

SARS-COV-2: ORIGINE, TRASMISSIONE, PATOGENESI

Maria Grazia Cusi

Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena
17 dicembre 2020

È veramente un onore per me essere qui e poter discutere con voi di questo virus che purtroppo sta flagellando l'umanità da più di un anno. Comincerò col dare indicazioni sulla definizione e classificazione di questo virus. Questo virus appartiene alla famiglia dei *Coronaviridae*. Questa famiglia è suddivisa in quattro generi importanti, gli Alfa, i Beta, i Gamma e i Delta Coronavirus. Gli Alfa e i Beta sono coronavirus che infettano i mammiferi, infettano l'uomo e qualche uccello. I Gamma e i Delta coronavirus infettano molte specie aviarie e qualche mammifero. I Coronavirus sono noti come agenti infettivi per gli uomini dalla fine del secolo scorso. Nel 1980 furono identificati alcuni coronavirus in quanto virus respiratori e causa anche di gastroenteriti. Sono virus che circolano normalmente durante l'anno, nella stagione autunno-invernale e possono causare questo tipo di malattia nell'uomo. Finora non avevano dato problemi molto gravi; appartengono però sempre al genere del Betacoronavirus, insieme con il virus della SARS e della MERS e sicuramente molti ricordano che questi due virus sono stati causa di pandemie molto più limitate di quella che stiamo vivendo ora e che si sono manifestate negli anni precedenti: la SARS nel 2002 e la MERS nel 2012. Nello stesso genere Betacoronavirus è presente anche il coronavirus che infetta i pipistrelli. E questo ci interesserà dopo, per vedere come mai questo virus poi ha infettato l'uomo.

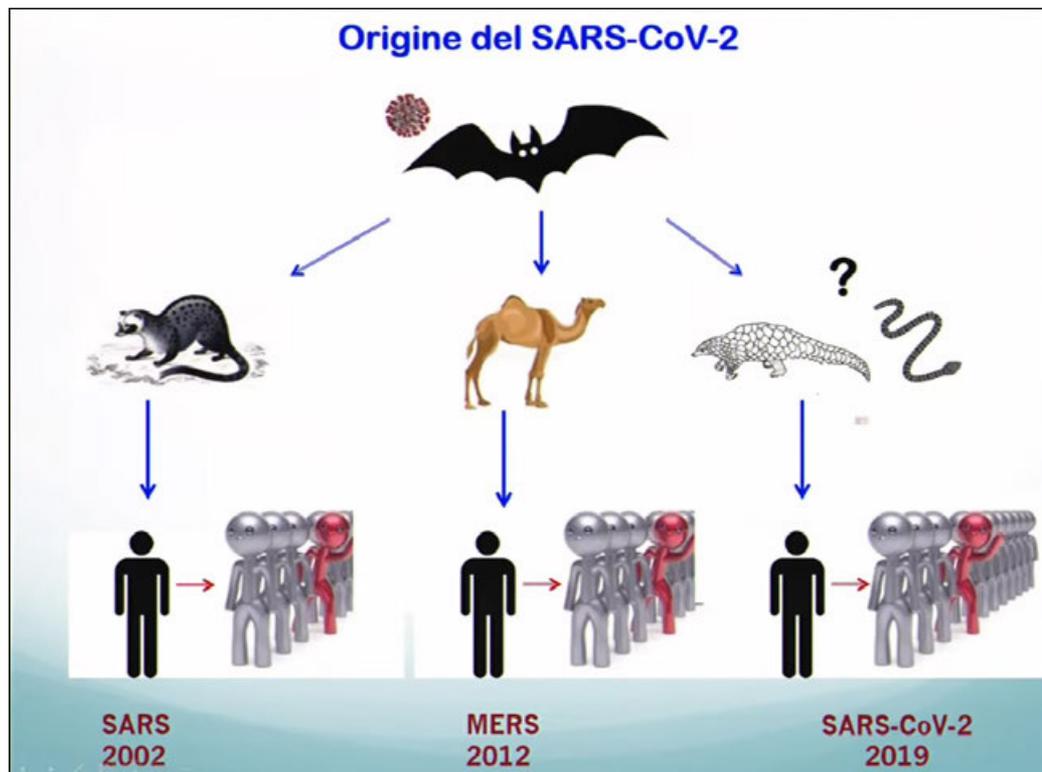
CRONISTORIA DELLA PANDEMIA

Ricontrolliamo un attimo quella che è la cronistoria della pandemia da COVID-19. Il 31 dicembre 2019 le autorità cinesi notificano un focolaio di polmoniti ad eziologia ignota, nella città di Wuhan, che è una delle più grandi, mi sembra che sia la nona città, provincia cinese, per popolazione e grandezza e, soprattutto, i casi principalmente riconosciuti erano soggetti che avevano frequentato il South China Sea Food, il mercato di alimenti ittici. Il 9 gennaio 2020 il CDC cinese identifica il virus e lo chiama coronavirus nCoV come agente che

causa polmonite nella popolazione e che soprattutto ha un tipo di diffusione interumano. Il 30 gennaio 2020, l'Istituto Superiore di Sanità ha confermato i primi due casi di infezione da SARS-CoV-2 in Italia e nel febbraio, prima l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha dichiarato il COVID-19 come malattia respiratoria emergente, successivamente, l'11 marzo, ha dichiarato la pandemia. Dobbiamo dire che in realtà questo virus circolava nell'area prima di dicembre e sappiamo tutti che ci sono stati dei ritardi nella notifica della circolazione di questo virus, nonché anche nella notifica della pandemia. I recenti lavori pubblicati hanno mostrato come questo virus circolasse anche in altre aree ed è stato confermato anche dal caso di un bambino a Milano, che, nell'autunno del 2019, si è presentato in ospedale con febbre ed esantema e con un sospettato caso di morbillo. Il morbillo non fu confermato ma il tampone naso-faringeo, prelevato in quel periodo, è stato recentemente ricontrollato, saggiato ed è stato visto che era un caso di SARS-CoV-2. Questa è una indicazione abbastanza importante per dire che alcuni casi già circolavano dall'autunno del 2019 e non soltanto in Cina.

ORIGINE DEL SARS-CoV-2

Com'è che questo virus ha cominciato ad infettare l'uomo? Sicuramente l'origine di questo virus parte dal coronavirus che infetta il pipistrello e il pipistrello poi lo



trasmette a un ospite intermedio che ha dato origine a delle pandemie diverse. Nel caso della SARS del 2002, il virus è passato allo zibetto che è un animale domestico molto utilizzato in Cina, è come un gatto per noi. Nelle zone della Cina, dove si è diffuso, le condizioni igienico sanitarie non sono mantenute ed inoltre c'è una commistione tra l'umano e l'animale, per cui lì c'è stato un salto di specie e il virus dall'animale è riuscito ad infettare l'uomo e ha determinato quindi una pandemia con una mortalità di un numero di soggetti comunque inferiore a 1000. Dopo circa 10 anni, nel 2012, abbiamo di nuovo un'altra pandemia, quella causata dalla MERS, causata sempre da un coronavirus. Anche in questo caso il virus del pipistrello è passato in un'ospite intermedio, in questo caso un dromedario, e dal dromedario è passato all'uomo. Questo perché? Perché evidentemente il virus ha subito delle modifiche a livello del proprio genoma e soprattutto per quelle proteine che vanno a legarsi ai recettori sulle cellule umane e quindi è stato possibile infettare anche l'uomo. Nel 2019 abbiamo avuto appunto il SARS-CoV-2, in questo caso il coronavirus del pipistrello ha infettato un ospite intermedio: si parla del pangolino ma si parla anche di serpenti e rettili. In realtà il pangolino, che inizialmente veniva considerato sicuramente l'animale elettivo come ospite intermedio, ultimamente sembra che non sia più lui e studi genotipici e di analisi di genomi virali, probabilmente riusciranno a svelare quale sarà il reale animale intermedio. Nel caso però della SARS-CoV-2, dobbiamo dire che l'infettività e la contagiosità è risultata molto maggiore rispetto a MERS e SARS e questo perché il virus, che ha una proteina chiamata Spike di superficie, che lega il recettore sulle cellule umane, ha una affinità di legame per il recettore umano molto più elevata rispetto a quella del virus della SARS e del virus della MERS. Da un'analisi filogenetica è stato visto, comparando il genoma del virus SARS-CoV-2 con il coronavirus degli altri virus, del pipistrello e del pangolino, della SARS e della MERS, che l'omologia va diminuendo in questo senso e quindi siamo sicuri che tutti hanno avuto un virus ancestrale; derivano tutti dallo stesso virus, dopo aver subito delle modificazioni e il virus SARS-CoV-2 sicuramente ha una maggiore omologia con quella del pipistrello, col pangolino e soprattutto anche con il virus della SARS, mentre risulta meno simile a quello della MERS.

TRASMISSIONE DEL SARS-CoV-2

Come si trasmette questo virus? Innanzitutto, si trasmette attraverso le vie aeree e i soggetti infettati possono trasmettere il virus attraverso le droplets, le goccioline che vengono immesse quando uno parla o tossisce o, attraverso aerosol, quando le particelle sono ancora più piccole di dimensioni. Può essere trasmesso attraverso mani non lavate ed è per questo che una delle indicazioni maggiori che viene data per la prevenzione è quella di usare le maschere, quella di lavarsi molto spesso le mani e quella di disinfettare le superfici in quanto anche la trasmissione tramite oggetti inanimati, come guanti non cambiati, superficie infette o strumenti che possono essere veicolo di infezione. Un'altra possibilità di trasmissione è quella oro-fecale perché il virus è stato ritrovato anche nelle feci e sembra dare anche infezione a livello del sistema gastro-enterico. Tuttavia, non è stato ancora definito se la trasmissione oro-fecale possa effettivamente avvenire.

Il virus rimane nell'ambiente per diverso tempo, questo virus può resistere sia a diverse temperature, sia per tempi diversi su materiale diverso. Infatti, il titolo virale, cioè la carica di virus presente in un campione sopravvive a lungo, se mantenuta a 4°C; questo però è un elemento che è riproducibile per tutti i virus, tutti i virus persistono molto bene a temperature basse. Mentre a temperatura ambiente sui 20-22 °C, la carica virale comincia a diminuire fino ad arrivare a circa tre giorni e lo stesso avviene per la temperatura a 30°C; sicuramente aumentando la temperatura, il virus diminuisce fino ad inattivarsi e si inattiva completamente alla temperatura di 56°C per 30 minuti – un'ora. Il virus si mantiene anche nell'ambiente e quindi nell'aerosol, con un'emivita, cioè una durata di vita di dimezzamento, per più di due ore e, a seconda della superficie su cui si pone, può persistere più a lungo. Vediamo che sulla plastica può persistere per circa 16 ore e anche sul cartone sopravvive per più di 8 ore, mentre sul rame che è un metallo che viene utilizzato come superficie per evitare l'attacco da parte di microrganismi, il virus persiste per un periodo molto più breve. Noi abbiamo verificato che la luce led blu riesce a inattivare il virus dopo circa 30 minuti - un'ora. Tutti gli studi che vengono fatti su strumenti o mezzi necessari ad inattivare il virus, risultano molto importanti in quanto possono avere un'applicazione anche nella vita giornaliera dove è possibile utilizzarli in ambienti di affollamento, di assembramento e quindi poter in parte disinfettare e sterilizzare gli ambienti prima che ci sia affollamento da parte di persone.

Sul sito dell'Organizzazione Mondiale della Sanità è possibile ritrovare regolarmente l'aggiornamento dei casi di infezione e altre informazioni utili, come il numero dei decessi sia giornalieri che settimanali. Questo sito è ormai conosciuto dalla maggior parte delle persone proprio perché offre un'indicazione immediata, molto precisa della situazione pandemica.

STRUTTURA DEL SARS-CoV-2

Come è fatto questo virus? Come si può vedere al microscopio elettronico questo virus è una particella tondeggianta ricoperta da alcune spicole che assomigliano ad una corona, da qui il nome Coronavirus. Il virus ha una struttura circolare rivestita da uno strato lipoproteico, uno strato di lipidi in cui si inseriscono alcune proteine importanti. La più importante è sicuramente quella nota come Spike, che è necessaria per l'attacco del virus al recettore presente sulla cellula umana, la cellula eucariotica. Ogni spike è costituita da un trimerico, tre molecole associate insieme ed inserite nel doppio strato lipidico, dove ritroviamo anche una proteina, la proteina E e un'altra proteina M, chiamata della matrice, che si trova a cavallo tra l'envelope e la parte interna del virione. All'interno poi troviamo anche tantissime proteine piccole chiamate nucleoproteine che sono associate al genoma virale che è costituito da una elica a singolo filamento di RNA. Queste proteine, proteggono il virus dall'azione di nucleasi, cioè da enzimi che possono degradare il genoma. Il virus si lega al recettore ACE-2, che è un sito per la conversione dell'Angiotensina, ed è un recettore comune alla maggior parte delle cellule umane. Lo troviamo un po' dappertutto, anche nelle cellule dei polmoni, nella parte cioè più interna dell'apparato respiratorio. Questo è il motivo per cui il virus riesce facilmente a raggiungere le sedi profonde

come i polmoni, dove, appunto, la spike si lega al recettore specifico. Dopo essersi legata, la proteina cambia conformazione e questo permette al virus di fondere la sua membrana esterna con la membrana della cellula e favorire così l'ingresso del virus all'interno della cellula. L'anticorpo anti-spike, come quello creato nel laboratorio del professor Rappuoli, va a bloccare il sito specifico di legame tra la spike e l'ACE-2, impedendo così al virus di poter infettare la cellula stessa. Una volta che il virus è entrato all'interno della cellula, viene liberato il suo genoma che produce tutte le proteine virali, sia quelle che vanno a costituire la struttura del virus stesso sia quelle necessarie alla replica del proprio genoma e una volta che le molecole genomiche virali sono state sintetizzate, vanno ad assemblarsi all'interno di queste strutture proteiche virali che portano alla formazione di virioni e che verranno poi liberati dalla cellula. Basti pensare che una semplice particella virale per poter dare origine a migliaia di particelle virali.

QUALI SONO I SINTOMI CHE L'OSPITE UMANO PRESENTA IN SEGUITO ALL'INFEZIONE DA CORONAVIRUS?

I primi sintomi possono essere febbre che è presente ad alta temperatura o meno, per uno o addirittura 6, 7 giorni, mal di testa, tosse, mal di gola Anosmia-ageusia cioè la mancanza di olfatto, di sentire gli odori e la mancanza di sentire i sapori, agesia. Un altro sintomo classico di questa di questa malattia è sicuramente la mialgia e l'anoressia, cioè una grande senso di spossatezza e di debolezza. Se la sintomatologia diventa più grave, è possibile avere anche difficoltà respiratorie, respiro corto e dispnea. In alcuni casi è presente diarrea e vomito. Le complicanze maggiori sono rappresentate dall'ARDS, cioè la sindrome del distress respiratorio acuto, dalla sepsi e dalle infezioni secondarie dovute all'indebolimento del fisico e anche del sistema immuno del soggetto e quindi superinfezioni anche da parte di altri microrganismi.

COME RIESCE IL VIRUS A DIFFONDERSI ALL'INTERNO DELL'ORGANISMO E COME RIESCE A CAUSARE LA MALATTIA?

Abbiamo visto che il virus si lega al recettore ACE-2, e che questo recettore è presente su moltissime cellule che si trovano in tutto l'organismo come le cellule epiteliali, dell'endotelio, del polmone e del sistema intestinale. Il virus, quindi, può legarsi a varie cellule dei vari tessuti e poi infettare il cuore, può arrivare al cervello, al rene, ai polmoni e all'intestino. Nel caso del raggiungimento del cuore, il virus può causare miocardite o disfunzioni cardiache e nel caso del cervello, sintomi neurologici. Anche il fatto di perdere il senso dell'olfatto è dovuto proprio a questa infezione, perché le cellule dell'olfatto raggiungono ovviamente le cellule nervose che corrispondono appunto a questo senso. Il virus può infettare anche l'apparato renale determinando una compromissione del trasporto del sodio. Abbiamo visto che può infettare il polmone e quindi dare la forma più classica della malattia, come la polmonite e la Sindrome acuta da distress. Nell'intestino può determinare compromissione dell'assorbimento.

COVID MODERATO E COVID GRAVE

Prendiamo ora in considerazione la differenza tra quello che succede nel soggetto che presenta la forma lieve, moderata e quella che invece che presenta una forma

grave di Covid. Nel primo caso che cosa succede? Il virus viene inalato, entra nell'organismo e rimane a livello delle vie aeree superiori e talvolta non raggiunge neppure i polmoni. Perché? Perché interviene un sistema immune molto efficace, molto efficiente, che riesce in qualche modo a debellare il virus che viene così eliminato e quindi anche se c'è una risposta immune e una risposta infiammatoria nei confronti del virus, il virus viene comunque eliminato. Nel caso in cui si ha una forma grave, che cosa succede? Il virus riesce a superare il sistema immunitario, il quale è inibito; infatti nei casi infettati da COVID, un indicatore classico è quello della diminuzione dei linfociti. Abbiamo una linfopenia e anche una inibizione dell'Interferone, nonché dell'immunità innata. L'immunità innata è un'immunità che interviene subito, nel primo momento di infezione e, in questo caso, l'interferone rappresenta uno degli elementi più importanti che giocano questo ruolo. Il virus SARS-CoV-2, come anche altri virus, sempre coronavirus, ma anche altri virus respiratori che noi conosciamo, come può essere l'influenza, produce delle proteine che hanno la capacità di inibire e di sopprimere l'immunità innata quindi inibiscono la produzione di interferone, il virus si replica, cresce e si diffonde, arriva ai polmoni e riesce anche a persistere all'interno di questi organi per lungo tempo, dando origine alle forme di nucleazione in cui il virus rimane quasi silente per periodi, fino a che può di nuovo iniziare a replicarsi e a diffondersi di nuovo all'interno dell'organo. In questo caso che cosa succede? Abbiamo un'immunità specifica, mediata dai linfociti T e linfociti B che è molto ridotta, il virus si replica e, a questo punto, vengono prodotte dalle cellule endoteliali e dalle cellule epiteliali delle citochine come il TNF-alpha e l'Interleuchina 6 (IL-6), che richiamano macrofagi, monociti, cellule che a loro volta producono di nuovo altre linfocine e chemochine. Queste linfocine e chemochine determinano una forte infiammazione che è deleteria per l'organismo, per cui se all'inizio abbiamo una fase di replica virale e quindi un danneggiamento dovuto al virus, successivamente il danneggiamento dell'organo è dovuto soprattutto a questa forte infiammazione, quella che si sente nominare come tempesta di citochine, che porta ovviamente anche a ARDS e disfunzione multiorgano. Associata a questo troviamo anche fenomeni di trombosi, si formano dei micro-trombi in circolo che continuano a danneggiare l'endotelio e rappresentano un rischio per il soggetto infettato.

FASI DELLA MALATTIA

Riassumendo le fasi di malattia e quindi di patogenesi, vediamo che nella prima fase (fase precoce) si ha una replicazione virale e il soggetto può essere asintomatico o Paucisintomatico, cioè può presentare pochi sintomi. Il virus può essere rilevato soltanto con un test molecolare, proprio perché il paziente non presenta sintomi particolari e questo succede quando la risposta antivirale è molto efficiente, molto efficace. Se il virus, però riesce a progredire, a moltiplicarsi e a raggiungere gli strati profondi, come l'apparato respiratorio polmonare, nella seconda fase (fase polmonare), il virus oltre a replicare, può causare dispnea e anche, polmonite, che viene riconosciuta anche da radiografia, tomografia computerizzata, caratterizzata in particolare da una opacità polmonare, chiamata Brown Glass, che i radiologi riescono a riconoscere molto bene come elemento di infezione da

parte del virus classico SARS-CoV-2. Se poi la situazione peggiora ulteriormente, nella terza fase (fase iper-infiammatoria), oltre alla polmonite ci può essere anche la disfunzione di organo, la tempesta citochinica, che già abbiamo definito, e soprattutto un aumento della risposta infiammatoria concomitante a una diminuzione rilevante della risposta immune.

APPROCCI DIAGNOSTICI

Per aver una diagnosi di infezione della SARS-CoV-2, diversi sono stati gli approcci diagnostici, ci sono quelli che si basano sull'analisi di laboratorio e quelli che si basano sull'Imaging che è risultata molto utile dal punto di vista diagnostico per la conferma di certe diagnosi. Tra quelle dell'analisi di laboratorio, troviamo la forma classica di isolamento virale, troviamo quella di utilizzo della microscopia elettronica, di sistemi immunoenzimatici ma soprattutto di sistemi di test molecolari. La diagnosi di laboratorio dell'infezione da SARS-CoV-2 si può basare sulla ricerca diretta del virus attraverso l'indagine del genoma virale, o meglio di frammenti genici del virus, attraverso la ricerca di antigeni virali, ovvero di proteine virali che poi si trovano in circolo oppure in maniera indiretta, attraverso la ricerca di anticorpi specifici anti SARS-CoV-2. Di solito il periodo di incubazione dura da una settimana a due giorni prima della presenza dei sintomi. Durante questo periodo e anche nella prima settimana della presentazione dei sintomi, il soggetto riesce ad eliminare alte quantità di virus ed è possibile rilevare il virus attraverso test molecolari. Di solito si utilizza una Real time PCR, un test molecolare basato sulla reazione a catena della polimerasi e, successivamente, dopo 7-10 giorni dall'infezione o meglio dalla comparsa dei primi sintomi, compaiono anche gli anticorpi specifici che sono le IgM e le IgG. Le IgM sono quella classe di anticorpi che vengono prodotti precocemente, all'inizio dell'infezione. Le IgG sono quelle che dovrebbero essere prodotte dopo qualche giorno, per durare a lungo. In realtà abbiamo visto che nel caso dell'infezione SARS-CoV-2 la presenza di IgM e di IgG è quasi concomitante, in alcuni casi si vede addirittura che le IgM compaiono dopo le IgG. Questa è veramente una peculiarità di questo virus, tanto è vero che la sierologia in questo caso serve soltanto a supporto di diagnosi come nel caso in cui un soggetto clinicamente dimostri la malattia ma il tampone naso-faringeo, che viene utilizzato per il test molecolare, abbia dato esito negativo. Il virus può essere riconosciuto e rivelato con i test molecolari in diversi campioni come quello naso-faringeo, quello del tratto respiratorio come il bronco- aspirato o il lavaggio bronco-alveolare ed anche nelle feci anche se la presenza del virus nelle feci è possibile non in tutti i soggetti. Dai dati della letteratura, risulta che in alcuni soggetti è stata trovata l'eliminazione del virus nelle feci ad alta carica e per lungo tempo, in altri, invece, non è stata trovata, per cui c'è da dire che, seppur in letteratura siano usciti tantissimi lavori su SARS-CoV-2, molti hanno dati contrastanti, cioè non riportano gli stessi dati pertanto risulta talvolta problematico capire effettivamente dove sia la ragione e quale sia il risultato reale. Per quanto riguarda il test molecolare, il test viene eseguito su campioni biologici che subiscono una estrazione degli acidi nucleici. Dopodiché, il genoma estratto, cioè gli acidi nucleici estratti vengono sottoposti a diversi cicli di amplificazione. Questo fa sì che se nel campione è presente un piccolo frammento

genomico virale, questo può subire un'amplificazione esponenziale ed essere facilmente visualizzato tramite l'uso di sonde specifiche attraverso strumenti termociclatori che permettono di evidenziare questo incremento del genoma target, del genoma virale. Importante sottolineare che molto spesso, nei referti, si può trovare positivo o positivo anche a bassa carica. Molti chiedono, che cosa significa? Significa che, in laboratorio, il campione che è stato amplificato, viene amplificato soltanto dopo tantissimi cicli di amplificazione. Di solito l'amplificazione dura 40, 45 cicli. Se l'amplificazione, cioè la crescita esponenziale inizia ad un numero basso di cicli, per esempio a 21 cicli, possiamo dire che il campione è positivo ad alta carica; quindi, attraverso questo sistema di analisi è possibile definire se un campione è positivo a bassa o ad alta carica. Purtroppo, al momento, non sono disponibili dei test quantitativi che permettono di poter definire la quantità assoluta delle copie genomiche virali. Accanto al test molecolare esiste anche il test rapido dell'antigene e in questo caso si va a ricercare una proteina virale. Il test viene eseguito utilizzando sempre un tampone naso-faringeo, che viene stemperato in una soluzione di lisi, dopodiché alcune gocce di questo campione vengono poste su uno stick, a cui si aggiungono delle gocce di tampone. Si tratta di immunocromatografia a flusso laterale e il risultato è che possono apparire due bande, una che corrisponde al controllo positivo e questo deve essere sempre presente perché ci permette di capire se il test è stato eseguito correttamente. Una seconda banda è quella corrispondente al campione che è stato inserito e, quando questa appare, significa che il campione è positivo, altrimenti è negativo. Un vantaggio di questo test rispetto a quello molecolare, è che il tempo di esecuzione è estremamente rapido. Nel test molecolare si va da un'ora per i test estremamente rapidi, a circa tre ore, tre ore e mezzo, per quelli classici. Nel caso della lettura rapida dell'antigene si ha dopo 20-30 min, è ovvio che in questo ultimo caso la sensibilità è molto inferiore, cioè abbiamo una sensibilità che è dell'ordine del 40%, al di sotto sicuramente del 50%. Un altro test è il test sierologico rapido. Anche questo si basa su un sistema di immunocromatografia, per cui la goccia di sangue viene posta sullo stick, ci si aggiungono delle gocce di tampone e si aspetta quei 15 minuti per la comparsa delle bande. In questo caso possono apparire due bande che rappresentano le IgG e le IgM che indicano la positività degli anticorpi. Questo test rapido ovviamente non è così preciso e affidabile come il test sierologico che viene fatto su strumentazione dedicata e in laboratori specializzati, ha il vantaggio tuttavia di essere piuttosto rapido e pratico da fare perché in 15 minuti è possibile avere la lettura del test. Quindi come abbiamo visto, molto abbiamo imparato durante quest'anno del virus SARS-CoV-2, abbiamo imparato ad utilizzare delle metodologie adeguate e in meno di un anno sono stati ottenuti e creati dei vaccini che sono utili per la prevenzione della malattia. Molto si è visto anche dal punto di vista terapeutico, l'uso dei monoclonali per poter inibire l'infezione di altre cellule da parte del virus. Tuttavia, molto ancora dobbiamo imparare su questo virus, molti sono i lati oscuri del virus, ancora da conoscere, e sono sicura che soprattutto la collaborazione e l'interdisciplinarietà saranno molto utili per poter fare passi da gigante per debellare anche questo virus. Grazie.