Covid-19: ancora sulle oscure origini del virus

PREMESSA

Nel febbraio 2020 la stampa mainstream e le principali società scientifiche rigettarono con decisione l'ipotesi di origine artificiale del virus Sars Cov2, in quanto non supportata da serie evidenze scientifiche.
Veniva scientificamente confutata ogni possibilità che il virus fosse stato ingegnerizzato e chi parlava di questa ipotesi (compreso lo stesso nobel Luc Montagnier) veniva sottoposto alla gogna mediatica, colpito attraverso la sua carriera se un universitario.
Fra le voci più critiche la testata web "Open online".
Se da una parte si è esagerato con la millantata sicurezza di un'origine artificiale, per manipolazioni di laboratorio tipo il "gain of function" praticato dallo scienziato Ralph Barich e la stessa virologa cinese Shi Zhengli, dall'altra si è schierata la maggior parte del mondo scientifico, molti per eccesso di fiducia sulle affermazioni del corpo scientifico cinese, alcuni per la carenza di stringenti dimostrazioni scientifiche sull'incidente di laboratorio.
Ricordiamo la sentenza del dr.Burioni: "*È l'ultima scemenza che (la pandemia) provenga da un laboratorio"*.
La tesi su una manipolazione del virus e la fuoriuscita accidentale dal laboratorio di Wuhan è argomento di un libro ***"La chimera che ha cambiato il mondo"***, scritto da Joseph Tritto e pubblicato in Italia dall'editore Cantagalli.
Nel libro si cita uno dei massimi esperti di ingegnerizzazione virale, il ricercatore che ha insegnato ai cinesi le tecniche usate a Wuhan per modificare il genoma virale e che proprio nel 2015 contribuì alla realizzazione del virus di cui accennò TG Leonardo, il Prof. Ralph Baric, colui che nel 2002 aveva messo a punto la tecnica denominata "gain of function".
Il Prof. Ralph Baric in una intervista recente a "Presa diretta" nel 14 settembre 2020 ha tranquillamente affermato che un virus modificato con tecniche di ingegneria genetica è irriconoscibile rispetto al tipo selvatico,smentendo tutti gli articoli precedenti che avevano "dimostrato" definitivamente l'origine naturale del Sars Cov2.
Ovviamente oltre questa affermazione non è andato.
Il "gain of function", il cui fine potrebbe essere quello di creare vaccini, attualmente è vietata sui virus influenzali, ma, per assenza di decisioni da parte della comunità scientifica è permessa sui coronavirus.
Lo stesso Baric aveva poi collaborato con la dottoressa Shi Zhengli per realizzare un virus chimera, lavoro documentato da uno studio pubblicato su Nature.
Il 14 maggio 2021, su Science è comparsa una lettera firmata da 17 nomi di rilievo della ricerca tra cui, fatto importantissimo, spicca lo stesso Ralph Baric, con la quale si chiede l'apertura di una vera indagine sulla possibile origine artificiale del virus.
La lettera è pubblicata alla fine di questo articolo.
La lettera "casualmente" viene pubblicata nell'imminenza del Global Health Summit tenutosi a Roma il 22 maggio, e della World Health Assembly (dal 24 maggio al 1 giugno), eventi preceduti anche da un preoccupante comunicato redatto per la UE in occasione del convegno di Roma da parte di un comitato di 20 esperti che affermano che "il mondo sta probabilmente entrando in un'era di pandemie".
Molti notisti scientifici sottolineano come un tale allarme è legato alla premessa che il Sars-Cov2 sia un virus di origine naturale, mentre l'ipotesi che esso sia il frutto di un processo di ingegnerizzazione farebbe cadere l'allarme dei 20 scienziati.
Di conseguenza verrebbe ridimensionata l'ipotesi di un futuro di epidemie senza fine e delle relative emergenze continue, a costo di aprire un processo non solo alle autorità cinesi con conseguente terremoto politico-finanziario legato ai risarcimenti ma alla stessa posizione scientifica ed

internazionale della WHO legata ai laboratori di Wuhan e responsabile della fallimentare gestione dell'intera vicenda Covid a partire dai mancati controlli dei laboratori cinesi e dai protocolli diffusi fin dall'inizio dell'emergenza, esempio tipico in Italia la diffusione della circolare n.15280 del 2 maggio 2020 del Ministero della salute che affermava:
"Per l'intero periodo della fase emergenziale non si dovrebbe procedere all'esecuzione di autopsie o riscontri diagnostici nei casi conclamati di COVID-19, sia se deceduti in corso di ricovero presso un reparto ospedaliero sia se deceduti presso il proprio domicilio".
Sappiamo quanto fossero invece necessarie quelle autopsie e quante vittime sono dovute al non averle eseguite.

IL MIO MODESTO PARERE

Prima di esprimere una qualsiasi asserzione su questo oramai inutile dibattito (io sono in accordo con le affermazioni del prof. Andrea Crisanti) consiglio a tutti di leggere il libro di David Quammen **"Spillover" -** I pubblicazione 2012 – Adelphi.
Si rende evidente che il progressivo avanzare della società agricolo industriale umana crea continue occasioni di "salto di specie" da parte di microorganismi, soprattutto virus, da specie animali e ambienti naturali minacciati di estinzione.
E' avvincente anche la spiegazione del perchè nello spillover troviamo quasi sempre come specie-serbatoio i pipistrelli.
Pochi sanno che rappresentano il 20% dei mammiferi della terra e che vivono in comunità numerose (anche decine di migliaia di individui) che favoriscono la diffusione dei virus. Basta metterli in contatto sempre più stringente con i nostri animali da allevamento o con la medesima comunità umana (come stiamo facendo tramite la distruzione dell'ambiente naturale) e il gioco è fatto.
Veniamo alla attuale pandemia provocata da SARS-CoV2.
Secondo la ricostruzione storica oramai accertata ed accettata, il ceppo iniziale di coronavirus responsabile della pandemia di Covid-19 avrebbe fatto la sua comparsa in Cina già nel 2012, quando sei persone svilupparono una polmonite anomala dopo essere state mandate a ripulire una miniera di rame abbandonata nello Yunnan, l'estremo sud della Cina, piena di guano e pipistrelli, e terreno fertile per la nascita di micro-organismi e agenti patogeni possibilmente letali.
A quanto pare, l'evento costituì la tesi di dottorato di due giovani ricercatori cinesi.
Tre dei sei operai che avevano visitato la miniera morirono in seguito al ricovero in ospedale, dopo avere sviluppato sintomi non riconducibili ad altre patologie note. Il loro caso apparve inspiegabile e sottoposto allo pneumologo Zhong Nanshan, (già distinto per la gestione dell'epidemia di Sars nel 2003) che sarebbe tornato alla ribalta a inizio 2020, a capo della squadra di scienziati del governo cinese che aveva il compito di gestire la nuova epidemia.
I tre pazienti rimasti in vita furono sottoposti a un test degli anticorpi: dall'esame emerse che nessuno di loro aveva contratto la Sars, ma tutti e quattro avevano contratto un nuovo tipo di coronavirus simile a quello che provocava la sindrome respiratoria acuta grave.
Stando a questi fatti il virus aveva già dimostrato evidenti capacità di "salto di specie".
Mancava solo l'occasione giusta o se vogliamo dirla in termini più scientifici la "variante genetica" capace di trasmissione interumana. Dal 2012 al 2019 gli sviluppi sono stati molteplici ed oscuri perchè nessuno se ne è preoccupato.
Il ceppo patogeno identificato a Wuhan potrebbe essere entrato in circolazione tramite qualche "specie di amplificazione" non identificata come lo zibetto o altro, oppure può anche essere fuoriuscito accidentalmente dal laboratorio di liv. 4 dell'Istituto virologico di Wuhan forse per aver infettato qualche operatore del centro come aveva fatto con gli operai nello Yunnan: la realtà non cambia perchè l'evento centrale della pandemia, ossia il salto di specie è iniziato "naturalmente" nel 2012, come già successo innumerevoli volte e come sta diventando sempre

più frequente a causa della aggressione incontrollata che la specie umana esercite sull'ambiente.
Per completare questa storia, il caso attirò l'attenzione di un gruppo di scienziati, che muniti di tute e occhiali protettivi e di respiratori, entrarono nella miniera pochi mesi dopo, ad agosto 2012, e raccolsero centinaia di campioni per la ricerca. Tra loro c'era anche Shi Zhengli, la scienziata dei pipistrelli, che aveva iniziato le sue ricerche su questi animali e sui virus a loro collegati nel 2004, diventandone la massima esperta nel Paese asiatico.
Le prime scoperte indicavano la compresenza di più coronavirus all'interno della miniera, come emerso da uno studio del 2016 a cui partecipò la stessa Shi Zhengli.
Uno di questi era un "nuovo ceppo" di Sars che venne denominato inizialmente RaBtCov/4991, riscontrato in un particolare tipo di pipistrelli.
Nel frattempo gli scienziati dell'Ambasciata Usa in Cina che avevano visitato nel 2018 il laboratorio di Shi Zhengli, avevano espresso dubbi sull'effettiva sicurezza della struttura, come emerso da cablogrammi diplomatici citati dal Washington Post nel 2019.
Quando si diffuse la notizia dei primi pazienti affetti da polmonite anomala, il 30 dicembre 2019, la scienziata affermò che non c'erano riscontri di similitudine con i virus studiati in laboratorio, tesi che sostenne piu' volte pubblicamente.
In un suo studio del 3 febbraio 2020, pubblicato da Nature, Shi citò i pipistrelli come probabile origine del nuovo coronavirus, rivelando che il suo laboratorio disponeva di un virus con un livello di somiglianza a quello del Covid-19 pari al 96,2%. Il virus a disposizione nel laboratorio, nominato RaTG13, forniva quindi la prova più vicina all'origine del coronavirus responsabile dell'ondata di polmoniti anomale.
Altri studi e conferme ricevute dallo stesso Sunday Times rivelano che quel virus sarebbe stato lo stesso RaBtCov/4991 scoperto nella miniera abbandonata dello Yunnan nel 2012.
Nonostante le smentite del laboratorio di Wuhan di avere avuto un ruolo nella diffusione del coronavirus, i dubbi sull'origine del Covid-19 non sono stati risolti: il Wuhan Institute of Virology, WIV, è stato al centro di forti polemiche a livello internazionale che puntavano il dito contro la Cina, accusandola di opacità nella gestione dell'epidemia.
IN CONCLUSIONE
Perchè Anthony Fauci e molti altri scienziati riesumano la tesi di un virus modificato e sfuggito ai controlli di un laboratorio di contenimento di livello 4?
Pare che vi sia il convincimento politico che parlare di questa malattia in termine di pandemia naturale che può ripetersi in occasione di altri spillover faccia molta più paura di un evento accidentale, dovuto ad un errore umano
Il lock-down è stato duro ed economicamente catastrofico per molta gente e, se l'errore umano può essere gestito ed evitato in futuro con una attenzione tecnico-scientifica adeguata, si può dormire tranquilli nel convincimento che la catastrofe non succederà più.
Al contrario si vivrebbe nella paura del ripetersi di quello che abbiamo passato dal 2019 ad oggi e la gente non aspetta altro per riprendere il comportamento economico-consumistico precedente. Molti sono i politici che, pur di guadagnare consenso, assecondano questi atteggiamenti additando come menagrami e iettatori tutti coloro che insistono in una seria revisione del comportamento economico e consumistico attuale.

LE CAUSE DELLE PERPLESSITÀ MONDIALI SULLE ORIGINI DEL SARS COV2

Una sfiducia fondata.
Il governo cinese non è immune da critiche, ed è colpa della sua opacità se il mondo intero si è trovato impreparato davanti all’emergenza.
Pechino non è stata trasparente, nemmeno con i propri cittadini, e ha arrestato coloro che volevano denunciare pubblicamente il pericolo che si stava correndo.
Ricordiamo che uno degli arrestati fu il medico cinese Li Wenliang, successivamente liberato e

celebrato come un eroe – anche dalla propaganda cinese – dopo la sua morte causata proprio dalla Covid-19.
Non solo. Se la Cina viene accusata di aver causato accidentalmente la fuga del virus da un laboratorio, Pechino accusa gli Stati Uniti di averlo diffuso durante un evento militare del 2019 in territorio cinese.
Oramai è un circolo vizioso da quale non se ne uscirà fuori, un argomento, come diciamo noi meridionali, buono solo per "pigliarsi a pesci in faccia".
Qui di seguito il documento firmato da 18 scienziati e pubblicato si SCIENCE il 14 maggio 2021 sui dubbi irrisolti sulle origine di SARS CoV2.
(sono stati omessi i rif. bibliografici non pervenuti allo scrivente).

INVESTIGATE THE ORIGINS OF COVID-19

Science 14 May 2021:
Vol. 372, Issue 6543, pp. 694
DOI: 10.1126/science.abj0016

Jesse D. Bloom 1,2, - Yujia Alina Chan 3, - Ralph S. Baric 4, - Pamela J. Bjorkman 5, - Sarah Cobey 6, - Benjamin E. Deverman 3, - David N. Fisman 7, - Ravindra Gupta 8, - Akiko Iwasaki 9,2, - Marc Lipsitch 10, – Ruslan Medzhitov 9,2, - Richard A. Neher 11, - Rasmus Nielsen 12, - Nick Patterson 13, - Tim Stearns 14, - Erik van Nimwegen 11, - Michael Worobey 15, - David A. Relman 16,17,*

1. *Basic Sciences and Computational Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 98109, USA.*
2. *Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD 20815, USA.*
3. *Stanley Center for Psychiatric Research, Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA 02142, USA.*
4. *Department of Epidemiology and Department of Microbiology & Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA.*
5. *Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125, USA.*
6. *Department of Ecology and Evolution, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA.*
7. *Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, ON M5S 1A8, Canada.*
8. *Cambridge Institute of Therapeutic Immunology & Infectious Disease, Cambridge, UK.*
9. *Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06519, USA.*
10. *Department of Immunology and Infectious Diseases and Center for Communicable Disease Dynamics, Department of Epidemiology, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA.*
11. *Biozentrum, University of Basel and Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, Switzerland.*
12. *Department of Integrative Biology and Department of Statistics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA.*
13. *Department of Human Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA.*
14. *Department of Biology and Department of Genetics, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.*
15. *Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA.*
16. *Department of Medicine and Department of Microbiology & Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA.*
17. *Center for International Security and Cooperation, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.*

* Corresponding author. Email: relman@stanford.edu

Il 30 dicembre 2019, il Programma per il monitoraggio delle malattie emergenti ha notificato al mondo una polmonite di causa sconosciuta a Wuhan, in Cina .
Da allora, gli scienziati hanno compiuto notevoli progressi nella comprensione dell'agente eziologico, della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2), la sua trasmissione, patogenesi e mitigazione mediante vaccini, terapie e interventi non farmaceutici.
Tuttavia, sono ancora necessarie ulteriori indagini per determinare l'origine della pandemia.
Le teorie del rilascio accidentale da un laboratorio o dello spillover zoonotico rimangono entrambe valide.
Sapere come è emerso il COVID-19 è fondamentale per implementare le strategie globali per mitigare il rischio di future epidemie.
Nel maggio 2020, l'Assemblea Mondiale della Sanità ha chiesto al direttore generale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) di lavorare a stretto contatto con i partners per determinare le origini della SARS-CoV-2.
A novembre sono stati pubblicati i termini di riferimento per uno studio congiunto Cina-OMS.
Le informazioni, i dati e i campioni per la prima fase dello studio sono stati raccolti e riassunti dalla parte cinese del team; il resto del team si è basato su questa analisi.
Sebbene non ci siano risultati conclusivi a sostegno di uno spillover naturale o di un incidente di laboratorio, il team ha valutato uno spillover zoonotico da un ospite intermedio come "probabile o molto probabile" e un incidente di laboratorio come "estremamente improbabile".
Inoltre, alle due teorie non è stata data una considerazione equilibrata.
Solo 4 delle 313 pagine della relazione e dei suoi allegati riguardavano la possibilità di un incidente di laboratorio.
In particolare, il direttore generale dell'OMS Tedros Ghebreyesus ha commentato che le indagini delle prove a sostegno di un incidente di laboratorio presenti nel rapporto erano insufficienti ed è stata presa in considerazione l'opzione di fornire risorse aggiuntive per valutarne appieno la possibilità.

"*In quanto scienziati con competenze peculiari, siamo d'accordo con il direttore generale dell'OMS, gli Stati Uniti e altri 13 paesi e l'Unione europea che è necessaria e realizzabile una maggiore chiarezza sulle origini di questa pandemia.*
Dobbiamo prendere sul serio le ipotesi sugli spillover sia naturali che di laboratorio fino a quando non avremo dati sufficienti.
Un'indagine adeguata dovrebbe essere trasparente, obiettiva, basata sui dati, comprensiva di un'ampia esperienza, soggetta a supervisione indipendente e gestita in modo responsabile per ridurre al minimo l'impatto dei conflitti di interesse.
Allo stesso modo, le agenzie di sanità pubblica e i laboratori di ricerca devono aprire i propri archivi al pubblico. Gli investigatori dovrebbero documentare la veridicità e la provenienza dei dati con cui vengono condotte le analisi e trarre conclusioni, in modo che le analisi siano riproducibili da esperti indipendenti.
Infine, sottolineiamo che all'inizio della pandemia, vi sono stati medici, scienziati, giornalisti e cittadini cinesi che hanno tentato di condividere con il mondo informazioni cruciali sulla diffusione del virus— spesso a grande costo personale.
Dovremmo mostrare la stessa determinazione nel promuovere un discorso imparziale basato sulla scienza su questa questione difficile ma importante in questo momento di errato aumento di un sentimento anti-asiatico in alcuni paesi".

Uno dei lavori che è stato ripreso dai media (in Italia da TG Leonardo) e ripubblicato con ulteriori considerazioni da parte degli AA è stato quello di Birger Sorensen, Andres Susrud e Angus Dalgleish.
Angus Dalgleish, 71 anni, esperto di vaccini e professore di oncologia al St George's Hospital di Tooting, a sud di Londra, sostiene che Sars-Cov-2 è fuoriuscito dall'Istituto di virologia di Wuhan a causa della scarsa biosicurezza.
"*Sono un grande sostenitore della legge universale dell'incompetenza umana", ha detto.*
Va oltre gli altri che supportano la teoria della "perdita accidentale" sostenendo che la proteina spike del virus contiene sequenze inserite artificialmente.
"Questo coronavirus è idealmente adattato per infettare i pipistrelli, ed è estremamente improbabile che i cambiamenti necessari per infettare gli esseri umani si siano verificati in modo naturale".
Ovviamente, ha accolto con favore la richiesta del presidente Biden alle agenzie di intelligence statunitensi di rintracciarne la fonte e la apertura di Anthony Fauci sulla ipotesi di uno origine "non naturale" del virus.

A Reconstructed Historical Aetiology of the SARS-Coronavirus-2 Spike

Birger Sorensen, Andres Susrud & Angus Dalgleish

Immunor & St Georges University of London
May 26 2021

SUNTO
Abbiamo pubblicato il meccanismo d'azione del nostro primo vaccino di terza generazione su QRB-D (Quarterly Review of Biophysics – Discovery) il 2 giugno 2020, chiarendo che ci siamo basati sull'analisi della modalità d'azione di SARS-Coronavirus-2.
Entro il 17 marzo 2020 avevamo scoperto che lo spike ha sei inserti che sono impronte digitali uniche con cinque caratteristiche salienti indicative di manipolazione intenzionale e abbiamo diffuso un resoconto provvisorio nel luglio 2020. In questo documento pubblichiamo un resoconto aggiornato e più completo della probabile eziologia del virus e ipotizziamo che la probabilità che sia il risultato di processi naturali è molto piccola (***Dalgleish afferma che "Le leggi della fisica dicono che non ci possono essere quattro amminoacidi a carica positiva in fila. L'unico modo per averli è di fabbricare artificialmente il virus." . Chi si oppone a questa ipotesi ribette che in natura, quelle molecole stanno in fila sugli spike di tutti i betacoronavirus noti fin qui. - ndr***).
Poiché tutte le testimonianze biologiche, informatiche e dirette pertinenti al virus a Wuhan sono state distrutte o non sono disponibili, non è possibile fornire prove assolute.
C'è quindi una scelta da fare tra una risposta metodologica agnostica e passiva o attiva che può formare e valutare ipotesi in modo più efficiente.
Usiamo una logica scientifica attiva.
Per prima cosa descriviamo qui i principi dell'ingegneria di un virus per esperimenti di "***guadagno di funzione***".
Quindi aggiorniamo la nostra analisi biochimica della modalità d'azione del virus SARS-Coronavirus-2.
Abbiamo quindi esposto la logica delle nostre scelte metodologiche.
In quarto luogo, aggiungiamo una dimensione diacronica analizzando una sequenza di cinque progetti collegati che, suggeriamo, mostra per ragionevole deduzione come, dove, quando e da chi il SARS-Coronavirus-2 Spike ha acquisito le sue caratteristiche speciali.
Ipotizziamo che questa eziologia storica ricostruita soddisfa i criteri di mezzi, tempi, agenti e luoghi

per invertire l'onere della prova.
D'ora in poi, coloro che sosterrebbero l'ipotesi del trasferimento zoonotico devono spiegare precisamente perché la nostra più semplice spiegazione della manipolazione di laboratorio è sbagliata, prima di affermare che la loro prova è persuasiva. Ciò è particolarmente vero quando, come mostriamo anche qui, le prove utilizzate per sostenere alcune delle loro argomentazioni sono in realtà in contraddizione con esse.

Il lavoro è stato consegnato ad un giornale di scarsa qualità scientifica "Daily Mail Online" che ha pubblicato questo resoconto il 28 maggio 2021 e aggiornato il 1 giugno 2021

Sintesi dell'intervista esclusiva fatta da Josh Boswell per Dailymail.com

Un nuovo studio esplosivo afferma che COVID-19 "non ha un antenato naturale credibile" ed è stato creato da scienziati cinesi che hanno poi cercato di coprire le proprie tracce con "tecniche di retro-ingegneria" per far sembrare che sia nato naturalmente dai pipistrelli.

- Questo studio attesta che i ricercatori hanno trovato "impronte digitali uniche" in campioni di COVID-19 che potrebbero essere sorte solo dalla manipolazione in un laboratorio
- DailyMail.com ha ottenuto in esclusiva il nuovo documento di 22 pagine scritto dal professor britannico Angus Dalgleish e dallo scienziato norvegese Dr. Birger Sørensen come presentato per la pubblicazione nel Quarterly Review of Biophysics Discovery
- Lo studio ha mostrato che ci sono prove che suggeriscono che gli scienziati cinesi hanno creato il virus mentre lavoravano a un progetto Gain of Function in un laboratorio di Wuhan
- La ricerca sul *guadagno di funzione*, che è stata temporaneamente vietata negli Stati Uniti, comporta l'alterazione dei virus naturali per renderli più infettivi al fine di studiare i loro potenziali effetti sugli esseri umani
- Secondo il documento, gli scienziati cinesi hanno preso una "spina dorsale" naturale di coronavirus *(struttura molecolare di base)* trovato nei pipistrelli delle caverne cinesi e vi hanno unito una nuova "spike", trasformandola nel letale e altamente trasmissibile COVID-19.
- I ricercatori hanno concluso che COVID-19 "non ha un antenato naturale credibile" e credono anche che gli scienziati abbiano decodificato le versioni del virus per coprire le loro tracce
- "Pensiamo che siano stati creati virus retroingegnerizzati", ha detto Dalgleish a DailyMail.com.
- Lo studio indica anche "distruzione deliberata, occultamento o contaminazione dei dati" nei laboratori cinesi e osserva che "gli scienziati che desideravano condividere le loro scoperte non sono stati in grado di farlo o sono scomparsi"
- Fino a poco tempo, la maggior parte degli esperti aveva fermamente negato che le origini del virus fossero qualcosa di diverso da un'infezione naturale che passa dagli animali all'uomo
- All'inizio di questa settimana, il dott. Anthony Fauci ha difeso il finanziamento statunitense dell'Istituto di virologia di Wuhan, affermando che la sovvenzione di $ 600.000 non è stata approvata per la ricerca sul "guadagno di funzione"

La risposta di coloro che non credono nella origine del virus modificato in laboratorio o accidentalmente fuoriuscito affermano che ancora non esiste nessuna prova.
In Italia le contestazioni vengono raccolte da vari media, in particolare "Open Online", di cui riportiamo un saliente articolo

https://www.open.online/ 30 MAGGIO 2021

Perché lo studio di Dalgleish e Sørensen non dimostra la tesi del virus sfuggito da un laboratorio

La proteina Spike (S) del nuovo Coronavirus conterrebbe delle parti inserite artificialmente. Questo è quanto affermavano l'anno scorso l'oncologo Angus Dalgleish e il virologo Birger Sørensen, in uno studio anglo-norvegese su un vaccino sperimentale anti-Covid.
Le stesse suggestive ipotesi vengono riproposte dai ricercatori attraverso alcuni estratti di un pre-print mostrati in esclusiva in un articolo del Daily Mail.
Ecco perché si tratta della solita minestra riscaldata, e non dimostrata – per stessa ammissione degli autori – volta a sostenere l'origine artificiale del SARS-CoV-2, assieme alla fuga accidentale dal laboratorio di Wuhan.

- Lo studio, i cui estratti sono affidati a un tabloid sensazionalista propone una ipotesi basata su indizi già rivelatisi infondati nell'analisi del Yan Report, dove si sostiene la stessa narrazione con argomentazioni molto simili;
- Non è possibile confutare le argomentazioni degli autori, perché secondo loro le prove sono state cancellate o rese non disponibili dal governo cinese;
- Lo stesso pre-print non è al momento consultabile integralmente.

È centrale in questo contesto il ruolo della spike, ovvero l'antigene di SARS-CoV2. Gli antigeni circondano il virus permettendogli di infettare le cellule. A sua volta le spike sono il bersaglio principale del Sistema Immunitario, che deve imparare a riconoscere gli antigeni dei patogeni, mediante la produzione di anticorpi.
Ora diamo un contesto cronologico alla narrazione del «virus-chimera», nella quale si inseriscono pienamente anche Dalgleish e Sørensen.

Un anno di ipotesi non dimostrate
Il primo paper dei ricercatori venne pubblicato dalla Quarterly Review of Biophysics il 29 maggio 2020, dopo una revisione di dieci giorni.
Si trattava della sperimentazione pre-clinica del Biovacc-19.

*«Il documento di Nature intitolato "**Base strutturale del riconoscimento del recettore da parte di SARS-CoV-2**" non rappresenta, infatti, una vera struttura del trimero SARS-CoV-2 spike a eccezione di una parte modificata del legame del recettore (RBM). Utilizza la struttura e la sequenza di SARS-CoV depositata il 1 agosto 2005 come spina dorsale (struttura molecolare di base) e quindi crea una chimera con l'RBM (437-508) di SARS-CoV-2 modificato e inserito».*

Quando Forbes si occupa della notizia, il 7 giugno 2020, fa notare che, per i virologi, sezioni simili della spike sono comuni anche in altri virus, senza necessariamente scomodare la creazione di virus-chimera.
Intanto il 14 settembre 2020 viene pubblicato senza alcuna revisione il primo Yan Report, dove si sostiene che altre sequenze studiate per ricostruire l'albero filogenetico di SARS-CoV-2 sarebbero la prova di una sua creazione in laboratorio.
Si fa riferimento in particolare al genoma di RaTG13, ritenuto dall'autrice Li-Meng Yan la base da

cui avrebbero ingegnerizzato il virus.
Ma oltre a quest'ultimo esistono altri Beta-Coronavirus, trovati nei pipistrelli dopo l'emergere della pandemia, che assieme corroborano l'origine naturale, come ci ha spiegato in maniera dettagliata l'esperto di genomica comparata Marco Gerdol.
Dagli studi che hanno ricostruito l'origine del virus non emergono mai segni di un taglia-incolla di sequenze genetiche, possibili solo possedendo una sofisticata tecnologia a noi ignota, in grado di replicare tutte le mutazioni puntiformi – una per una – in modo da essere coerenti con quelle degli altri Beta-Coronavirus.

«Quelli importanti dal punto di vista evolutivo sono i Coronavirus identificati nei pangolini – precisa Gerdol – *Si tratta di cugini un po' più lontani. Stanno in mezzo tra RaTG13 e RmYN02 (più vicini) e ZXC21 e ZC45 (meno vicini). Anche questi sono stati esclusi dal report, in maniera piuttosto deliberata. Se li avessero inclusi avrebbero rovinato la narrativa del report stesso».*.

Sulle stesse ipotesi del lavoro di Birger Sorensen, Andres Susrud & Angus Dalgleish era stato pubblicato a novembre 2020, in forma liberamente fruibile, questo altro lavoro

The genetic structure of SARS-CoV-2 does not rule out a laboratory origin 18.11.2020

BioEssays
https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15211878
https://doi.org/10.1002/bies.202000240

Rossana Segreto* and Yuri Deigin**

**** Department of Microbiology, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria***

***** Youthereum Genetics Inc., Toronto, Ontario, Canada***

Conclusioni dello studio
SARS-COV-2 chimeric structure and furin cleavage site might be the result of genetic manipulation

Sunto

L'origine della sindrome respiratoria acuta grave da SARS-CoV-2 è ancora controversa.
Le analisi genomiche mostrano che SARS-CoV-2 potrebbe essere chimerico, la maggior parte della sua sequenza più vicina al genoma di CoV RaTG13, mentre il suo dominio di legame al recettore (**RBD**) è quasi identico a quello di un CoV di pangolino.
I virus chimerici possono insorgere tramite ricombinazione naturale o intervento umano.
Il sito di scissione della furina nella proteina spike di SARS-CoV-2 conferisce al virus la capacità di salto di specie e superamento delle relative barriere tissutali, e non era mai stato visto in altri CoV simili al SARS-CoV.
Potrebbero essere state eseguite manipolazioni genetiche per testare i pangolini come possibili ospiti intermedi per i CoV derivati dai pipistrelli ma originariamente non in grado di legarsi ai recettori umani?
Sia il sito di scissione che l'RBD specifico potrebbero derivare da mutagenesi specifiche del sito, una procedura che non lascia traccia. Considerando l'impatto devastante del SARS-CoV-2 e l'importanza di prevenire future pandemie, i ricercatori hanno la responsabilità di effettuare un'analisi approfondita di tutte le possibili origini di SARS-CoV-2.

Introduzione

È passato un anno dall'inizio della Covid-19 provocata da SARS-CoV-2 a Wuhan, in Cina, e la sua origine è ancora controversa.
Nonostante gli sforzi della ricerca internazionale, non è stato ancora identificato un ospite naturale, diretto o intermedio.
L'ipotesi che il mercato all'ingrosso Wuhan Huanan sia stata la prima fonte di trasmissione del virus da animale a uomo ora è stato definitivamente respinto ed i pochi campioni di mercato che sono stati raccolti hanno mostrato solo un SARS-CoV-2 adattato agli esseri umani, senza tracce di ceppi intermedi zoonotici.
Quasi tutti i documenti scientifici pubblicati fino ad oggi affermano che SARS-CoV-2 ha un'origine naturale e l'unico documento pubblicato che considera possibile un'origine accidentale o programmata in laboratorio [1] si concentra sul passaggio seriale come tecnica che potrebbe giustificare l'adattamento peculiare di SARS-CoV-2 alle cellule umane.
Descriviamo qui come le due principali caratteristiche di SARS-CoV-2,

(1) la presenza di un sito di scissione della furina mancante in altri CoV dello stesso gruppo,
(2) un dominio di legame del recettore (RBD) ottimizzato per legarsi alle cellule umane [2]

potrebbero essere il risultato di tecniche di manipolazione di laboratorio come la mutagenesi specifiche *in situ*.
E' poco probabile che l'acquisizione di entrambe queste caratteristiche uniche da parte di SARS-CoV-2, in maniera più o meno simultanea, sia naturale o causata solo dal passaggio seriale in colture cellulari/animali.

I parenti piu' stretti del sars-cov-2 sono i coronavirus dei pipistrelli e del pangolino

Zhou et al.[3] dell'Istituto di virologia di Wuhan (WIV) sono stati i primi a identificare e caratterizzare un nuovo coronavirus (CoV), SARS-CoV-2.
Le sequenze genomiche ottenute dai primi casi condividevano l'identità di sequenza del 79% con i CoV che hanno causato la sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) nel 2002-2003 e l'identità di sequenza del 96,2% con RaTG13 (MN996532), una sequenza di CoV rilevata in un pipistrello *Rhinolophus affinis*.
RaTG13 è attualmente il parente filogenetico più vicino per SARS-CoV-2 trovato [4], ma la sua sequenza genomica completa non è stata pubblicata prima dello scoppio di SARS-CoV-2 e il campione originale è stato raccolto nella provincia dello Yunnan (Cina) dal stesso gruppo di ricercatori WIV nel 2013.
Zhou et al. [3] hanno dichiarato di aver trovato una corrispondenza tra SARS-CoV-2 e una breve regione di RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) di un CoV nel loro database e quindi di aver sequenziato completamente il campione originale raccolto nel 2013, che hanno chiamato RaTG13.
Abbiamo scoperto che la RdRp di RaTG13 ha un'identità nucleotidica del 100% con la sequenza di BtCoV/4991 (KP876546), che è stata identificata da Ge et al.[5] in un pipistrello *Rhinolophus affinis* nella provincia dello Yunnan nel 2013, stesso luogo e anno di RaTG13.
BtCoV/4991 è stato identificato in una miniera colonizzata da pipistrelli vicino a Tongguanzhen, Mojiang, Yunnan.
I ricercatori del WIV sono stati invitati a indagare sulla miniera dopo che sei minatori avevano contratto una grave polmonite nel 2012 e tre dei minatori sono morti [6]. I minatori erano stati incaricati di eliminare gli escrementi di pipistrelli nella miniera e la gravità della loro polmonite è correlata alla durata dell'esposizione nella miniera [7].
Quattro campioni di minatori sono stati successivamente sottoposti a test presso il WIV, dove sono state identificate immunoglobuline G (IgG) contro la SARS in tutti i campioni [8].
Considerando che solo circa 5300 persone sono state infettate nella Cina continentale durante

l'epidemia di SARS del 2002-2004, la maggior parte delle quali risiedeva nel Guandong, le probabilità che quattro minatori nello Yunnan conservino gli anticorpi dell'epidemia di SARS del 2002-2004 sono trascurabili.
D'altra parte, è possibile che il test anticorpale anti-SARS praticato ai minatori abbia reagito in modo incrociato con un nuovo virus simile al SARS-CoV che i minatori avevano acquisito nella miniera.
Get et al. [5] hanno identificato un certo numero di CoV nella miniera, ma in base all'analisi filogenetica, BtCoV/4991 era l'unico ceppo correlato alla SARS, chiaramente separato da tutti gli alfa e beta-CoV conosciuti all'epoca. BtCoV/4991 era anche diverso dagli altri CoV di pipistrello nell'analisi filogenetica effettuata da Wang et al. Nel 2019 [9].
Chen et al. [10] hanno identificato BtCoV/4991 come la sequenza più vicina a SARS-CoV2 perché RaTG13 non era ancora stato pubblicato in quel momento. BtCoV/4991 e RaTG13 sono stati successivamente considerati come due diversi nomi in codice dello stesso ceppo, poiché i loro autori originali hanno registrato presso il WIV i due ceppi come una voce nel Database dei virus associati ai pipistrelli (DBatVir).
Alla fine di luglio 2020, Zhengli Shi, uno dei principali ricercatori sui CoV di WIV, in un'intervista via e-mail [11] ha confermato la ridenominazione del campione RaTG13 e ha dichiarato inaspettatamente che il sequenziamento completo di RaTG13 era stato effettuato già nel 2018 e non dopo l'epidemia di SARS-CoV2, come affermato da Zhou et al. [3].
La posizione contraria del WIV sui tempi del completo sequenziamento di RaTG13 potrebbe essere causata dalle affermazioni critiche di ricercatori indipendenti sulle origini di SARS-CoV2, concentrate sul fatto che i nomi dei file del sequenziamento originale depositati dal WIV (Istituto di virologia di Wuhan) il 19 maggio 2020 sembrano indicare che il sequenziamento per RaTG13 sia stato eseguito nel 2017 e nel 2018.
Tuttavia, non è stata presentata alcuna dichiarazione di errore formale sull'anno di sequenziamento e sulla ridenominazione del campione da parte degli autori, Zhou et al. [3], per quanto è attualmente noto.
La seconda sequenza RdRp (RNA polimerasi RNA-dipendente) non umana più vicina a BtCoV/4991 (91,89% di identità nucleotidica) è la sequenza CoV MP789 (MT084071) isolata nel 2019 in un pangolino malese (Manis javanica) della provincia del Guangdong (GD), Cina [12].
La proteina dell'involucro di MP789 mostra sorprendentemente un'identità aminoacidica del 100% con la proteina corrispondente del RaTG13, del CoVZXC21 (MG772934.1) di bat-SL , del CoVZC45 (MG772933.1) di bat-SL e in alcuni primi SARS-CoV2 isolati (es. YP_009724392) [13].
La proteina dell'involucro dei CoV è coinvolta in aspetti critici del ciclo di vita virale, come l'ingresso virale, la replicazione e la patogenesi [14].

I CoV dei pipistrelli sono stati approfonditamente studiati e geneticamente manipolati

Molti studi hanno riportato che i pipistrelli sono serbatoi naturali per un'ampia varietà di CoV potenzialmente patogeni simili alla SARS [15, 16].
Alcuni di questi virus possono potenzialmente infettare direttamente gli esseri umani [17], mentre altri hanno bisogno di mutare la loro proteina spike per legarsi efficacemente al recettore 2 dell'enzima di conversione dell'angiotensina 1 umana (hACE2) e mediare l'ingresso del virus [18].
Per valutare il potenziale di spillover di nuovi CoV, i ricercatori hanno creato una serie di CoV chimerici, costituiti da spine dorsali (struttura molecolare di base) di CoV di pipistrello, normalmente incapaci di infettare le cellule umane, le cui proteine spike sono state sostituite da quelle di CoV compatibili con ACE2 umano. Queste chimere avevano lo scopo di simulare eventi di ricombinazione che potrebbero verificarsi in natura [19, 20].
Tali esperimenti di “guadagno di funzione” hanno sollevato una serie di preoccupazioni sulla biosicurezza e suscitato polemiche tra i ricercatori e il pubblico in generale.

Uno dei principali argomenti a favore degli studi sul guadagno di funzione è la necessità di essere preparati con un arsenale di farmaci e vaccini per la prossima pandemia [21].
Al contrario, uno dei principali argomenti in opposizione è che la prossima pandemia stessa potrebbe essere causata da quegli esperimenti, a causa del rischio di fuoriuscita dal laboratorio [22, 23]
Negli ultimi anni, il campo della virologia dei CoV si era concentrato sulle terapie e sui vaccini pan-CoV, (ricerche condotte negli ultimi 5 anni) [24-27] e dai resoconti dei media.
La generazione sintetica di diversi pannelli di potenziali CoV (che potrebbero emergere) è un obiettivo delle sovvenzioni attive per l'EcoHealth Alliance, che ha finanziato alcune di tali ricerche presso WIV, in collaborazione con i laboratori negli Stati Uniti e altri partner internazionali.

La creazione di CoV chimerici con nuovi rbds (receptor binding domains) è in atto da decenni

I ricercatori generano CoV chimerici da oltre due decenni, molto prima dell'avvento delle moderne tecniche di sequenziamento di ingegneria genetica.
Ad esempio, nel 1999, un gruppo dell'Università di Utrecht ha utilizzato la ricombinazione finalizzata dell'RNA per creare una chimera CoV "di gatto e di topo".
Gli RBD (domini di legame del recettore) di un CoV felino e murino sono stati scambiati, dimostrando che questo scambio ha cambiato anche il tropismo delle specie durante esperiment in vitro [28].
Nel 2007, il gruppo Shi del WIV ha creato una serie di proteine spike chimeriche CoV "uomo-pipistrello" durante le sperimentazioni per determinare cosa esattamente conferisce ai CoV la capacità di passare da una specie all'altra.
I ricercatori hanno utilizzato diversi segmenti della proteina spike del virus della SARS umana per sostituire i segmenti corrispondenti nella proteina spike della spina dorsale *(struttura molecolare di base)* del virus del pipistrello.
Si è concluso che una regione relativamente corta (da 310 a 518 aa) della proteina spike "era necessaria e sufficiente per convertire Rp3-S in una molecola legante huACE2" [29] cioè per fornire alla proteina spike del pipistrello CoV una nuova capacità di legame a un recettore ACE2 umano.
Nel 2008, il gruppo Baric dell'Università della Carolina del Nord (UNC) ha compiuto un ulteriore passo avanti nella ricerca del WIV: invece di utilizzare pseudo-virus dei virus dell'immuno-deficienza umana (HIV) con proteine spike del CoV di pipistrello, è stato creato un CoV chimerico vivo.
Seguendo gli esperimenti dei loro colleghi del WIV (Istituto di virologia di Wuhan) del 2007, il gruppo Baric ha utilizzato un CoV simile alla SARS di pipistrello come spina dorsale e ha sostituito il suo RBD (receptor binding domain) con il RBD della SARS umana [30]
Nel 2015, i gruppi Shi e Baric hanno unito le forze e hanno pubblicato probabilmente il più famoso documento di virologia sul “guadagno di funzione”, che descriveva la creazione di un altro virus chimerico sintetico [19].
Questa volta il RBD della struttura di un virus SARS adattato al topo (SARS-MA15) è stato sostituito dal RBD di RsSHC014, un ceppo di pipistrello precedentemente isolato dai pipistrelli dello Yunnan nel 2011 dal gruppo Shi.
Nel 2016, il gruppo Baric ha ripetuto l'esperimento del 2015 utilizzando la stessa struttura SARS-MA15 e l'RBD di Rs3367 [31], un parente stretto di RsSHC014 anche precedentemente trovato nello Yunnan dal WIV e ribattezzato "WIV1" dopo la coltura in vivo [17].
Probabilmente, il maggior numero di nuovi virus chimerici creati è stato descritto in un articolo del 2017 del gruppo Shi del WIV, [15] in cui gli autori hanno riferito di aver creato otto virus chimerici usando WIV1 come spina dorsale e di trapiantarvi vari RBD da virus del pipistrello SARS-like.
Questi virus sono stati raccolti in un arco di 5 anni dalla stessa grotta vicino a Kunming, nella provincia dello Yunnan, dove il gruppo Shi ha originariamente trovato Rs3367 e RsSHC014.

Solo due degli otto virus chimerici sono sopravvissuti e questi due ceppi hanno dimostrato di possedere la capacità di legarsi al recettore ACE2 umano, come confermato da esperimenti in cellule HeLa che esprimono hACE2 tramite quantificazione dell'RNA virale con RT-PCR.

Sars-cov2 condivide il suo rbd (receptor binding domains) con un co.v. di pangolino

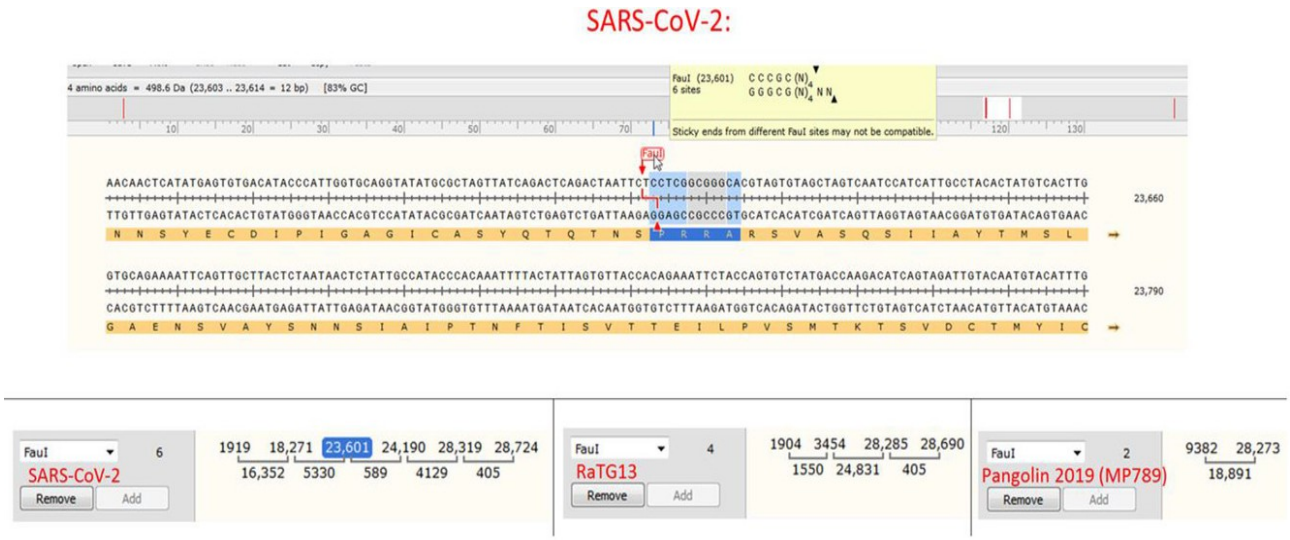
La possibilità che i pangolini possano essere l'ospite intermedio per SARS-CoV2 è stata a lungo oggetto di discussione [32-34].
La più grande divergenza tra SARS-CoV2 e RaTG13 si osserva nell'RBD delle loro spike [4].
Sebbene la somiglianza complessiva del genoma sia inferiore a SARS-CoV-2 rispetto a quella di RaTG13, il ceppo di virus del pangolino MP789 isolato fra i PCoV-GD dei pangolini ha un RBD quasi identico a quello di SARS-CoV2.
Infatti, i PCoV e SARS-CoV2 possiedono amminoacidi identici ai cinque residui critici del RBD, mentre RaTG13 condivide solo un amminoacido con SARS-CoV-2 [35].
La somiglianza della sequenza ACE2 è maggiore tra i virus di umani e pangolini che tra i virus di umani e pipistrelli. Curiosamente, la proteina spike di SARS-CoV-2 ha un'affinità di legame prevista più alta per il recettore ACE2 umano rispetto a quella di pangolini e pipistrelli.
Prima dell'epidemia di SARS-CoV2, i pangolini erano gli unici mammiferi diversi dai pipistrelli in grado di essere infettati da CoV correlati a SARS-CoV-2 [12].
Gli eventi di ricombinazione tra il RBD dei CoV dei pangolini e la spina dorsale (struttura molecolare di base) tipo RaTG13 potrebbero aver prodotto SARS-CoV2 come ceppo chimerico.
Affinché tale ricombinazione avvenga in modo naturale, i due virus devono aver infettato contemporaneamente la stessa cellula dello stesso organismo, evento piuttosto improbabile considerando la bassa densità di popolazione dei pangolini e la scarsa presenza di CoV nelle loro popolazioni naturali.
Inoltre, studi di legame ai recettori del RaTG13 ricostituito hanno mostrato che questo virus non si lega alla ACE2 dei pangolini.

Il sito di taglio enzimatico della furina: la differenza chiave tra sars-cov-2 e il suo parente piu' stretto ratg13

SARS-CoV2 differisce dal suo parente più prossimo RaTG13 per alcune caratteristiche chiave.
La differenza più evidente è l'acquisizione nella proteina spike di SARS-CoV2 di un sito di scissione attivato da un enzima della cellula ospite, la furina, precedentemente non identificato in altri beta-CoV della linea b [36] e simile a quello del CoV della Sindrome respiratoria medio-orientale (MERS) [35].
L'attività della proteasi dell'ospite svolge un ruolo fondamentale come barriera di specie e tissutale e la bioingegnerizzazione dei siti di scissione delle proteine della spike di CoV modifica il tropismo e la virulenza del virus [37].
L'espressione ubiquitaria della furina in diversi organi e tessuti ha conferito a SARS-CoV2 la capacità di infettare organi solitamente invulnerabili ad altri CoV, portando a infezioni sistemiche [38].
SARS-CoV2 coltivato in cellule che non hanno il sito di scissione sopra menzionato ha causato sintomi attenuati nei criceti infetti [39] e studi di mutagenesi hanno confermato che il sito polibasico per la furina è essenziale per la capacità di SARS-CoV2 di infettare le cellule polmonari umane [40].
Il sito polibasico per la furina in SARS-CoV2 è stato creato da un inserto di 12 nucleotidi,

TCCTCGGCGGGC che codifica per una sequenza di amminoacidi PRRA alla giunzione S1/S2 (FIGURA 1).
È interessante notare che le due arginine di giunzione sono codificate da due codoni CGGCGG, che sono rari per questi virus: solo il 5% delle arginine è codificato da CGG in SARS-CoV2 o RaTG13 e CGGCGG nel nuovo inserto è l'unico esempio raddoppiato di questo codone in SARS-CoV-2.
L'inserto CGGCGG include un sito di restrizione *FauI*, di cui ci sono sei copie in SARS-CoV2 e quattro in RaTG13 (due in MP789).
La posizione fortuita del sito *FauI* potrebbe consentire l'utilizzo di tecniche di variazione della lunghezza dei frammenti di restrizione del DNA (*polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione = RFLP, che si evidenzia con un enzima di restrizione e una sonda appropriata*) [41] per il clonaggio [42] o screening per le mutazioni [43], poiché il nuovo sito della furina è soggetto a delezioni in vitro [39, 44].

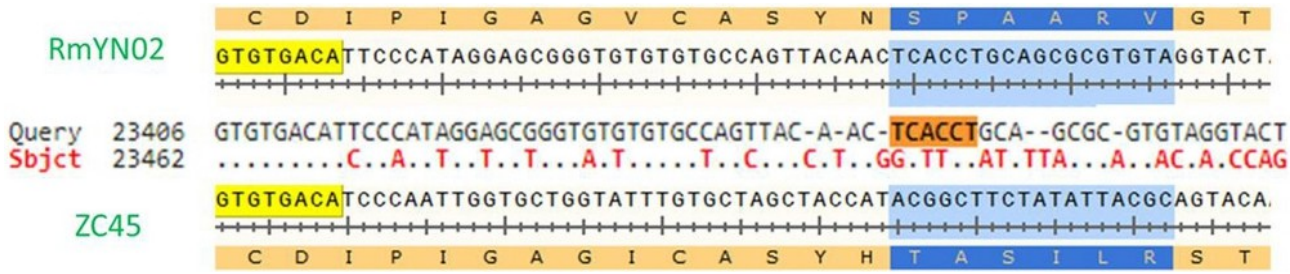
FIGURA 1



Sequenza nucleotidica della proteina S alla giunzione S1/S2 in SARS-CoV2 (NC045512.2) che mostra il sito di scissione della furina (in blu) che include un sito di restrizione enzimatica *FauI*

Uno studio di Zhou et al. [45] ha riportato la scoperta di un nuovo ceppo CoV, RmYN02, che secondo gli autori mostra inserzioni di aminoacidi PAA naturali nel sito di scissione S1/S2 mentre SARS-CoV2 ha l'inserzione PRRA.
Tuttavia, dopo un attento esame della sequenza nucleotidica relativa a RmYN02 (rispetto ai suoi antenati più vicini bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21), non vi sono evidenti inserzioni, ma solo mutazioni nucleotidiche (FIGURA 2).

FIGURA 2



Allineamento delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche della proteina S da bat-SL-CoVZC45

(MG772933.1) e RmYN02 nel sito di giunzione S1/S2. Non si osservano inserzioni di nucleotidi che possano costituire un sito di scissione della furina (in blu)

Pertanto, SARS-CoV2 si dimostra unico tra i suoi parenti beta CoV non solo a causa di un sito polibasico per la furina alla giunzione S1 / S2, ma anche a causa dell'inserto di quattro amminoacidi PRRA che lo costituisce.
L'inserimento provoca un taglio nel codone originale per la serina (TCA) in MP789 o RaTG13 per diventare parte di un nuovo codone per la serina (TCT) e parte per l'aminoacido alanina (GCA) in SARS-CoV-2 (FIGURA 3) .

FIGURA 3

```
Pangolin MP789        G   A   G   I   C   A   S   Y   Q   T   Q   T   N   S   -   -   -   -   R
   (nt 23527):       ggt gca gga ata tgt gcc agt tat cag act caa act aat tca --- --- --- --- cgt

RaTG13                G   A   G   I   C   A   S   Y   Q   T   Q   T   N   S   -   -   -   -   R
   (nt 23543):       ggt gca gga ata tgc gcc agt tat cag act caa act aat tca --- --- --- --- cgt

SARS-CoV-2            G   A   G   I   C   A   S   Y   Q   T   Q   T   N   S   P   R   R   A   R
   (nt 23561):       ggt gca ggt ata tgc gct agt tat cag act cag act aat tct cct cgg cgg gca cgt

       Black  = common for all 3
       Red    = unique to SARS-CoV-2
       Green  = unique to RaTG13
       Blue   = common difference of RaTG13 and SARS-CoV-2 from MP789
```

Allineamento delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche della proteina S di RaTG13 (MN996532), MP789 (MT084071) e SARS-CoV2 (NC045512.2) nel sito S1/S2.
I nucleotidi e gli amminoacidi comuni sono indicati in nero, i nucleotidi e gli amminoacidi unici SARS-CoV2 in rosso, i nucleotidi e gli amminoacidi unici RaTG13 in verde e i nucleotidi e gli amminoacidi comuni in SARS-CoV2 e RaTG13 che differiscono in MP789 in blu.
Il codone per la serina (TCA) in RaTG13 e MP789 è suddiviso in SARS-CoV2 per dare parte a un nuovo codone per serina (TCT) e parte di alanina (GCA).

L'inserimento del sito di scissione della furina in SARS-CoV2 non è in armonia con il resto della sequenza, se confrontato con le sequenze di MP789 e RaTG13 (FIGURA 3).
Pertanto, è possibile escludere che tale inserimento possa aver avuto origine da un errore della polimerasi o altro meccanismo molecolare simile, poiché le mutazioni di inserimento generate da questi meccanismi non dovrebbero modificare il frame di lettura della sequenza virale [46].
La possibilità che il sito di scissione della furina possa essere stato acquisito per ricombinazione è stata recentemente messa in dubbio da Seyran et al., [47] perché la proteina spike SARS-CoV-2 non sembra dimostrare ulteriori eventi di ricombinazione in contrasto con il modello di ricombinazione di altri CoV.

RIFLESSIONE CRITICA SU "L'IPOTESI PIU' CREDIBILE SULL'ORIGINE DI SARS-COV-2″

A causa dell'ampio spettro di ricerche condotte in quasi 20 anni sui SARS-CoV dei pipistrelli, giustificate dal loro potenziale salto di specie verso l'uomo [48], non si può escludere una possibile manipolazione genetica di SARS-CoV-2 in laboratorio.
L'articolo ampiamente citato di Andersen et al. [2] ha affermato che SARS-CoV-2 ha quasi sicuramente un'origine naturale.
L'argomento principale portato dagli autori è che il legame ad alta affinità della proteina spike SARS-CoV-2 con hACE2 (il recettore umano ACE2) non avrebbe potuto essere previsto dai

modelli basati sull'RBD di SARS-CoV.
Sulla base dell'analisi strutturale condotta da Wan et al. [49], SARS-CoV-2 ha il potenziale per riconoscere hACE2 in modo più efficiente rispetto al SARS-CoV, identificato nel 2002.
Inoltre, la generazione di ceppi chimerici CoV ha recentemente dimostrato che le spikes di CoV di pipistrello possono legarsi al recettore hACE2 con più plasticità di quanto precedentemente previsto [15].
Tutti gli amminoacidi nel RBD sono stati ampiamente analizzati e sono disponibili nuovi modelli per prevedere l'affinità ad ACE2 [50]. A questo proposito, è stato dimostrato che BatCoV Rs3367 (identità del 99,9% rispetto a WIV1) condivide con SARS-CoV-2 quattro dei sei residui critici nel RBD. Considerando che è stato dimostrato che WIV1 si lega direttamente a hACE2, la stessa ipotesi avrebbe potuto essere facilmente fatta per gli RBD di SARS-CoV-2 [51].
Come descritto altrove, da tempo si effettua la creazione di virus chimerici con lo scopo di studiare la potenziale patogenicità dei CoV di pipistrello verso l'uomo.
In questo contesto, SARS-CoV-2 potrebbe essere stato sintetizzato combinando una spina dorsale (struttura molecolare di base) simile a RaTG13 con l'RBD di CoV simile a quello recentemente isolato dai pangolini [12] , poiché quest'ultimo è caratterizzato da una maggiore affinità con il recettore hACE2 .
Tale ricerca avrebbe potuto mirare a identificare i pangolini come possibili ospiti intermedi per il bat-CoV potenzialmente patogeno per l'uomo. Il successivo passaggio seriale in colture cellulari o animali, come descritto da Sirotkin & Sirotkin [1], potrebbe aver fornito il perfetto adattamento del RBD all'hACE2.
Per quanto riguarda il sito di scissione della furina, Andersen et al. [2] affermano che "*la conseguenza funzionale del sito di scissione polibasica in SARS-CoV-2 è sconosciuta*".
Nuovi studi di diversi gruppi hanno recentemente identificato questo sito di attivazione come adeguato a consentire al virus una capacità di penetrazione più efficiente nelle cellule umane e di attaccare più organi [52].
Esperimenti sulla scissione proteolitica delle proteine della spike di CoV sono stati recentemente suggeriti come futuri studi chiave per comprendere la trasmissibilità del virus in diversi ospiti [50].
Andersen et al. [2] affermano inoltre, sulla base del lavoro di Almazan et al. [53] che "i dati genetici dimostrano inconfutabilmente che SARS-CoV-2 non è derivato da alcun tipo di virus utilizzato in precedenza (*in laboratorio? - ndr*) ".
Negli ultimi 6 anni prima dell'epidemia di SARS-CoV-2 il numero di potenziali strutture molecolari di base del virus dei pipistrelli è innegabilmente aumentato per via delle ricerche e catture di pipistrelli delle caverne, fino all'ultima struttura scoperta, RaTG13, comunicata in ambiente scientifico nel gennaio 2020.
Altre possibili struttura molecolari di base potrebbero venire pubblicate in futuro.
Andersen et al. [2] affermano che *"l'acquisizione sia del sito di clivaggio polibasico che della presenza di glicani "O-linked" (*O linked glicosilazione è il legame di uno zucchero all'ossigeno di un residuo di serina (Ser) o treonina in una proteina - ndr*) va contro gli scenari scientifici prevedibili".*
I metodi per l'inserimento di un sito di scissione polibasico nel CoV della bronchite infettiva sono forniti da Cheng et al. [54] e questa modifica ha determinato un aumento della patogenicità.
Per quanto riguarda i glicani O-linked previsti attorno al sito polibasico inserito, va notato che questa ipotesi non è stata confermata dall'indagine Cryo-EM sulla glicoproteina spike di SARS-CoV-2. [55].
Tuttavia, anche se è più probabile che i glicani O-linked siano frutto di una selezione immunitaria, non si puo' escludere che potrebbero essere aggiunti in laboratorio attraverso una mutagenesi "in situ" [56] o insorgere nel corso di esperimenti in vivo , ad esempio, in topi BLT-L con impianti polmonari umani e sistema immunitario umano autologo [57] o in topi che esprimono il recettore hACE2 [31].

Per superare i problemi di isolamento del CoV del pipistrello, sono stati condotti esperimenti basati sull'inoculazione diretta del CoV del pipistrello nei ratti neonati [58].
Topi umanizzati, furetti, primati e/o altri animali con una conformazione ACE2 simile avrebbero potuto essere tutti usati per esperimenti di passaggi seriali, come descritto in dettaglio da Sirotkin e Sirotkin [1].
Andersen et al. [2] affermano anche che "*la successiva generazione di un sito di scissione polibasico avrebbe quindi richiesto il passaggio ripetuto in colture cellulari o in animali da esperimento con recettori ACE2 simili a quelli umani, ma tale lavoro non è stato mai descritto*".
Non si dovrebbe escludere che tali esperimenti avrebbero potuto essere interrotti a causa dell'epidemia di SARS-CoV-2, prima di una possibile pubblicazione dei risultati oppure che si sia scelto di non pubblicare mai i risultati.
È importante sottolineare che RaTG13 e le sequenze CoV identificate in pangolini di contrabbando confiscati nella provincia del GuanDong nel marzo 2019 e a cui si riferiscono la maggior parte dei documenti pubblicati a sostegno di un'origine naturale della SARS-CoV-2 [2] sono stati recentemente sotto inchiesta per quanto riguarda l'accuratezza dei loro dati e sono state richieste ulteriori analisi per dimostrarne la correttezza.
Va anche notato che gli studi di legame in vitro del recettore del virus RaTG13 ricostituito hanno prodotto alcuni risultati peculiari.
L'osservazione più sorprendente è stata che RaTG13, a differenza di SARS-CoV-2, non è in grado di legare ACE2 nel pipistrello *R. macrotis*, un parente stretto di *R. affinis*, presunto ospite di RaTG13 [59], (di cui il recettore ACE2 non è stato ancora ben studiato).
Allo stesso tempo, è stato osservato che RaTG13 ha un'affinità a hACE2 [60], più bassa rispetto ad ACE2 di ratti e topi, a cui al contrario SARS-CoV-2 non si lega affatto.
È possibile che proprio come SARS-MA15 era un ceppo di SARS adattato al topo, RaTG13 sia in realtà una versione adattata al topo di un CoV estratto dalla grotta di Mojiang, piuttosto che un ceppo ottenuto da un tampone fecale di pipistrello?
Sfortunatamente, il campione RaTG13 è stato esaurito negli esperimenti condotti e non è più disponibile per un esame di una commissione OMS [11], il che avrebbe potuto risolvere una serie di incongruenze nei suoi dati grezzi di sequenziamento. Inoltre, rimane una questione aperta e di grande rilevanza lo stato e la disponibilità dei campioni dei minatori del Mojiang.
Sono stati raccolti diversi campioni dai minatori [7 , 8] e probabilmente conservati, e sarebbe di grande valore testarli per la presenza di CoV simili a SARS-CoV-2.
Un'altra questione aperta è il motivo della modifica e della successiva cancellazione del database virale del WIV.
Nel maggio 2020, diversi media hanno riferito che il sistema di tracciamento delle modifiche del database interno del WIV ha mostrato che questo è stato rinominato da "Database di agenti patogeni virali trasmessi dalla fauna selvatica" in "Database di patogeni virali trasmessi da pipistrelli e roditori" e la sua descrizione è stata modificata sostituendo la denominazione di "animale selvatico" con "pipistrello e roditore". Inoltre, è stata eliminata la citazione di "artropodi vettori".
La descrizione del database riportava la presenza di oltre 60 Mb di dati in formato SQL (Structured Query Language), ma all'inizio di maggio 2020 il collegamento per il download ha smesso di funzionare.
Successivamente, l'indirizzo del database è stato rimosso nella sua interezza ma una copia è ancora disponibile su Web Archive.
È possibile che altri laboratori CoV internazionali abbiano scaricato l'archivio SQL del database WIV (Istituto di virologia di Wuhan) prima che venisse rimosso, nel qual caso tali gruppi potrebbero rendere tali dati pubblicamente disponibili.

FUORIUSCITA ACCIDENTALE DI UN VIRUS DA UN LABORATORIO

La fuga di agenti patogeni altamente pericolosi dai laboratori di massima sicurezza non è un evento raro e sono stati documentati incidenti in diversi paesi. Una notevole fuoriuscita di laboratorio è stata quella di H1N1 del 1977 in Cina che ha causato una pandemia mondiale [61].
Di recente c'è l'epidemia di brucellosi del novembre 2019 che si è verificata in due centri di ricerca a Lanzhou, in Cina, infettando oltre 100 studenti e membri del personale [62].
Sono state segnalate anche diverse fughe dal laboratorio del primo virus SARS: nell'estate del 2003 a Singapore [63], poi nel dicembre 2003 a Taiwan, e nella primavera del 2004 due volte in Cina.
Le preoccupazioni sulla sicurezza del laboratorio del WIV (Istituto di virologia di Wuhan) sono state sollevate nel 2018 dai funzionari dell'ambasciata degli Stati Uniti dopo aver visitato l'Istituto e aver avuto un'intervista con Zhengli Shi.
I funzionari USA hanno riassunto le loro preoccupazioni nei successivi cablogrammi diplomatici a Washington. Anche gli esperti cinesi hanno espresso preoccupazione per la sicurezza dei laboratori nel proprio paese, lamentando che "i rifiuti emessi dai laboratori possono contenere virus, batteri o microbi creati dall'uomo" e che "alcuni ricercatori scaricano materiali di laboratorio nella fogna dopo esperimenti senza uno specifico meccanismo di smaltimento biologico".
Anche i laboratori americani hanno avuto la loro parte di problemi di sicurezza.
Recentemente, nell'agosto 2019, sono state interrotte le sperimentazioni nella struttura di livello di biosicurezza (BSL)-4 dell'United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) a Fort Detrick a seguito di violazioni della sicurezza relative allo smaltimento di materiali infettivi.
Anche altri laboratori statunitensi sono stati citati per questioni di sicurezza [22].
È possibile immaginare una serie di scenari che avrebbero agevolato la fuoriuscita di SARS-CoV-2 da un laboratorio.
Ad esempio, un animale infetto potrebbe essere fuggito dal laboratorio o potrebbe aver graffiato o morso un operatore (una preoccupazione sollevata nel 2017 sull'istituzione di una struttura per la sperimentazione di vaccini per primati BSL-4 a Kunming, Yunnan [64]), o un ricercatore potrebbe essersi accidentalmente punto (come è successo in due casi in Russia).
Fino al 2020, i CoV non erano considerati particolarmente mortali o virulenti. I CoV simili alla SARS non richiedevano BSL-4 e potevano essere manipolati in condizioni BSL-2 e BSL-3 [42], rendendo più probabile una perdita accidentale.
Esperimenti di aerosol con CoV [65] potrebbero causare fuoriuscite, per un guasto alla tenuta stagna dell'attrezzatura utilizzata, evento che in assenza di controlli adeguati potrebbe passare inosservato fino a quando non si manifesta un'infezione negli operatori di laboratorio.
Infine, il virus potrebbe essere potenzialmente fuoriuscito attraverso il sistema fognario se non fossero state seguite le corrette procedure di smaltimento e/o decontaminazione dei rifiuti.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Sulla base della nostra analisi, un'origine artificiale di SARS-CoV-2 non è una fantasiosa teoria della cospirazione [66] e i ricercatori hanno la responsabilità di considerare tutte le possibili cause dell'emergenza di SARS-CoV-2.
L'inserimento di RBD-CoV di pangolino adattato all'uomo ottenuto mediante passaggio seriale in colture cellulari o animali e la modifica del sito di scissione della furina potrebbero derivare da esperimenti di mutagenesi "in situ", in un contesto di studi di evoluzione biologica o sviluppo di vaccini o farmaci pan-CoV.
Un recente articolo su Nature [67] afferma che non si può escludere un'origine di laboratorio per SARS-CoV-2, poiché i ricercatori potrebbero essere stati infettati accidentalmente e che esperimenti di "guadagno di funzione" con conseguente creazione del virus SARS-CoV-2 potrebbero essere stati eseguiti presso il WIV.
La manipolazione genetica di SARS-CoV-2 avrebbe potuto essere effettuata in qualsiasi laboratorio

del mondo con accesso alla sequenza genetica e con le attrezzature necessarie e non avrebbe lasciato alcuna traccia.
Le moderne tecnologie basate su piattaforme genetiche sintetiche consentono la ricostruzione dei virus in base alla conoscenza della loro sequenza genomica, senza la necessità di aver acquisito un isolato naturale [68].
È fortemente necessaria un'indagine approfondita sulla raccolta dei ceppi e sui resoconti delle ricerche in tutti i laboratori coinvolti negli studi sul CoV prima dell'epidemia di SARS-CoV-2.
Particolare attenzione dovrebbe essere prestata ai ceppi di CoV che sono stati generati nei laboratori di virologia ma non sono stati ancora pubblicati, come quelli eventualmente descritti nel database WIV cancellato.
Poiché la ricerca di un possibile ospite naturale potrebbe richiedere anni, come con la prima SARS [67], o non dare alcun risultato, dovrebbe essere data uguale priorità all'indagine sulle origini naturali e di fuoruscita da laboratorio di SARS-CoV-2.
Xiao Qiang, ricercatore a Berkeley, ha recentemente dichiarato: "*Capire esattamente come ha avuto origine questo virus è una conoscenza fondamentale per impedire che ciò accada in futuro*".

RINGRAZIAMENTI

Siamo molto grati al Prof. Allan Krill (NTNU) per aver letto le bozze del manoscritto, tutti i preziosi commenti e per essere stato disponibile a discussioni su ipotesi controverse; al Prof. Heribert Insam (Capo del Dipartimento di Microbiologia; Università di Innsbruck) per il suo supporto e al Dr. Lawrence Sellin per tutte le informazioni utili.
Un ringraziamento speciale va al Dr. Fernando Castro-Chavez (ex Post-Doc al New York Medical College) per il suo supporto con Research Gate.
Siamo molto grati a René Bergelt, per aver identificato il database che ha confermato la nostra tesi che BtCoV4991 e RaTG13 si riferiscono allo stesso campione.
Infine, siamo estremamente grati ai membri del DRASTIC (Decentralised Radical Autonomous Search Team Investigating COVID-19) Gruppo Twitter per tutto il loro lavoro nello scoprire molti fatti inediti sul SARS-CoV-2 e i suoi relativi ceppi.
In particolare, siamo grati a Luigi Warren per aver sondato la possibile connessione dell'epidemia di polmonite di Mojiang del 2012 al SARS-CoV-2, a @TheSeeker268 per aver trovato le tesi di dottorato PhD in lingua cinese di Xu MSc 2013 e Huang 2016, che hanno confermato la natura virale simile alla SARS dell'epidemia di polmonite di Mojiang del 2012 e hanno chiarito il ruolo del WIV nell'investigare quell'epidemia, inclusa la raccolta del ceppo 4991/RaTG13 dalla miniera di Mojiang e a Francisco de Asis de Ribera Martin per averci fornito la traduzione inglese delle due tesi e anche per le indagini sull'amplicone RaTG13.

Rossana Segreto and Yuri Deigin dichiarano di non avere conflitti di interesse in merito a questa pubblicazione

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Sirotkin, K., & Sirotkin, D. (2020). Might SARS-CoV-2 have arisen *via* serial passage through an animal host or cell culture? A potential explanation for much of the novel coronavirus' distinctive genome. *BioEssays*, **42**, 1- 7. https://doi.org/10.1002/bies.202000091

2. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.*, **26**, 450- 452. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9

3. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., … Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, **579**, 270- 273. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

4. Cagliani, R., Forni, D., Clerici, M., & Sironi, M. (2020). Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Virol.*, **94**, 1- 11. https://doi.org/10.1128/jvi.00411-20

5. Ge, X. Y., Wang, N., Zhang, W., Hu, B., Li, B., Zhang, Y. Z., … Shi, Z. L. (2016). Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol. Sin.*, **31**, 31- 40. https://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9

6. Wu, Z., Yang, L., Yang, F., Ren, X., Jiang, J., Dong, J., … Jin, Q. (2014). Novel henipa-like virus, mojiang paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1064- 1066. https://doi.org/10.3201/eid2006.131022

7. Xu, L. (2013). The analysis of 6 patients with severe pneumonia caused by unknown viruses (Master's Thesis). Kunming Medical University, Emergency Medicine (professional degree).http://eng.oversea.cnki.net/Kcms/detail/detail.aspx?filename=1013327523.nh&dbcode=CMFD&dbname=CMFD2014

8. Huang, C. (2016). Novel virus discovery in bat and the exploration of receptor of bat coronavirus HKU9 (PhD Thesis). Chinese Center for Disease Control and Prevention. http://eng.oversea.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFDLAST2018&filename=1017118517.nh

9. Wang, N., Luo, C., Liu, H., Yang, X., Hu, B., Zhang, W., … Shi, Z. (2019). Characterization of a new member of alphacoronavirus with unique genomic features in *Rhinolophus* bats. *Viruses*, **11**(4), 379. https://doi.org/10.3390/v11040379

10. Chen, L., Liu, W., Zhang, Q., Xu, K., Ye, G., Wu, W., … Liu, Y. (2020). RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 313- 319. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1725399

11. Cohen, J. (2020). Wuhan coronavirus hunter Shi Zhengli speaks out. *Science*, **369**, 487- 488. https://doi.org/10.1126/science.369.6503.487

12. Liu, P., Chen, W., & Chen, J. P. (2019). Viral metagenomics revealed sendai virus and coronavirus infection of malayan pangolins (*Manis javanica*). *Viruses*, **11**(11), 979. https://doi.org/10.3390/v11110979

13. Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020). Sars-CoV-2 envelope and membrane proteins: Structural differences linked to virus characteristics? *Biomed. Res. Int.*, **2020**. https://doi.org/10.1155/2020/4389089

14. Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virol. J.*, **16**, 1- 22. https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0

15. Hu, B., Zeng, L. P., Yang, X. Lou, Ge, X. Y., Zhang, W., Li, B., … Shi, Z. L. (2017). Discovery of

a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.*, **13**, 1- 27. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698

16. Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). Bat coronaviruses in China. *Viruses*, **11**(3), 210-. https://doi.org/10.3390/v11030210

17. Ge, X. Y., Li, J. L., Yang, X. Lou, Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., … Shi, Z. L. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, **503**, 535- 538. https://doi.org/10.1038/nature12711

18. Graham, R. L., & Baric, R. S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.*, **84**, 3134- 3146. https://doi.org/10.1128/jvi.01394-09

19. Menachery, V. D., Yount, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., … Baric, R. S. (2015). A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.*, **21**, 1508- 1513. https://doi.org/10.1038/nm.3985

20. Johnson, B. A., Graham, R. L., & Menachery, V. D. (2018). Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology*, **517**, 30- 37. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.009

21. Racaniello, V. (2016). Moving beyond metagenomics to find the next pandemic virus. *PNAS*, **113**, 2812- 2814. https://doi.org/10.1073/pnas.1601512113.

22. Weiss, S., Yitzhaki, S., & Shapira, S. C. (2015). Lessons to be learned from recent biosafety incidents in the United States. *Isr. Med. Assoc. J.*, **17**, 269- 273. https://doi.org/10.1073/pnas.1601512113

23. Casadevall, A., & Imperiale, M. J. (2014). Risks and benefits of gain-of-function experiments with pathogens of pandemic potential, such as influenza virus: A call for a science-based discussion. *MBio*, **5**, 1- 5. https://doi.org/10.1128/mBio.01730-14

24. Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., Sheahan, T. P., Lu, X., … Denison, M. R. (2018). Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *MBio*, **9**, 1- 15. https://doi.org/10.1128/mBio.00221-18

25. Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., … Lu, L. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.*, **30**, 343- 355. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x

26. Totura, A. L., & Bavari, S. (2019). Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, **14**, 397- 412. https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1581171

27. Wang, Y., Sun, Y., Wu, A., Xu, S., Pan, R., Zeng, C., … Guo, D. (2015). Coronavirus nsp10/nsp16 Methyltransferase can be targeted by nsp10-derived peptide in vitro and in vivo to reduce replication and pathogenesis. *J. Virol.*, **89**, 8416- 8427. https://doi.org/10.1128/jvi.00948-15

28. Kuo, L., Godeke, G. J., Raamsman, M. J. B., Masters, P. S., & Rottier, P. J. M. (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: Crossing the host cell species barrier. *J. Virol.*, **74**, 1393- 1406. https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1393-1406.2000

29. Maier, H. J., Bickerton, E., & Britton, P. (2015). *Coronaviruses – Methods and protocols*. London: Humana Press.

30. Becker, M. M., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Rockx, B., Sims, A. C., Sheahan, T.,

… Denison, M. R. (2008). Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *PNAS*, **105**, 19944- 19949. https://doi.org/10.1073/pnas.0808116105

31. Menachery, V. D., Yount, B. L., Sims, A. C., Debbink, K., Agnihothram, S. S., Gralinski, L. E., … Baric, R. S. (2016). SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *PNAS*, **113**, 3048- 3053. https://doi.org/10.1073/pnas.1517719113
32. Li, X., Zai, J., Zhao, Q., Nie, Q., Li, Y., Foley, B. T., & Chaillon, A. (2020). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, **92**, 602- 611. https://doi.org/10.1002/jmv.25731
33. Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., … Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, **583**, 282- 285. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0
34. Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., … Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, **583**, 286- 289. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x
35. Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr. Biol.*, **30**, 1346- 1351.E2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022
36. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin- like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antivir. Res.*, **176**, 104742. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742
37. Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, **5**, 562- 569. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y
38. Wang, Q., Qiu, Y., Li, J. Y., Zhou, Z. J., Liao, C. H., & Ge, X. Y. (2020). A unique protease cleavage site predicted in the spike protein of the novel pneumonia coronavirus (2019-nCoV) potentially related to viral transmissibility. *Virol. Sin.*, **35**, 337- 339. https://doi.org/10.1007/s12250-020-00212-7
39. Lau, S., Wang, P., Mok, B. W., Zhang, A. J., Chu, H., Lee, A. C., … Chen, H. (2020). Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1 / S2 junction. *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 837- 842. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756700
40. Hoffmann, M., & Kleine-Weber, H. (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell.*, **78**, 779- 784.E5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022
41. Kaundun, S. S., Marchegiani, E., Hutchings, S. J., & Baker, K. (2019). Derived polymorphic amplified cleaved sequence (dPACS): A novel PCR-RFLP procedure for detecting known single nucleotide and deletion – insertion polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(13), 3193. https://doi.org/10.3390/ijms20133193
42. Zeng, L. P., Gao, Y. T., Ge, X. Y., Zhang, Q., Peng, C., Yang, X. L., … Shi, Z. L. (2016). Bat severe acute respiratory syndrome-like coronavirus WIV1 encodes an extra accessory protein, ORFX, involved in modulation. *J. Virol.*, **90**, 6573- 6582. https://doi.org/10.1128/JVI.03079-15
43. Khan, S. G., Muniz-Medina, V., Shahlavi, T., Baker, C. C., Inui, H., Ueda, T., … Kraemer, K. H. (2002). The human XPC DNA repair gene: Arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing

and function. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3624- 3631. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134237/.

44. Liu, Z., Zheng, H., Lin, H., Li, M., Yuan, R., Peng, J., … Lu, J. (2020). Identification of common deletions in the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Virol.*, **94**, e00790- 20. https://doi.org/10.1128/JVI.00790-20

45. Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., … Shi, W. (2020). A Novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.*, **30**, 2196- 2203.E3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023

46. Steinhauer, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, **258**, 1- 20. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716

47. Seyran, M., Pizzol, D., Adadi, P., El-Aziz, T. M. A., Hassan, S. S., Soares, A., … Brufsky, A. M. (2020). Questions concerning the proximal origin of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, 03. https://doi.org/10.1002/jmv.26478

48. Wang, L. F., & Anderson, D. E. (2019). Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr. Opin. Virol.*, **34**, 79- 89. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007

49. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.*, **94**(7), 1- 9. https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20

50. Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 181- 192. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9

51. Fraguas Bringas, C., & Booth, D. (2020). Identification of a SARS-like bat coronavirus that shares structural features with the spike glycoprotein receptor-binding domain of SARS-CoV-2. *Access Microbiol.*, 10- 17. https://doi.org/10.1099/acmi.0.000166

52. Mallapati, S. (2020). Why does the coronavirus spread so easily between people? *Nature*, **579**, 183. https://www.nature.com/articles/d41586-020-00660-x

53. Almazán, F., Sola, I., Zuñiga, S., Marquez-Jurado, S., Morales, L., Becares, M., & Enjuanes, L. (2014). Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.*, **189**, 262- 270. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.026

54. Cheng, J., Zhao, Y., Xu, G., Zhang, K., Jia, W., Sun, Y., … Zhang, G. (2019). The S2 subunit of QX-type infectious bronchitis coronavirus spike protein is an essential determinant of neurotropism. *Viruses*, **11**(10), 972. https://doi.org/10.3390/v11100972

55. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., … McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, **367**, 1260- 1263. https://doi.org/10.1126/science.abb2507

56. Du, L., Tai, W., Yang, Y., Zhao, G., Zhu, Q., Sun, S., … Li, F. (2016). Introduction of neutralizing immunogenicity index to the rational design of MERS coronavirus subunit vaccines. *Nat. Commun.*, **7**, 1- 9. https://doi.org/10.1038/ncomms13473

57. Wahl, A., De, C., Abad Fernandez, M., Lenarcic, E. M., Xu, Y., Cockrell, A. S., … Garcia, J. V. (2019). Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1163- 1173. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0225-9

58. Hu, D., Zhu, C., Ai, L., He, T., Wang, Y., Ye, F., … Wang, C. (2018). Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg. Microbes Infect.*, **7**, 1- 10. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0155-5

59. Hron, T., Farkašová, H., Gifford, R. J., Benda, P., Hulva, P., Görföl, T., … Elleder, D. (2018). Remnants of an ancient deltaretrovirus in the genomes of horseshoe bats (Rhinolophidae). *Viruses*, **10**(4), 185-. https://doi.org/10.3390/v10040185

60. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., … Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, **581**, 221- 224. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y

61. Wertheim, J. O. (2010). The re-emergence of H1N1 influenza virus in 1977: A cautionary tale for estimating divergence times using biologically unrealistic sampling dates. *PLoS ONE*, **5**, 2- 5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011184

62. Cyranoski, D. (2019). Chinese institutes investigate pathogen outbreaks in lab workers. *Nature*, https://www.nature.com/articles/d41586-019-03863-z

63. Lim, P. L., Kurup, A., Gopalakrishna, G., Chan, K. P., Wong, C. W., & Leo, Y. S. (2004). Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1740- 1745. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032565

64. Cyranoski D. (2017). Inside the Chinese lab poised to study world's most dangerous pathogens. *Nature*, **542**, 399- 401 https://doi.org/10.1038/nature.2017.21487

65. Totura, A., Livingston, V., Frick, O., Dyer, D., Nichols, D., & Nalca, A. (2020). Small particle aerosol exposure of African Green Monkeys to MERS-CoV as a model for highly pathogenic coronavirus infection. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**. https://doi.org/10.3201/eid2612.201664

66. Calisher, C., Carroll, D., Colwell, R., Corley, R. B., Daszak, P., Drosten, C., … Turner, M. (2019). Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combatting COVID-19. *The Lancet*, **395**, E42- E43. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30418-9

67. Cyranoski, D. (2020). The biggest mystery: What it will take to trace the coronavirus source. *Nature*, https://doi.org/10.1038/d41586-020-01541-z

68. Thao, T. T. N., Labroussaa, F., Ebert, N., V'kovski, P., Stalder, H., Portmann, J., … Thiel, V. (2020). Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*, **582**, 561- 565. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9