettore RBD della proteina spike S1 col recettore ACE2 e con anticorpi derivati da pazienti affetti da COVID-19 es. l'anticorpo STE90-C11.5

La variante danese del COVID-19

Il 12 novembre 2020, l'ECDC ha pubblicato un documento nel quale si conferma che nel mese di novembre, la Danimarca aveva riportato 244 casi umani di COVID-19, infetti con una variante del virus SARS-CoV-2 correlato al visone. Nel contempo era stata rilevata la presenza di visoni infetti in più di 200 allevamenti. La maggior parte dei casi nell'uomo e negli animali erano stati diagnosticati nella regione del **North Jutland**. Le varianti del SARS-CoV-2 rinvenute in questi casi erano parte di **almeno cinque focolai strettamente collegati**; ogni focolaio era caratterizzato da una specifica variante visone correlata, identificata nell'uomo e negli animali presenti negli allevamenti infetti. In uno di questi focolai (Cluster 5), nel quale il virus aveva circolato in agosto e settembre 2020, la variante si caratterizzava per quattro modifiche genetiche, tre sostituzioni ed una delezione nella proteina spike (S).

Considerato che la proteina spike S contiene il Receptor-Binding Domain, e che questo è il principale bersaglio per la risposta immunitaria dell'ospite, si è ipotizzato che questa mutazione potesse teoricamente essere implicata in un aumento della capacità del virus di infettare l'uomo e gli animali, nella trasmissibilità e nell'antigenicità. Come conseguenza della evoluzione dei virus l'aumento delle modifiche del dominio funzionale della proteina S, si sarebbe potuta verificare una diminuzione dell'efficacia dei trattamenti, dei test diagnostici, dell'efficacia dei vaccini che si stavano sviluppando. **Ulteriori verifiche e studi su questa variante erano in corso per verificare la portata di queste possibili evenienze.**

La variante danese è stata inserita nel database <https://cov-lineages.org> come Danish lineage il 20.04.2020 riferita alla presenza della sostituzione Y453F.

Per le indagini relative a questa variante **ECDC aveva dato indicazioni prioritarie** per l'implementazione da parte delle autorità nazionali di attività sistematiche riguardanti l'esecuzione di test sull'uomo, sequenziamento e caratterizzazione delle proprietà antigeniche e dell'infettività ed in particolare sui lavoratori e sulle comunità vicine agli allevamenti di visoni.

Veniva chiesto di condurre accurate indagini sui focolai, test sui lavoratori e contact tracing, immediata applicazione dell'isolamento e quarantena nel caso di casi identificati correlabili agli allevamenti di visoni.

Un altro aspetto considerato riguardava **l'applicazione di misure di prevenzione e controllo per gli addetti degli allevamenti e i visitatori** con divieto di accesso agli allevamenti di persone con sintomi compatibili con infezione da COVID-19. Si chiedeva l'adozione di **misure organizzative per garantire la salute e sicurezza dei lavoratori**, formazione, dispositivi di protezione per le vie aeree e per gli occhi, valutando anche le possibili barriere linguistiche legati a lavoratori stagionali.

In un contesto di prevenzione e controllo della diffusione del SARS-CoV-2 negli allevamenti di visoni veniva raccomandata **una sorveglianza ripetuta e/o test sugli animali morti** con frequenza settimanale, misura da mantenere fino a quando non fosse possibile escludere l'esposizione tra uomo ed animali. **Gli isolati di ceppi SARS-CoV-2** da tutti gli animali infetti dovevano essere genotipizzati sistematicamente secondo protocolli validati e sequenziati genotipicamente ed in particolare dai visoni per permettere una rapida identificazione di possibili focolai e delle varianti correlate.

L'abbattimento dei visoni e la gestione delle spoglie animali nelle aziende infette andavano gestite secondo specifici protocolli di biosicurezza

La predisposizione, lo sviluppo e la realizzazione di un programma strategico di risposta One Health prevedeva un forte coordinamento dei settori dell'agricoltura, della salute animale ed umana compresa la salute e la sicurezza occupazionale per dare una pronta ed efficace risposta

Un fattore molto importante è l'accrescimento della consapevolezza del pubblico per quanto concerne gli aspetti di prevenzione correlata ai casi SARS-CoV-2 visone-correlati, la conoscenza di strategie di controllo e prevenzione rivolte specificatamente agli allevatori, ai lavoratori impiegati negli allevamenti, ai veterinari e agli staff veterinari che lavorano negli allevamenti di visoni e dei partners che operano nell'industria delle pellicce.

Questi concetti contenuti nel documento relativo alla comparsa della variante Danese dei visoni, sono poi stati ripresi e sviluppati nei documenti ECDC del SARS-CoV-2 VOC202012/01, lineage B 1.1.7, denominata anche variante inglese e della nuova variante 501.V2, Sud Africa. ⁵⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹

La variante inglese del SARS-Cov-2

Il 19 settembre 2020 il COVID 19-UK Consortium ha pubblicato un documento di aggiornamento sul contesto delle mutazioni tracciate, che **descrive un set di particolare interesse epidemiologico per lo scenario inglese**, basato sulla letteratura scientifica già esistente e su lavori che non erano ancora stati pubblicati.

L'analisi si basa su 126.219 genomi di campioni positivi generati dal consorzio COG-UK con l'identificazione di 1.777 differenti (non identificate con sinonimi) modifiche amino acidiche nel gene S, delle glicoproteine Spike, senza comprendere le mutazioni che non hanno dato un'alternanza dell'amino acido che sono le più numerose o mutazioni comparse altrove nel genoma. Di queste

modifiche non identificate con sinonimi il 37% (n=4) sono state osservate in una singola sequenza, il 5% (n=87) sono state osservate in almeno 100 sequenze.

In particolare sono state investigate da COG-UK cinque rimpiazzi amino acidici, una delezione e combinazioni di alcuni di queste modifiche.

La mutazione D614G non presente nella sequenza iniziale era divenuta ubiquitaria e sembrava associata ad un moderato effetto sulla trasmissibilità del SARS-CoV-2.

La mutazione A222V, presente nel cluster 20A.EU1 SARS-CoV-2, denominato anche lineage B.1.1.7 che era diffuso in Europa, **sembra sia originata in Spagna**. Introduzioni multiple probabilmente associate ai viaggi estivi verso la Spagna ci sono state in Gran Bretagna seguite da diffusione in tutto il Paese.

N439K è comparso in Scozia nel mese di marzo 2020 in una lineage che non ha circolato per molto tempo (B.1.141), ma si è poi ripresentata in UK in molteplici occasioni nel lineage B.1.258. Questo lineage sta circolando ora in molti Paesi Europei e in ambito internazionale.

La mutazione N439K sembra abbia ridotto la sensibilità a piccoli sottoinsiemi di anticorpi monoclonali che riconoscono come bersaglio il recettore RBD, mantenendo nel contempo l'affinità per i recettori ACE2 in vitro.

La proporzione di virus con la sola delezione ΔH69/ΔV70 è progressivamente aumentata da agosto 2020, in concomitanza alla comparsa di una seconda mutazione la N439K. Il 26 novembre 2020 erano presenti almeno il doppio di casi nei quali venivano isolate sequenze cumulative di delezione rispetto a lineage con la singola N439K. Considerato l'alto numero di campioni fatti, **l'Inghilterra è risultata il paese con la più alta proporzione di virus circolante con mutazioni N439K+ ΔH69/ΔV70 rispetto alla lineage che presentava la sola N439K.**

Il basso numero di sequenziamenti in molti altri paesi, indica che **la prevalenza di lineage N439K potrebbe essere relativamente alta così come si è verificato in Scozia.**

In data 26 novembre 2020 era presente una correlazione inversa con evidenza di 546 sequenze N439K contro 177 sequenze N439K+ ΔH69/ΔV70. Queste differenze riflettono la comparsa di caratteristiche differenti nell'evoluzione epidemica e contestualizzano i momenti in cui si sono diffuse le varianti N439K con o senza delezione.

Il 20 dicembre 2020 l'ECDC ha pubblicato il documento *Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom*, nel quale vengono riportati i dati relativi all'analisi della sequenza del genoma virale identificato conseguenti alla comparsa di un grande numero di casi appartenenti ad una nuova variante caratterizzata da mutazioni multiple della proteina S, Δ69/Δ70, del144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H. Dalle analisi preliminari condotte in UK emergerebbe che **questa variante è significativamente più trasmissibile di quelle che circolavano precedentemente**, con una stima potenziale di aumento del numero di riproduzione di base R0 ovvero la trasmissibilità potenziale di una malattia infettiva non controllata dello 0.4 o maggiore. **L'aumento stimato di trasmissibilità poteva arrivare fino al 70%. Lo studio non riporta evidenze relative alla presenza di quadri clinici di maggiore gravità rispetto alla diffusione della nuova variante.** Qualche caso legato a questa variante è stato riportato in Danimarca, in Olanda e secondo quanto riferito dai media anche in Belgio

Nella successive tabelle sono riportati i dati cumulativi delle mutazioni di particolare interesse registrate in UK nel periodo 13.11.2020-10.12.2020 ed le informazioni importanti per le varianti maggiormente studiate in UK.

Table 1a. Priority mutations being tracked by COG-UK

Mutation	Predominant Lineage	Reasons for tracking	Cumulative number in UK	Number over last 28 days (13/11/2020 - 10/12/2020)
D614G	B.1	Moderate effect on transmissibility	118,906	11,447
A222V	B1.177	Fast growing lineage but no evidence of mutation effect	46,710	7,856
N439K	B.1.141 B.1.258	1) Increased binding affinity to hACE2 receptor 2) Escape to some mAbs	3,320	246
Δ69-70	B.1.1 B.1.258	1) Evasion immune response 2) Diagnostic failure in some assays targeting the S gene including the three-target TaqPath assay and the two-target Biofire assay	3,504	1,228
N501Y	B.1.1.7	Fast growing lineage & increased binding affinity to hACE2 receptor	2,057	1,182
N501Y + Δ69-70	B.1.1.7	Likely to maintain characteristics described for N501Y and 69-70del	1,524	1,034
N439K + Δ69-70	B.1.258	Likely to maintain characteristics described for N439Y and 69-70del	1,895	176
Y453F	B.1.1 B.1.1.298	1) Increase binding affinity to hACE2 receptor 2) Escape to some mAbs Human/mink associated	0	0

Cumulative number as of December 15 based on data deposited into CLIMB. Caution is required since the data will not include information from the last 2 weeks.

Table 1a. Priority mutations being tracked by COG-UK

Mutation	Predominant Lineage	Reasons for tracking	Cumulative number in UK	Number over last 28 days (13/11/2020 - 10/12/2020)
D614G	B.1	Moderate effect on transmissibility	118,906	11,447
A222V	B1.177	Fast growing lineage but no evidence of mutation effect	46,710	7,856
N439K	B.1.141 B.1.258	1) Increased binding affinity to hACE2 receptor 2) Escape to some mAbs	3,320	246
Δ69-70	B.1.1 B.1.258	1) Evasion immune response 2) Diagnostic failure in some assays targeting the S gene including the three-target TaqPath assay and the two-target Biofire assay	3,504	1,228
N501Y	B.1.1.7	Fast growing lineage & increased binding affinity to hACE2 receptor	2,057	1,182
N501Y + Δ69-70	B.1.1.7	Likely to maintain characteristics described for N501Y and 69-70del	1,524	1,034
N439K + Δ69-70	B.1.258	Likely to maintain characteristics described for N439Y and 69-70del	1,895	176
Y453F	B.1.1 B.1.1.298	1) Increase binding affinity to hACE2 receptor 2) Escape to some mAbs Human/mink associated	0	0

Cumulative number as of December 15 based on data deposited into CLIMB. Caution is required since the data will not include information from the last 2 weeks.

Il lavoro scientifico Recurrent emergence and transmission of a SARS-CoV-2 Spike deletion ΔH69/V70, pubblicato il 15 dicembre 2020, documenta nuove emergenze legate a fenomeni di

insuccesso anticorpale mediato dalla glicoproteina Spike, in un individuo trattato con plasma di soggetti convalescenti, in uno scenario determinato dalla mutazione D614G. Simili delezioni, nel Dominio-specifico N-Terminale degli anticorpi neutralizzanti (NTD), sono state segnalate su soggetti nei quali c'erano state mancate risposte alla cura con anticorpi. **Le modifiche dinamiche delle varianti Spike ΔH69/ΔV70, una delezione D796H si sono verificate in seguito ad utilizzi ripetuti di Plasma;** il mutante in vitro ha mostrato ridotta sensibilità alla terapia con plasma e altre tipologie di sieri, mantenendo un'infettività comparabile al virus selvaggio. **Si è ipotizzato che la delezione sullo spike Δ69/ΔV70 sia avvenuta in risposta compensatoria e/o evasione anticorpale** così come è stato indicato per altre delezioni Dominio-specifico N-Terminale degli anticorpi neutralizzanti (NTD). Successivamente si è creata la necessità di caratterizzare le circostanze specifiche della nuova emergenza globale determinata dalla ΔH69/ΔV70.¹²

Il documento analizza i dati di pubblicazione reperibili nel sito GISAID relativi alla circolazione di SARS-CoV-2 con sequenze ΔH69/ΔV70. **È difficile prevedere l'importanza di ogni mutazione che compare per la prima volta quando si lavora in uno scenario emergenziale con continue comparse di nuove mutazioni.**

Vengono adottati al riguardo diversi approcci per identificare mutazioni di un certo interesse. Si considerano interessanti le mutazioni che teoricamente vengono identificate potenzialmente importanti negli esperimenti di laboratorio, ma i cui effetti non sono ancora comparsi sull'uomo, per capire rapidamente quale importanza possono avere in caso di reale diffusione. Si osservano le tendenze e la relativa frequenza di comparsa di varianti virali specifiche. **Se queste varianti compaiono maggiormente in una popolazione, rispetto ad altre varianti, si deve procedere alle necessarie verifiche per spiegare il fenomeno.** Una delle possibili ragioni è che un virus nel quale si verificano specifiche mutazioni o combinazioni di mutazioni, **può diffondere più rapidamente in una popolazione per una maggiore infettività o trasmissibilità.**

È necessario dare risposte agli interrogativi che si pongono quando gruppi in di persone sembra che l'infezione sia più grave. Allora si procede con test di sequenziamento ed analisi dei genomi.

Sarà importante sequenziare il virus SARS-CoV-2 man mano che viene estesa la profilassi vaccinale e questa riguarderà anche persone infette già vaccinate o persone che si infettano per la seconda volta, con l'obiettivo di scovare nuove varianti che hanno eluso il sistema immunitario, con meccanismi legati alla precedente infezione o alla vaccinazione.⁸

La variante sudafricana del SARS-COV-2

Il 29 dicembre 2020 l'ECDC ha pubblicato una rapida valutazione del rischio relativa alla comparsa della variante 501.V2 in Sud Africa nel mese di ottobre confermata mediante sequenziamento dell'intero genoma e diventata in quel Paese la forma dominante. Questa variante si caratterizza per un'augmentata trasmissibilità.

Il 22 dicembre 2020 è stata isolata la variante 501.V2 sudafricana nel Regno Unito (due casi geograficamente separati) ed in Finlandia (un caso), relativi ad individui sintomatici venuti a contatto con persone provenienti dal Sud Africa. **L'ECDC ha stimato che il rischio di introduzione e di probabile diffusione in Europa delle varianti SARS-CoV-2 VOC 202012/01 e 501.V2 è alto a causa della maggiore trasmissibilità** in termini di ospedalizzazione e mortalità di persone anziane, che presentano altre patologie concomitanti.

ECDC prescrive agli Stati Membri l'intensificazione delle misure per l'identificazione mediante sequenziamento delle nuove varianti e l'aumento delle attività di controllo mediante test nelle popolazioni epidemiologicamente collegate a focolai o contatti con individui positivi per le varianti inglese e sudafricana.

Nello stesso documento si riportano i tassi di ospedalizzazione, occupazione dei posti di terapia intensiva (Intensive Care Unit-ICU) dell'ultima settimana di dicembre segnalando un forte aumento dei casi in 30 Paesi rispetto alla settimana precedente ed una mortalità di persone con età maggiore di 45 anni aumentata in 29 Paesi.⁹

Il 4 gennaio 2021, il Ministro della Salute Inglese ha dichiarato di essere particolarmente preoccupato per l'insorgenza di casi della variante Sud Africa nel suo Paese dopo che il Prof. John

Bell, della Oxford University che ha partecipato allo sviluppo del vaccino appena autorizzato per l'uso nel Regno Unito, ha definito la questione relativa all'efficacia del vaccino contro questa variante un "grande punto interrogativo". Anche il Prof. Simon Clarke, microbiologo cellulare associato all'Università di Reading, ha dichiarato che le due varianti Inglese e Sud Africa avevano molte caratteristiche comuni e che la variante Sud Africa potrebbe avere mutazioni aggiuntive tali da rendere il virus meno sensibile alla risposta immunitaria stimolata dai vaccini.

Riferimenti

1. *Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic*
<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0771-4>
2. *Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2, Irlanda Alvarado Amador et al.*
<https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2020/lips201b.pdf>
3. *COVID-19 lung damage caused by persistence of 'abnormal cells, King's College London*
<https://www.sciencedaily.com/releases/2020/11/201104001307.htm>
4. *Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies*
<https://www.nature.com/articles/s41423-020-0458-z>
5. *Detection of new SARS-CoV-2 variants related to mink 12 November 2020*
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-SARS-CoV-2-in-mink-12-nov-2020.pdf>
6. *The SARS-CoV-2 S1 spike protein mutation N501Y alters the protein interactions with both hACE2 and human derived antibody: A Free energy of perturbation study, F.Fratev*
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.23.424283v1>
7. *Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein*
Andrew D. Davidson^{1*} et al
<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00763-0>
8. *COG-UK update on SARS-CoV-2 Spike mutations of special interest Report 1 Prepared by COG-UK, 19th December 2020*
https://www.cogconsortium.uk/wp-content/uploads/2020/12/Report-1_COG-UK_20-December-2020_SARS-CoV-2-Mutations_final_updated2.pdf
9. *Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom Risk related to spread of new SARSCoV-2 variants of concern in the EU/EEA 29 December 2020*
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/SARS-CoV-2-variant-multiple-spike-protein-mutations-United-Kingdom.pdf>
10. *Risk related to spread of new SARSCoV-2 variants of concern in the EU/EEA*
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-risk-related-to-spread-of-new-SARS-CoV-2-variants-EU-EEA.pdf>
11. *Sequencing of SARS-CoV-2 23 December 2020*
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/sequencing-of-SARS-CoV-2.pdf>
12. *Recurrent emergence and transmission of a SARS-CoV-2 Spike deletion Δ H69/ Δ V70 SA Kemp, RP Datir, DA Collier, IATM Ferreira, A Carabelli, W Harvey, DL Robertson, View ORCID ProfileRK Gupta*
<https://doi.org/10.1101/2020.12.14.422555>