

SARS-CoV-2: un *cold case* riaperto da un indizio di laboratorio

Sebastiano Bruno Solerte

Centro Diagnostico Italiano – CDI (Milano) e ASST-Pavia,
Cattedra di Geriatria, Università degli Studi di Pavia

E' ancora troppo recente il doloroso ricordo della pandemia COVID-19 da Betacoronavirus SARS-CoV-2 (Fig.1) che ha interessato il nostro Paese e il mondo intero, causando centinaia di milioni di morti e di infetti in un periodo estremamente breve.

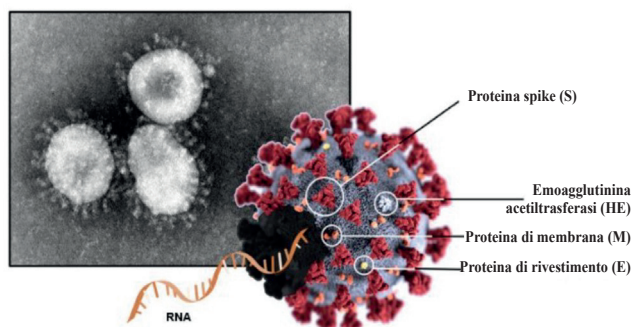


Figura 1
Struttura tridimensionale di SARS-CoV-2

Ma ancora oggi, nonostante le rituali rassicurazioni degli organi sanitari di sorveglianza, si muore di COVID-19, mentre *long COVID* e *post COVID* costituiscono un problema sanitario di rilievo, non ancora adeguatamente definito per essere avviato a precisi protocolli di cura. E che dire ancora degli effetti negativi che spesso vengono descritti nella popolazione vaccinata e che puntualmente si registrano nei dati anamnestici di molte patologie, che si sono sviluppate in conseguenza della prima vaccinazione o della dose *booster* di richiamo. Una problematica di fronte alla quale il nostro sistema immunitario si è presentato assolutamente impreparato, specie nei confronti di sollecitazioni inattese e ravvicinate nel tempo.

Come si vede il problema ha avuto e ha ancora gravi conseguenze di ordine epidemiologico e clinico, che però non si erano viste nelle precedenti infezioni da Coronavirus SARS-CoV e MERS-CoV riscontrate nei venti anni precedenti.

Questo è il primo dato che dobbiamo considerare nella nostra analisi, chiedendoci il perché di questo diverso comportamento di un virus, che di fatto non avrebbe dovuto dare problemi.

Nelle prime fasi della pandemia COVID-19 era emersa, da più parti, la falsa informazione che i Coronavirus fossero una novità del ventesimo secolo, che la loro storia fosse geneticamente recente e che questo potesse in qualche modo spiegare la profonda impreparazione delle sanità di tutto il mondo, fatto che aveva consentito lo sviluppo e la progressione delle infezioni COVID, portandoci in pochi anni alla degenerazione pandemica del 2019/2020 e

2020/2021, impreparazione attribuita impropriamente alla novità. Non è così, in quanto il Coronavirus era già noto da almeno mezzo secolo, in quanto presente nelle super infezioni ospedaliere come conseguenza di gravi malattie autoimmuni e neoplastiche, sia all'esordio clinico sia dopo i trattamenti antitumorali associati a gravi immunodeficienze. Inoltre dal punto di vista nosologico il Coronavirus era già stato descritto nei trattati di Patologia Generale e di Microbiologia dei primi anni '70 (cfr Dianzani, ed. UTET) come agente patogeno correlato a gravi e quasi sempre mortali patologie polmonari, appunto sindromi acute da severo *distress* respiratorio.

Questo è il secondo dato da tenere presente, il Coronavirus albergava già cinquant'anni e più fa nelle corsie degli ospedali, senza che però si diffondesse in modo pandemico nella popolazione. In sostanza un virus saprofita perfettamente tollerato dal sistema immunitario del soggetto ospite sano in caso di trasmissione dal soggetto malato. In sostanza un Coronavirus che non diffonde pandemicamente.

Ma ritornando ad oggi, già nei primi momenti della pandemia COVID-19 eravamo stati colpiti dalla estrema virulenza di SARS-CoV-2, che si era diffuso in maniera rapida, aggressiva e letale, in un momento in cui non c'erano cure e nemmeno presidi di difesa e di protezione individuale. A ricordo di questo scorrono ancora davanti ai nostri occhi le immagini tremende della Val Seriana, dei camion militari che trasportavano centinaia di bare. Questo avveniva mentre fatti drammatici si verificavano anche nella nostra struttura ospedaliera. In pochi giorni l'intero ospedale era stato chiuso all'esterno e centinaia di malati erano stati isolati in reparti di emergenza o trasferiti in unità di terapia intensiva, con una mortalità che in alcune settimane aveva raggiunto il 30% e che aveva interessato anche il personale sanitario dei nostri reparti. Un fatto mai visto prima e che ci aveva subito sollecitato, insieme ad altri colleghi di strutture sanitarie del Nord Italia, a cercare una qualche cura per attenuare l'infezione e ridurre se il caso la mortalità. Ed è in questo contesto che già a metà marzo del 2020 avevamo messo sotto osservazione continua tutti i motori di ricerca delle pubblicazioni scientifiche che venivano di giorno in giorno editate su COVID-19. Queste, attentamente analizzate, erano state utilizzate per ideare un originale protocollo terapeutico di emergenza, impiegando un inibitore DPP4 (Sitagliptin), abitualmente prescritto nella cura del diabete. Trattando con Sitagliptin i pazienti COVID-19 ricoverati in unità intensiva, erano stati di fatto dimezzati tempi di degenza e mortalità, rispetto ai

pazienti non trattati.

Quindi, tra marzo e settembre 2020, prima della seconda grave ondata di COVID-19, eravamo quotidianamente concentrati sui motori di ricerca scientifici per seguire passo dopo passo l'evoluzione della malattia, anche in relazione ai risultati da noi ottenuti con Sitagliptin e citati da molti lavori che nel frattempo venivano pubblicati sulle più prestigiose riviste. Nel contempo, come detto, ci siamo trovati di fronte alla seconda ondata di pandemia, iniziata a settembre (primo rilevamento il 20 settembre 2020) sulla spinta della variante alfa inglese VOC 202012/01 *lineage* B.1.1.7, definita per la presenza di mutazioni nella proteina *spike* S e del dominio di legame recettoriale RBD che la rendeva più aggressiva, contagiosa e letale della forma originaria. La più importante mutazione evidenziata era la N501Y della proteina S, dimostrata successivamente anche sulla variante beta sudafricana (del maggio 2020), gamma brasiliana (del gennaio 2021) e sulla omicron (del dicembre 2021). Pertanto la mutazione N501Y era stata trascinata all'interno di nuovi ceppi virali mutati, tanto da rendere il COVID-19 più trasmissibile e aggressivo. In sostanza, come definita in alcuni studi, una pandemia nella pandemia, che come un sasso nello stagno si sviluppava ad ondate successive di varianti, con diverso grado di aggressività clinica.

Per brevità dobbiamo dire che questa eccessiva capacità mutante della SARS-CoV-2 non era stata evidenziata nelle precedenti infezioni da SARS-CoV e da MERS-CoV e che la domanda che ci si poneva spontaneamente era come mai tutto questo poteva essere successo, trattandosi di linee genetiche virali di Betacoronavirus pressoché simili e così ravvicinate nel tempo (2003-2019). Ma come spesso si dice è probabile che sia vero il detto che il diavolo fa le pentole senza i coperchi e questo detto è calzato proprio a pennello con la sorprendente scoperta che abbiamo fatto, ancora una volta sui motori di ricerca scientifici, quando nel settembre 2020 ci siamo imbattuti in una prestigiosa pubblicazione della rivista *Science*, dedicata ai test di prova dei vaccini anti SARS-CoV-2, utilizzando ceppi di topi BALB/c, inizialmente resistenti all'infezione.

Già dalla lettura del riassunto, in capo all'articolo, non credevamo ai nostri occhi e ricordo ancora quel pomeriggio di rabbia e smarrimento che è continuato leggendo e rileggendo fino a tarda serata l'intero articolo. Bisognava essere certi di quello che si andava delineando e degli effetti mediatici di questa scoperta.

La sostanza era che la manipolazione di laboratorio di questi topi, condotta dal cinese Gu, direttore del laboratorio (patogeni e biosicurezza) dell'Istituto di Microbiologia ed Epidemiologia dell'Accademia Militare di Scienze Mediche di Pechino, aveva portato ad una grave infezione da coronavirus topi che erano geneticamente resistenti alla SARS-CoV-2. Ma come era stato ottenuto tutto questo e quale il detonatore che aveva reso possibile l'infezione?

Nel primo caso erano stati effettuati più passaggi seriali del virus SARS-CoV-2 all'interno del tratto respiratorio, al sesto passaggio del ceppo MASCP6 l'infettività polmonare aveva determinato una grave polmonite interstiziale, prima sconosciuta nel topo BALB/c. Il topo prima resistente si ammalava e moriva. Ma il fatto più sconcertante era che l'incremento della virulenza si era reso possibile in virtù di una mutazione localizzata nella RBD della proteina *spike*: la mutazione N501Y, quella stessa evidenziata di seguito nelle varianti pandemiche presenti dalla primavera 2020 all'inverno 2021/2022 e soprattutto nella variante alfa inglese (Fig.2)

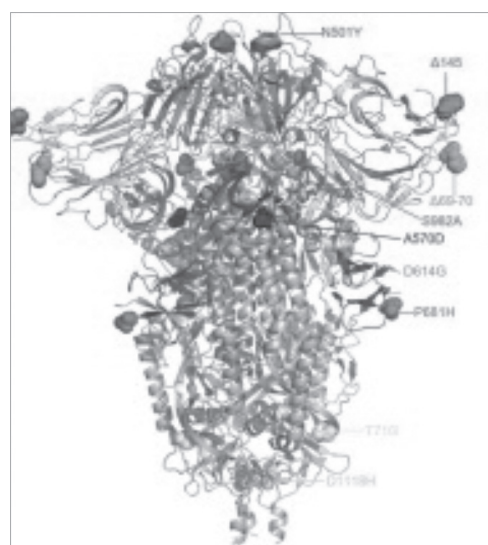


Figura 2

Rappresentazione grafica della mutazione N501Y dell'RBD di SARS-CoV-2.

Per comprendere meglio la questione dobbiamo fare un passo indietro e soffermarci sull'andamento cronologico del lavoro di Gu. La pubblicazione viene inviata dal primo autore a *Science* il 29 Aprile 2020. Dalla lettura dello studio si evince che i dati siano stati sviluppati nei mesi precedenti, forse anche a partire dalla prima parte del 2019. La mutazione N501Y compare già da Maggio 2020 nell'uomo e in particolare dalla comparsa della variante inglese nel Settembre 2020.

Questo è il terzo dato fondamentale da considerare, forse il più rilevante e decisivo per far ritenere che il COVID-19 abbia avuto origine in laboratorio e nello specifico in un laboratorio militare di Pechino. Dalla cronologia risulta chiaro che la variante inglese, definita dal sequenziamento virale come mutazione N501Y, è antecedente di almeno un anno nell'esperimento di Gu, sul topo BALB/c, rispetto alla diffusione della variante inglese nella popolazione mondiale. In sostanza, N501Y è stata generata biologicamente nel laboratorio di Gu attraverso la manipolazione dei topi BALB/c, super infettati da passaggi

consecutivi di SARS-CoV-2 al livello nasale del tratto respiratorio, con il preciso scopo di generare un vaccino RBD ricombinante anti SARS-CoV-2. Tutto questo molto prima della sua diffusione pandemica nell'uomo. Da questo, e dall'analisi attenta del disegno dello studio di Gu, si può desumere che i ricercatori cinesi avessero già da tempo una consuetudine metodologica a sviluppare esperimenti di manipolazione biotecnologica su Betacoronavirus, anche precedentemente a COVID-19, come nel caso della SARS-CoV e della MERS-CoV. La ricerca sui vaccini di nuova concezione era quindi già in corso da anni.

Ma resta inoppugnabile il fatto che la variante N501Y pechinese sul topo e poi N501Y inglese sull'uomo coincide e si palesa, in quest'ultimo, in maniera pandemica e mortale nello spazio di un anno. Dal laboratorio all'uomo, veicolata dal topo BALB/c, e con quale modalità? E' suggestivo pensare che alcuni ricercatori possano essere maldestramente venuti a contatto con questa variante e che si siano successivamente ammalati, diffondendo il virus al di fuori del laboratorio in direzione di Wuhan. Sì, proprio Wuhan, dove dal 18 al 27 Ottobre 2019 si sono svolti i VII giochi mondiali militari e dove la potente Cina ha totalizzato, prima nella classifica, 239 medaglie di cui 133 d'oro. A Wuhan erano dunque presenti atleti militari di tutto il mondo, sicuramente anche delle istituzioni di ricerca militari di Pechino. La prima segnalazione, attribuibile al nuovo virus, è del dicembre 2019 e aveva per prima coinvolto una signora thailandese atterrata a Bangkok con la sua famiglia, con un volo proveniente da Wuhan e risultata poi infetta da n-CoV-2019. Wuhan è stato dunque l'epicentro della diffusione del virus nel mondo, generatosi non dal mercato del pesce ma dall'assembramento di persone in occasione dei giochi mondiali militari di poche settimane prima. D'altra parte, ad oggi non è stato ancora identificato l'animale responsabile del salto di specie dal pipistrello all'uomo e anche le numerose ispezioni effettuate dall'OMS a Wuhan non hanno sortito alcun risultato. Probabilmente si è cercato nella città sbagliata, quella giusta era a 1165 km di distanza: Pechino.

Tutto sembra coincidere, l'esperimento sul topo BALB/c, la generazione della variante N501Y, la incontrollata e mortale diffusione pandemica della SARS-CoV-2, la mancata identificazione dell'animale oggetto del salto di specie e infine la comparsa precoce dei vaccini, fatto definito sensazionale e ai limiti del miracoloso, ma adesso più chiaro: sui vaccini si stava già lavorando molto prima dell'epidemia di COVID-19.

In maniera parzialmente assolutoria, potremmo infine considerare una ulteriore ipotesi. COVID-19 si sarebbe, almeno all'inizio, comportata come una banale infezione circoscritta a piccole comunità di soggetti e che probabilmente avrebbe avuto un comportamento simile a SARS-CoV e MERS-CoV. Malauguratamente, invece, la sovrapposizione ad essa di varianti SARS-CoV-2 provenienti da esperimenti di laboratorio (destinati alla produzione di

vaccini) e già presenti nello stesso 2019 in Cina e in altri paesi, ha amplificato la virulenza e la diffusione letale del virus, rendendola incontrollata anche per l'estrema immuno-patogenicità d'organo (specie polmonare) e sistemica nel tempo (*long COVID* e *post COVID*). Una omertosa superficialità, costata molto cara, destinata forse a durare nel tempo e a condizionare la geopolitica dell'intero pianeta.

Il nostro *cold case* è forse vicino alla soluzione. Gli indizi raccolti, che in genere si dice non costituiscano una prova, nel nostro caso sembrerebbero smentire il detto. La prova certa si nasconderebbe in due piccoli aminoacidi, alanina e treonina, passati inosservati nel ginepraio dei dati scientifici, ma pericolosamente contenuti nella variante N501Y della SARS-CoV-2.

Questa è cronaca, o forse, e speriamo che sia così, già storia.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. **Gu H, Chen Q, Yang G et al.** Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science* 369: 1603-1607, 2020.
2. **Vabret N, Britton CJ, Gruber C et al.** Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity* 52: 910-941, 2020.
3. **Starr TN, Greamej AJ, Hilton SK et al.** Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints of folding and ACE-2 binding. *Cell* 182:1295-1310, 2020.
4. **Harvey VT, Carabelli AM, Jackson B et al.** SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 19:409-424, 2021.
5. **Bohem E, Kronig I, Neher RA et al.** Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemic within the pandemic. *Clin Microbiol Infect* 27:1109-1117, 2021.
6. **Liu Y, Liu J, Plante KS et al.** The N501Y substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature* 602:294-299, 2022.
7. **Solerte SB, Di Sabatino A, Galli M, Fiorina P.** Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibition in COVID-19. *Acta Diabetol* 57:779-783, 2020.
8. **Solerte SB, D'Addio F, Trevisan R. et al.** Sitagliptin treatment at the time of hospitalization was associated with reduced mortality in patients with type 2 diabetes and COVID-19: a multi-center, case-control, retrospective, observational study. *Diabetes Care* 43: 2999-3006, 2020.
9. **Wang L, Mohlenberg M, Wang P, Zhou H.** Immune evasion of neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 Omicron. *Cytokine Growth Factor Rev*

Per corrispondenza:

Prof. Sebastiano Bruno Solerte
ASST Pavia
Via Viale Repubblica 34,
27100 - Pavia
Tel.: 335 7116256
e-mail: bruno.solerte@unipv.it