

VITA: ORIGINE & EVOLUZIONE

COLLANA DI MONOGRAFIE BIOLOGICHE

SEZIONE SCIENTIFICA

9

Direttore

GIOVANNI PARISI
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Comitato scientifico

ANTONIO ARIANI
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Karl J. WITTMANN
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

VITA: ORIGINE & EVOLUZIONE

COLLANA DI MONOGRAFIE BIOLOGICHE

SEZIONE SCIENTIFICA

Negli ultimi decenni la Biologia ha compiuto, a seguito della scoperta della struttura e della funzione genetica del DNA, un decisivo balzo in avanti, che può ben richiamare quel movimento innovatore che si produsse nelle scienze fisiche dopo la scoperta, agli inizi dello scorso secolo, dei quanti di energia. La moderna teoria del gene che rapidamente si è composta come un corpo di dottrina a sé, ha permesso di chiarire numerosi meccanismi molecolari che sono alla base di fondamentali processi biologici.

L'analisi dei fatti fondamentali che caratterizzano il fenomeno della vita non si esaurisce, però, nella sola indagine intorno allo studio dei meccanismi molecolari che discendono dall'attività dei geni. La prodigiosa diversità delle forme viventi, peculiare carattere del fenomeno vita, ha indotto a cogliere di volta in volta, ai vari livelli dell'organizzazione nella *gerarchia* dei sistemi biologici, fatti essenziali di portata generale comuni a tutto ciò che vive.

Questa Collana di monografie biologiche offre saggi sui temi dominanti della biologia generale, cellulare e molecolare, nonché della genetica nelle sue varie articolazioni comprendente l'ingegneria genetica e le biotecnologie. Arricchiscono la collana in oggetto particolari monografie che illustrano il dibattito scientifico e l'evoluzione delle tecnologie che hanno consentito nel tempo il progresso delle scienze biologiche. Tematiche di fondamentale importanza, uniche nella editoria italiana, che consentono al lettore di rendersi meglio conto di come sia stato possibile pervenire agli attuali livelli di conoscenze in ambito biologico.

La collana comprende una sezione scientifica ed una sezione divulgativa.

La sezione scientifica persegue l'obiettivo di presentare, in modo scientificamente rigoroso, le più importanti recenti acquisizioni in ambito biologico e le loro numerose applicazioni.

La sezione divulgativa predilige, invece, volumi di ampio respiro che illustrano la Biologia in maniera adeguata a qualsiasi lettore che abbia interesse alle molteplici odierne tematiche biologiche.

Il Consiglio scientifico, del quale hanno accettato di far parte illustri studiosi di varie Istituzioni accademiche nazionali e internazionali, e la procedura predisposta per la valutazione dei contributi costituiscono una garanzia di qualità e di rigore scientifico.

GIOVANNI PARISI

CORONAVIRUS: STORIA E PROSPETTIVE





©

ISBN
979-12-5994-369-9

PRIMA EDIZIONE
ROMA 16 SETTEMBRE 2021

INDICE

- 9 *Prefazione*
- 11 Capitolo I
Breve storia delle ricerche che portarono alla scoperta dei primi
Coronavirus
- 23 Capitolo II
I primi venti anni di studio che posero le basi per una migliore
conoscenza dei coronavirus
- 29 Capitolo III
Tassonomia dei Coronavirus
- 41 Capitolo IV
Cenni di biologia molecolare dei Coronavirus
- 59 Capitolo V
Coronavirus umani con esclusione di SARS-CoV-1, MERS-CoV e
SARS-CoV-2
- 69 Capitolo VI
SARS-CoV-1

77 Capitolo VII
MERS-CoV

85 Capitolo VIII
Aspetti generali di SARS-CoV-2

8.1. Introduzione, 87 — 8.2. Alcuni aspetti del Covid-19, 91 — 8.3. Modalità di contagio di Covid-19, 92 — 8.4. Infettività, persistenza e stabilità di SARS-CoV-2 su superfici inerti contaminate, 95 — 8.5. Trasmissione da insetti, 96 — 8.6. Trasmissione da animali, 97 — 8.7. Organizzazione del genoma, 100 — 8.8. Isolamento del virus, 104 — 8.9. Microscopia elettronica a trasmissione e morfogenesi di SARS-CoV-2 in cellule VeroE6, 105 — 8.10. Diagnosi di infezione da SARS-CoV-2, 106.

117 Capitolo IX
Le proteine di SARS-CoV-2

9.1. Proteine non strutturali, 119 — 9.2. Proteine strutturali, 125 — 9.3. Proteine accessorie, 130.

133 Capitolo X
SARS-CoV-2 Ciclo biologico

10.1. Riconoscimento del recettore ACE2 e penetrazione nell'ospite cellulare, 135 — 10.2. *Traduzione* e replicazione del genoma, 138 — 10.3. Assemblaggio e rilascio dei virioni, 141.

147 Capitolo XI
Vaccini e farmaci antivirali

11.1. Tre decenni di ricerche, difficili e talvolta controverse, che hanno dato luogo alla tecnologia a mRNA, *leader* nella produzione del vaccino anti Covid-19, 149 — 11.2. Vaccini contro il Covid-19, 156 — 11.3. Mutazioni e varianti del virus SARS-CoV-2, 172 — 11.4. Ricerca di specifici farmaci contro il Covid-19, 177 — 11.5. Una potenziale terapia per il Covid-19 mediante siRNA, 185.

PREFAZIONE

La pandemia di Covid-19, generata da un nuovo coronavirus, ha colto di sorpresa governi e istituzioni di tutto il mondo, anche se numerosi studiosi, nel corso degli anni, in special modo dopo l'epidemia di SARS, a cavallo tra il 2002 e il 2003, avessero più volte segnalata la possibilità di pandemie da virus emergenti ed in particolare da coronavirus.

Purtroppo questa possibilità, chiaramente prevista dalla comunità scientifica internazionale, è stata colpevolmente ignorata cosicché non è stato considerato il possibile arrivo di uno *tsunami* virale, per cui non sono stati elaborati per tempo adeguati piani antipandemici, anche perché non è stato preso sul serio il fatto che un virus potesse sconvolgere l'assetto mondiale.

Prima del massiccio avvento della globalizzazione e prima che la Cina irrompesse sullo scacchiere mondiale, sembrava che le epidemie e le pandemie fossero confinate in luoghi esotici e lontani. La realtà ha dimostrato che non è così e che oggi, con un semplice volo intercontinentale, è possibile, in meno di ventiquattro ore, trasferire da un continente all'altro un virus, caratterizzato dall'alta contagiosità. Al momento l'ipotesi più accreditata è che da un mercato di animali selvatici di Wuhan, uno tra i tanti diffusi in tutta la Cina, luoghi pericolosissimi da un punto di vista epidemiologico, il nuovo coronavirus in pochi mesi sarebbe riuscito a mettere radici in buona parte del nostro pianeta mettendo in ginocchio, in poche settimane anche raffinati sistemi sanitari e prodotto milioni di vittime. L'assidua vicinanza tra esseri umani e animali di ogni tipo ha favorito lo *spillover*, quel salto di specie che ha consentito a virus animali di evolvere e diventare in grado di infettare, riprodursi

e trasmettersi all'interno della specie umana. Così è nata l'epidemia generata dal SARS-CoV-1 (2002-2003), così l'attuale pandemia che avrebbe potuto essere, se non evitata, quanto meno contenuta.

Da decenni i coronavirus sono considerati come un importante gruppo di virus responsabili di una serie di malattie di importanza clinica in animali e nell'uomo. Recentemente, a seguito dell'attuale pandemia da Covid-19, la comunità scientifica internazionale ha prodotto in tempi brevissimi numerosi nuovi e interessanti dati sulla biologia molecolare e sulla patogenesi dei coronavirus ed in particolare su SARS-CoV-2, l'agente patogeno dell'attuale pandemia da Covid-19. Informazioni di particolare importanza che hanno consentito in tempi altrettanto brevi di allestire una serie di efficaci vaccini, di iniziare promettenti ricerche su possibili farmaci antivirali, continuamente migliorare i protocolli farmacologici, purtroppo ancora non risolutivi.

Questo libro è stato concepito in modo da offrire sia una trattazione comprensiva per il neofita della materia in oggetto, sia per coloro, che grazie alla bibliografia opportunamente selezionata, volessero ulteriormente approfondire le proprie conoscenze sui coronavirus in generale ed in particolare su SARS-CoV-2. Spero, inoltre, che questo libro possa contribuire a fornire un esauriente insieme di corrette informazioni, posto che in questi anni di pandemia c'è stata molta disinformazione diffusa attraverso i *social network* e alcuni canali radio e televisivi.

Desidero ringraziare mia moglie per le sue non comuni doti di pazienza e di comprensione, nonché per avermi costantemente incoraggiato a proseguire l'opera intrapresa, la cui gestazione è stata molto più lunga e impegnativa del previsto.

CAPITOLO I

BREVE STORIA DELLE RICERCHE CHE PORTARONO ALLA SCOPERTA DEI PRIMI CORONAVIRUS

Nel 1931, Arthur Schalk e Merle Hawn (*North Dakota Agricultural College*) descrissero nel Nord Dakota una grave infezione respiratoria dei polli, apparentemente nuova, con tassi di mortalità dal 40% al 90%. La malattia si dimostrò essere una bronchite infettiva (**IB** o *Infectious Bronchitis*) facilmente trasmissibile per contatto o per trasferimento di essudato bronchiale in polli sani. La natura dell'agente infettivo non fu però determinata.

Due anni dopo, Leland David Bushnell e Carl Alfred Brandly (*Kansas Agricultural Experiment Station-Manhattan*) riferirono di aver individuato una malattia sostanzialmente identica e supposero che l'agente causale di quella patologia fosse un virus filtrabile, in quanto la malattia poteva essere trasmessa da materiale passato attraverso un filtro Berkefeld e conclusero che essa fosse una forma di laringotracheite infettiva (**LT** o *Laryngotracheitis*). Non furono, però, effettuate ulteriori ricerche per confermare questa identità.

A questo punto, negli anni Trenta, si generò una notevole confusione. Il nome bronchite infettiva fu usato in non pochi lavori da ricercatori che invece descrivevano una laringotracheite. Altri ricercatori, d'altro canto, basandosi sul lavoro di Bushnell e Brandly, descrissero ulteriori focolai di bronchite infettiva (**IB**) come laringotracheite infettiva (**LT**), mentre per altri ricercatori la bronchite infettiva e la laringotracheite infettiva dei polli furono invece considerate differenti patologie, come ipotizzato da J.R.Beach e O.W.Schalm (*Division of Veterinary Science, University of California-Berkeley*) mediante studi sull'immunità crociata nei polli.

Nel 1937, infine, Fred Robert Beaudette (1897-1957) e Charles Hudson (*New Jersey Agricultural Experiment Station*) isolarono e coltivarono, in embrioni di pulcini inoculati per via corioallantoidea, il virus della bronchite che denominarono **IBV** (o *Infectious Bronchitis Virus*).

Negli anni Quaranta furono inoltre isolati altri tre virus animali, precisamente nel 1946 il virus della gastroenterite trasmissibile (**TGEV** o *Transmissible Gastroenteritis Virus*), nel 1949 il virus **JHM**, così denominato in onore del batteriologo americano John Howard Mueller (1891-1954), responsabile della encefalomyelite acuta disseminata (*acute disseminated encephalomyelitis*) con ampia distruzione della mielina, successivamente definito un sierotipo del virus dell'epatite di topo (**MHV** o *Mouse Hepatitis Virus*) descritto nel 1951, senza che ci si rendesse conto che questi tre diversi virus fossero strutturalmente correlati.

Ulteriori ricerche consentirono di isolare ancora altri virus, tra questi alcuni interessanti sierotipi del virus MHV, ma anche di migliorare la conoscenza di quelli già noti. In particolare, nel 1958, Morris S. Cover (1916-2003) e W.J. Benton (*University of Delaware-Newark*) conclusero che le patologie precedentemente denominate IB e LT fossero dovute non soltanto allo stesso virus, ma dovessero essere considerate particolari forme di LT di blanda o bassa virulenza.

Mentre procedevano siffatte ricerche di virologia veterinaria, nel Regno Unito, presso la *Common Cold Research Unit (CCU)*, fondata nel 1946 da Sir Christopher Andrewes (1896-1988), si conducevano ricerche di laboratorio ed epidemiologiche sul comune raffreddore.

Il CCU era localizzato ad Harnham Down un sobborgo della città di Salisbury nel Wiltshire dove usufruiva dei locali di un ex ospedale militare della Croce Rossa americana caduto in disuso dopo la seconda guerra mondiale.

Sebbene il raffreddore comune fosse una patologia umana molto frequente e diffusa in tutto il nostro pianeta e notevole fosse il suo impatto economico, negli anni Cinquanta dello scorso secolo molto poco si conosceva sulla sua eziologia.

Attualmente i *National Institutes of Health* statunitensi stimano che ogni anno circa un miliardo di persone contraggono il raffreddore.

Nel 1914 il batteriologo tedesco Walther Kruse (1864-1943) aveva dimostrato che le secrezioni nasali di una persona con il raffreddore comune potevano trasmettere la malattia a individui sani mediante inoculazione intranasale di quelle secrezioni dopo opportuna filtrazione, sia attraverso filtri Seitz sia candele Berkefeld, per rimuovere i materiali cellulari e batterici.

L'importante risultato di questi esperimenti non fu immediatamente colto, sia a causa dello scoppio della prima guerra mondiale, sia del fatto che occorreva ulteriormente controllare che le filtrazioni effettuate avessero sicuramente impedito la trasmissione di batteri.

Successivamente il microbiologo americano Alphonse Raymond Dochez (1882-1964), in circa 15 anni di accurate ricerche, non soltanto confermò che il raffreddore comune non era causato da batteri, ma avanzò l'ipotesi dell'eziologia virale di questa patologia, una ipotesi che restò tale in quanto le tecniche di cui si disponeva in quegli anni non erano abbastanza sofisticate per una conclusiva dimostrazione.

Soltanto alcuni anni dopo, indipendentemente tra loro, in due diversi laboratori, che si proponevano di identificare l'agente eziologico del comune raffreddore, fu isolato per la prima volta un virus responsabile di quella patologia.

Concorsero a questa scoperta Winston Harvey Price (1923-1981) nel 1956 e William Pelon nel 1957. Il primo era un epidemiologo americano, con un particolare interesse per le malattie infettive, che lavorava presso la *Johns Hopkins University*, mentre il secondo lavorava presso la *Common Cold Research Unit*.

Il virus fu da Price denominato JH, in onore di Johns Hopkins, e da Pelon GL2060. Successivamente, nel 1961, sarà denominato dal biologo inglese Christopher Howard Andrewes (1896-1988) *rhinovirus*, primo di quella che sarà un'ampia serie di virus generalmente designati *human rhinovirus* (HRV), appartenenti alla famiglia *Picornaviridae* facente parte del genere *Enterovirus*.

Sebbene il lavoro di Price, pubblicato nel 1956 e una sua successiva nota del 1957, con la quale annunciava la possibilità di allestire un vaccino per il comune raffreddore, fossero favorevolmente valutati dal *Public Health Research Institute* numerosi virologi, primo tra questi Pelon, contestarono i suoi metodi e i suoi dati.

Nel 1957, David Arthur John Tyrrell (1925-2005), un giovane virologo britannico che aveva acquisito una specifica solida preparazione, avendo usufruito di una borsa di ricerca triennale presso il *Virology Laboratory of Rockefeller Institute* di New York sotto la direzione di Frank Lippin Horsfall (1906-1971), su



Figura 1. David Arthur John Tyrrell

segnalazione del virologo scozzese Alick Isaacs (1921-1967) fu invitato da Sir Harold Himsworth, segretario del *Medical Research Council (MRC)*, a rientrare nel Regno Unito per lavorare presso la *Common Cold Research Unit (CCU)*.

Tenuto conto di quanto sembrava acquisito, che esistesse un singolo virus responsabile del comune raffreddore, Tyrrell, avvalendosi delle primitive tecniche di coltura utili per la crescita di virus, che aveva impiegato nei laboratori del *Rockefeller Institute* di New York, provò a crescere il virus del raffreddore in uova embrionate (uova di pollo fecondate) innescate con secreto nasale di pazienti con raffreddore. Il parziale insuccesso registrato lo indusse a cercare di crescere il virus in colture di tessuti. Fu così che dopo pochi giorni notò in una di tali colture un evidente effetto citopatico, precisamente quell'insieme di cambiamenti morfologici che le cellule infette da virus possono assumere. Questo particolare effetto gli confermò di essere riuscito a crescere in laboratorio il virus del raffreddore. Un risultato di notevole importanza che gli consentì di cominciare ad infettare numerosi volontari al fine di esaminare le caratteristiche cliniche del comune raffreddore e acquisire notizie sul meccanismo di trasmissione di siffatta patologia.

A questo punto, in successivi accurati esperimenti, Tyrrell dimostrò anche che l'agente eziologico derivato da colture innescate da secreti nasali di differenti pazienti affetti da raffreddore non era sempre lo stesso in quanto non tutti erano inattivati dall'etere etilico, un comune solvente dei lipidi.

Si ipotizzava così, per la prima volta, che vi fossero diversi virus, con proprietà diverse, responsabili del comune raffreddore. Una ipotesi avvalorata dal fatto che virus derivati da differenti colture producevano raffreddori dopo periodi di incubazione diversi, tre o quattro giorni anziché uno o due. Tenuto conto di questi iniziali interessanti risultati, Tyrrell decise di allestire colture di organo, che sembravano più adatte delle colture tissutali, per crescere ed isolare eventuali virus dell'apparato respiratorio. Fu così che utilizzando principalmente colture organotipiche di trachea embrionale umana iniziò a isolare un crescente numero di virus. Complessivamente isolò oltre un centinaio di nuovi virus responsabili dell'insorgenza del raffreddore, un numero destinato ulteriormente a crescere nel tempo grazie al contributo di numerosi altri studiosi. Attualmente se ne contano oltre 200 potenzialmente in grado di provocare la malattia.

Una volta accertato che il raffreddore era causato da un numero così alto di virus diversi, divenne subito chiaro che sarebbe stato impossibile vaccinare contro ciascuno di questi agenti eziologici.

Proseguendo i suoi studi sul comune raffreddore alla ricerca di nuovi virus, nel 1960, Tyrrell, in collaborazione con Malcolm Leslie Bynoe (1905-1969), decise di sottoporre a tampone faringeo, per l'esame batteriologico e lavaggio nasale, per lo studio virologico, tutti gli studenti affetti da raffreddore dell'*Epsom College*, una scuola maschile co-educativa indipendente a Epsom Downs-Surrey. Un accurato esame dei materiali raccolti consentì di isolare 18 virus. Tra questi vi era un virus che denominò B814 il quale certamente non era né un adenovirus, né un enterovirus e tanto meno un rhinovirus, in quanto era inattivato dall'etere etilico. Inoltre, non era possibile coltivare questo particolare virus in colture di tessuti, ma soltanto in colture di organi. Infine soggetti sani che si erano offerti come volontari, trattati con antibiotici, svilupparono il raffreddore dopo inoculazione intranasale di secrezioni derivate dal soggetto nel quale era stato individuato il virus B814. Un virus che sembrava non correlato con nessun altro noto in quel momento per cui si sospettò che fosse completamente nuovo.

Più o meno nello stesso periodo, 1965-1966, Dorothy Hamre (1915-1989) e John Procknow, presso il dipartimento di medicina dell'Università di Chicago, isolarono da uno studente di medicina, affetto da raffreddore, un nuovo virus che denominarono 229E, che coltivarono nella linea cellulare diploide umana Wi-38. Anche questo virus, così come il virus B814, quando inoculato in volontari causò un raffreddore e fu inattivato dall'etere etilico.

A questo punto Tyrrell, affinché il virus B814 fosse sottoposto ad una accurata indagine morfologica, decise, nel 1964, di contattare, presso la *St Thomas's Hospital Medical School* di Londra, June Dalziel Almeida (1930-2007), una giovane virologa britannica, la quale era ben nota per aver messo a punto, quando lavorava presso l'*Ontario Cancer Institute* di Toronto, una tecnica innovativa di microscopia elettronica, l'immuno-elettromicroscopia (IEM), che consentiva una migliore osservazione dei virus grazie all'utilizzo di anticorpi specifici, capaci di legarsi ad essi, prelevati da individui infetti.

Questo metodo, che le aveva permesso di meglio descrivere particolari strutture virali, aveva attirato, nel 1964, l'attenzione di Anthony Peter Waterson (1923-1983), capo del dipartimento di microbiologia della Scuola di Medicina al *St Thomas*, il quale, durante una sua visita a Toronto, la reclutò per integrarla nel suo gruppo di ricerca in una delle scuole mediche più antiche e prestigiose del Regno Unito, ora parte del *King's College* di Londra.



Figura 2. June Dalziel Almeida nel suo laboratorio di microscopia elettronica presso l'*Ontario Cancer Institute* di Toronto nel 1963.

Nel 1964, nel suo nuovo laboratorio di microscopia elettronica del *St. Thomas*, l'Almeida iniziò a esaminare essenzialmente il virus B814, che le era stato fornito da Tyrrell, e successivamente il virus 229E isolato da Hamre e Procknow, ambedue coltivabili soltanto in colture di organi, inattivati dall'etere etilico e non precedentemente caratterizzati.

Già da un primo esame, confermato da ulteriori osservazioni, l'Almeida notò che i due virus in esame erano morfologicamente e biologicamente simili, sostanzialmente confrontabili con il virus della bronchite infettiva dei polli (IBV) così da formare un gruppo ben definito e distinto. Inoltre erano diversi da qualunque altro virus del tratto respiratorio umano in quel tempo conosciuto. Fermamente convinta di aver scoperto una nuova famiglia di virus presentò i risultati della sua indagine a una rivista scientifica, che però le rifiutò la pubblicazione in quanto i revisori si dichiararono convinti che le immagini fornite fossero soltanto delle brutte foto del virus influenzale. Successivamente, però, il lavoro di Almeida fu pubblicato sul *British Medical Journal* nel 1965, e alcune fotografie delle sue prime analisi sul *Journal of General Virology* nel 1967.