

## DAI TOPI ALLE SCIMMIE, GLI ANIMALI STUDIATI PER LE RISPOSTE AL CORONAVIRUS

Approfondimento COVID 19

1. Jon Cohen

Science 17 aprile 2020:

Vol. 368, Edizione 6488, pagg. 221-222

[DOI: 10.1126/science.368.6488.221](https://doi.org/10.1126/science.368.6488.221)



**Il servizio d'informazioni di Science sul COVID-19 è supportato dal Pulitzer Center.**

Amati come animali domestici, i criceti siriani stanno conquistando un altro tipo di attenzione da parte degli scienziati, che cercano di capire e sconfiggere il COVID-19.

Quindici anni fa, gli scienziati hanno scoperto che i criceti potevano essere facilmente infettati dal coronavirus, che causa una grave sindrome respiratoria acuta (SARS).

I loro sintomi erano tenui; quindi, gli animali non hanno ricevuto molta attenzione, come modelli per la malattia.

Ma, col COVID-19, causato da un virus correlato, il SARS-CoV-2, le prospettive del modello sembrano più ampie.

Quando il medico scienziato Jasper Fuk-Woo Chan dell'Università di Hong Kong (HKU) e i suoi colleghi hanno recentemente infettato otto criceti, gli animali hanno perduto peso, sono diventati letargici e hanno sviluppato una pelliccia arruffata, una postura curva e un respiro corto.

Alti livelli di SARS-CoV-2 sono stati riscontrati nei polmoni e nell'intestino dei criceti, tessuti tempestati di 'obiettivi' del virus, un recettore proteico chiamato enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2).

Questi risultati «assomigliano molto alle manifestazioni dell'infezione del tratto respiratorio superiore e inferiore nell'uomo», hanno riportato Chan e co-autori in un articolo del 26 marzo, sulla rivista *Clinical Infectious Diseases*.

Questa squadra è solo una delle dozzine di gruppi che operano per sviluppare modelli animali, che possano aiutare a trovare vaccini e trattamenti efficaci contro il COVID-19, e chiarire con precisione come il SARS-CoV-2 causi la malattia.

Le squadre sono spesso a corto di personale, a causa della quarantena per la pandemia, ma stanno collaborando intensamente.

Ogni giovedì, l'Organizzazione Mondiale della sanità organizza una videoconferenza con circa 100 scienziati, regolatori e finanziatori, che lavorano collettivamente con un serraglio di animali da laboratorio, tra cui topi, furetti e diverse specie di scimmie.

«Molti dei tradizionali silos di informazioni stanno davvero calando», afferma il copresidente del gruppo, William Dowling, che lavora allo sviluppo di vaccini alla *Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*.

Il gruppo scambia i dati e i suggerimenti più recenti, come l'efficacia delle diverse vie di infezione e i luoghi più probabili per trovare l'agente patogeno negli animali. «Ognuno di noi è in corsa per ottenere un modello animale fedele alla condizione umana e riproducibile», afferma Chad Roy del *Tulane National Primate Research Center*.

Uno studio sulle scimmie ha già prodotto risultati incoraggianti, suggerendo che l'infezione produce quanto meno un'immunità di breve durata. Ma una vasta gamma di specie può essere una risorsa.

«Hai bisogno del modello giusto, per la domanda giusta», afferma Vincent Munster della sezione *Rocky Mountain Laboratories* dell'Istituto Nazionale Americano delle Allergie e Malattie Infettive, il cui team si concentra sulle scimmie.

Costui mette in guardia dallo scartare un modello animale, semplicemente perché il SARS-CoV-2 produce un effetto, come la morte per un'infezione cerebrale, che non riflette la tipica malattia nell'uomo.

«Questo è un grosso malinteso», dice costui, osservando che «gli umani non hanno nemmeno una coda.»

Una delle massime priorità è quella di testare i vaccini sperimentali immunizzando gli animali e, poi, 'attaccandoli' con il virus; tali esperimenti devono essere condotti nei laboratori di livello 3 di bio-sicurezza.

I modelli animali potrebbero anche mettere in guardia dai pericoli di vaccini e farmaci contro il COVID-19; alcuni vaccini sperimentali contro il correlato virus SARS, ad esempio, hanno innescato anticorpi che hanno aumentato la gravità della malattia, quando gli animali da test sono stati sollecitati.

Inoltre, gli esperimenti con animali possono spiegare perché i bambini sviluppano raramente i sintomi, quanto facilmente il SARS-CoV-2 si trasmette attraverso sottili particelle aerosolizzate e se i fattori genetici dell'ospite rendono alcune persone più suscettibili alle gravi malattie.

I topi - facili da maneggiare e da allevare - sono stati a lungo il pilastro della bio-medicina, e un buon modello di topo sarebbe un vantaggio, nella ricerca per il COVID-19. Ma i topi sono insensibili all'infezione da SARS-CoV-2, perché l'ACE2 del topo presenta differenze-chiave, rispetto a quello umano.

«È divertente come il virus possa avere effetti così devastanti nell'uomo, ma puoi somministrare al topo un milione di particelle, e questo rimarrà inerte», afferma Timothy Sheahan, che sta sviluppando modelli COVID-19 di topo all'Università della Carolina del Nord (UNC), Chapel Hill.

Chan, in collaborazione col microbiologo della HKU Kwok-Yung Yuen e altri, ha individuato il problema facendo un confronto tra specie della regione di ACE2 a cui il SARS-CoV-2 si lega inizialmente.

Nel topo, 11 dei 29 amminoacidi di questo dominio differivano dalla versione umana.

I ratti avevano 13 differenze, ma i criceti ne avevano solo quattro.

Un modo per aggirare il posto di blocco è quello di 'progettare' topi che esprimono le versioni del gene del recettore, ACE2, sia del topo che dell'uomo. Nel 2007, Stanley Perlman, dell'Università dell'Iowa, fece proprio questo, per studiare la SARS.

Sebbene il coronavirus della SARS possa infettare i topi attraverso il loro ACE2, essi sviluppano solo sintomi lievi.

Equipaggiati con l'ACE2 umano, i topi soccombono a una malattia cerebrale letale.

Questo modello ha aiutato a valutare potenziali vaccini e trattamenti per la SARS, e ha anche rilevato l'impatto delle diverse risposte immunitarie.

Ma la domanda per gli animali modificati è diminuita, dopo che l'epidemia di SARS si è placata nel 2003, e Perlman ha consegnato questi al Jackson Laboratory (JAX), un imponente fornitore *nonprofit* di topi.

Questo istituto congelò lo sperma degli animali e, sin da quando emerse il SARS-CoV-2, tornò ad allevare nuovamente i topi. «Sinora, abbiamo ricevuto oltre 1.000 richieste», afferma Nadia Rosenthal, direttrice scientifica dello JAX.

Un team cinese, che ha anche progettato topi che esprimano la proteina umana ACE2 per studiare la SARS, ha tenuto alcuni degli animali transgenici e li ha già infettati col SARS-CoV-2. Essi hanno perduto peso e hanno mostrato segni di polmonite, ma poco altro, secondo quanto riferito da Qin Chuan del Peking Medical Union College e colleghi, in una pre stampa pubblicata su *bioRxiv* il 28 febbraio. «Si tratta di una malattia molto, molto lieve», afferma Perlman.

Perlman sta aspettando che lo JAX fornisca i topi modificati ma, come misura di ripiego, ha ricucito il gene umano per l'ACE2 in un adenovirus, che ha usato per infettare i topi, in modo che alcune delle loro cellule polmonari formassero il recettore.

In caso di infezione da SARS-CoV-2, i topi hanno perso il 20% del loro peso - più del doppio, rispetto a quanto riscontrato dal team di Qin - ma nessuno di loro è morto.

Per creare quello che Rosenthal definisce un modello di topo più "autentico", i ricercatori dello JAX stanno utilizzando l'editor del genoma CRISPR per modificare la sequenza del mouse nativo ACE2, in modo che la proteina codificata sia riconosciuta dal virus. Sheahan, in collaborazione con Ralph Baric dell'UNC, sta invece adattando il virus al topo, modificando geneticamente le sue proteine di superficie, in modo che esso possa infettare i topi inalterati.

Altri ricercatori del SARS-CoV-2 si stanno rivolgendo ai ratti. Questi, rispetto ai topi, non sono più sensibili al COVID-19, ma la loro dimensione maggiore rappresenta un vantaggio.

«Spesso, vorresti procedere a sanguinamenti ripetuti, in un esperimento, e non puoi farlo con i topi», afferma Prem Premsrirut della *Mirimus*, una società che sta collaborando con un gruppo accademico per progettare un modello di ratto, alterandone il recettore ACE2.

Gli studi sui vaccini, ad esempio, valutano spesso in che modo le diverse dosi influenzino la risposta anticorpale, per diversi giorni. Premsrirut osserva che anche «la maggior parte degli studi tossicologici» sui farmaci inizia sui ratti.

«Se riesci a studiare un farmaco direttamente sui ratti, sei sulla buona strada.»

I furetti sono un pilastro della ricerca sull'influenza, un'altra malattia respiratoria, perché il virus dell'influenza non solo li infetta, ma produce sintomi simili a quelli della malattia umana. I furetti infetti addirittura starnutiscono, diffondendo prontamente l'influenza nell'aria. Tuttavia, gli animali potrebbero non rivelarsi un modello fedele per il COVID-19. Il virus li infetta e causa un aumento della temperatura corporea, hanno riferito online Young Ki Choi della *Chungbuk National University* e i suoi colleghi, il 6 aprile, su *Cell Host & Microbe*. Ma ciò non si è replicato ad alti livelli, e i furetti non hanno sviluppato altri sintomi.

Il team ha trovato prove per cui i furetti potrebbero imitare un aspetto del COVID-19: la trasmissione respiratoria.

Gli animali che costoro hanno infettato non solo hanno diffuso il SARS-CoV-2 ai compagni di gabbia, ma anche a due dei sei furetti nelle gabbie adiacenti. Sebbene i ricercatori sospettino che il SARS-CoV-2 si trasmetta principalmente attraverso goccioline respiratorie relativamente grandi, che cadono rapidamente sulle superfici, questa scoperta suggerisce che anche le particelle più sottili, in grado di fluttuare nell'aria per periodi più lunghi e su distanze più lunghe, possono trasportare virus infettivi.

«L'infezione da aerosol non è così efficiente come il contatto diretto, ma è possibile», conclude il coautore Jae Jung dell'Università della California del Sud.

Gli animali che probabilmente hanno il maggior peso, nel valutare potenziali farmaci e vaccini, sono le scimmie.

Sebbene esse siano dispendiose e difficili da gestire, la loro stretta relazione genetica con l'uomo le rende spesso i 'custodi del cancello' per gli studi clinici su farmaci e vaccini.

«Questo sarà il nostro modello quasi clinico, a cui affidarsi con decisione», afferma Roy.

Gli sforzi intensi per infettare quattro diverse specie di scimmie col SARS-CoV-2 sono iniziati poco dopo l'isolamento del virus dalle persone. «Non c'è stata una specie emergente, che possa portarmi a dire che è così», dice Roy, che sta testando i macachi africani verdi e quelli *rhesus*, e ha esaminato attentamente i dati dell'infezione delle scimmie *cynomolgus* e le bertucce.

In uno studio olandese su otto scimmie *cynomolgus*, infettate con SARS-CoV-2, le quattro più vecchie hanno sviluppato livelli più alti di virus nei tamponi del naso e della gola, rispetto alle più giovani.

Nessuna di loro ha sviluppato una malattia sintomatica, ma le autopsie hanno riscontrato danni ai polmoni in due animali su quattro.

«Questo sembra ciò che si riscontra nei casi lievi degli esseri umani», afferma Bart Haagmans dell'*Erasmus University Medical Center*, il cui team ha pubblicato i suoi dati il 17 marzo su *bioRxiv*.

Gli studi sulle scimmie hanno iniziato anche a fare indagini sulla protezione immunitaria.

Due scimmie *rhesus*, guarite dall'infezione da SARS-CoV-2 al *Peking Union Medical College*, erano resistenti alla re-infezione, 4 settimane dopo.

Questa scoperta è una buona notizia, in quanto suggerisce che sia le infezioni naturali che l'immunità innescata dal vaccino forniranno, almeno, una protezione successiva.

Come i furetti, le scimmie vengono utilizzate per affrontare il controverso problema di quanti rischi le persone affrontino dalla trasmissione via aerosol del SARS-CoV-2, che potrebbe indirizzare i dibattiti sul valore delle mascherine facciali fatte in casa.

Roy e, separatamente, Douglas Reed presso l'Università di Pittsburgh, stanno organizzando esperimenti con camere d'aria, che tentano di infettare le scimmie attraverso questo percorso.

Gli esseri umani con gravi sofferenze per COVID-19 hanno spesso patologie di base, come l'ipertensione o il diabete, e Roy afferma che i ricercatori potrebbero dover trovare - o creare - scimmie con queste comorbilità, per sviluppare il modello più indicativo.

Probabilmente, l'elenco dei modelli animali crescerà rapidamente. Ad esempio, uno studio pubblicato online l'8 aprile da *Science* ha riferito che il virus può infettare i gatti. Le autopsie hanno mostrato che l'infezione ha portato a lesioni 'gravi' nei loro passaggi nasali, nella trachea e nei polmoni.

Dave O'Connor, dell'Università del Wisconsin, Madison, che sta studiando il SARS-CoV-2 nelle scimmie *cynomolgus*, afferma che il campo alla fine selezionerà i modelli.

«Potrebbe risultare che alcuni modelli non valgano davvero la pena di essere perseguiti, dopo aver svolto questo tipo di lavoro di base; ma non credo che ci siamo ancora. Dobbiamo lasciare che i dati ci guidino».



## FROM MICE TO MONKEYS, ANIMALS STUDIED FOR CORONAVIRUS ANSWERS

In Depth COVID 19

1. Jon Cohen

Science 17 aprile 2020:

Vol. 368, Edizione 6488, pagg. 221-222

DOI: [10.1126/science.368.6488.221](https://doi.org/10.1126/science.368.6488.221)



### Science's COVID-19 coverage is supported by the Pulitzer Center.

Beloved as pets, Syrian hamsters are winning another kind of attention from scientists trying to understand and defeat COVID-19. Fifteen years ago, scientists found the hamsters could readily be infected with the coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS). Their symptoms were subtle, so the animals didn't get much traction as a model for the disease. But with COVID-19, caused by a related virus, SARS-CoV-2, the model's prospects appear brighter.

When physician scientist Jasper Fuk-Woo Chan of the University of Hong Kong (HKU) and co-workers recently infected eight hamsters, the animals lost weight, became lethargic, and developed ruffled fur, a hunched posture, and rapid breathing. High levels of SARS-CoV-2 were found in the hamsters' lungs and intestines, tissues studded with the virus' target, a protein receptor called angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). These findings "closely resemble the manifestations of upper and lower respiratory tract infection in humans," Chan and co-authors wrote in a 26 March paper in *Clinical Infectious Diseases*.

That team is but one of dozens of groups racing to develop animal models that can help find effective COVID-19 vaccines and treatments and clarify precisely how SARS-CoV-2 causes disease. The teams are often shorthanded because of the pandemic's shelter-in-place restrictions, but they are collaborating intensively. Each Thursday, the World Health Organization arranges a video conference of nearly 100 scientists, regulators, and funders who are collectively working with a menagerie of lab animals, including mice, ferrets, and several species of monkeys. "A lot of the traditional silos of information are really coming down," says the group's co-chair, William Dowling, who works on vaccine development at the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations.

The group swaps the latest data and tips, such as the efficiency of different infection routes and the most likely places to find the pathogen in animals. "Everybody has been thrown into a rush to get an animal model that's faithful to the human condition and reproducible," says Chad Roy of the Tulane National Primate Research Center.

One monkey study has already delivered an encouraging result, suggesting that infection produces at least short-lived immunity. But a wide range of species may be an asset. "You need the right model for the right question," says Vincent Munster of the Rocky Mountain Laboratories branch of the U.S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, whose team focuses on monkeys. He cautions against dismissing an animal model simply because SARS-CoV-2 produces an effect, such as death from a brain infection, that doesn't reflect typical disease in humans. "That's a big misunderstanding," he says, noting that "humans don't have a tail, either."

A top priority is to test experimental vaccines by immunizing animals and then “challenging” them with the virus—experiments that must be done in biosafety level 3 labs. Animal models could also warn of dangers of COVID-19 vaccines and drugs; some experimental vaccines against the related SARS virus, for example, triggered antibodies that enhanced disease severity when test animals were challenged. Furthermore, experiments with animals may explain why children rarely develop symptoms, how readily SARS-CoV-2 transmits through fine aerosolized particles, and whether host genetic factors make some people more susceptible to severe disease.

Mice - easy to handle and breed - have long been the mainstay of biomedicine, and a good mouse model would be a boon for COVID-19 research. But mice shrug off infection with SARS-CoV-2, because the mouse ACE2 has key differences from the human one. “It’s funny how the virus can have such devastation in humans, and then you can give a million particles to a mouse and it’s inert,” says Timothy Sheahan, who is developing mouse COVID-19 models at the University of North Carolina (UNC), Chapel Hill.

Chan, working with HKU’s microbiologist Kwok-Yung Yuen and others, pinpointed the problem by doing a cross-species comparison of the region of ACE2 to which SARS-CoV-2 first attaches. In the mouse, 11 of 29 amino acids of this domain differed from the human version. (Rats had 13 differences, but hamsters only had four.)

One way around the roadblock is to engineer mice that express both the mouse and the human versions of the receptor’s gene, *ACE2*. In 2007, Stanley Perlman of the University of Iowa did just that to study SARS. Although the SARS coronavirus can infect mice through their ACE2, they only develop mild symptoms. Equipped with the human ACE2, mice succumb to a lethal brain disease. This model helped evaluate potential SARS vaccines and treatments, and also teased out the impact of different immune responses.

But demand for the modified animals dwindled after the SARS outbreak subsided in 2003, and Perlman gave them to Jackson Laboratory (JAX), the mammoth nonprofit mouse supplier. It froze the animals’ sperm, and since SARS-CoV-2 surfaced, has raced to breed the mouse again. “We’ve had over 1000 requests at this point,” says Nadia Rosenthal, JAX’s scientific director.

A Chinese team that also engineered mice to express the human ACE2 protein to study SARS kept some of the transgenic animals and has already infected them with SARS-CoV-2. They lost weight and showed signs of pneumonia but little else, Qin Chuan of Peking Medical Union College and colleagues reported in a preprint published on bioRxiv 28 February. “That’s really very, very, very mild disease,” Perlman says.

Perlman is waiting for JAX to supply the modified mice, but as a stopgap measure he stitched the human gene for ACE2 into an adenovirus, which he used to infect mice so that some of their lung cells made the receptor. When infected with SARS-CoV-2, the mice lost 20% of their weight - more than twice what Qin’s team saw - but none died.

To create what Rosenthal calls a more “authentic” mouse model, researchers at JAX are using the genome editor CRISPR to change the sequence of the native mouse ACE2 so that the encoded protein is recognized by the virus. Sheahan, in collaboration with UNC’s Ralph Baric, is instead tailoring the virus to the mouse, genetically tweaking its surface protein so that it can infect unaltered mice.

Other SARS-CoV-2 researchers are turning to rats. They are no more susceptible to COVID-19 than mice, but their larger size is an advantage.

“You often want to do repetitive bleeding in an experiment, and you can’t do that with mice,” says Prem Premssirut of Mirimus, a company that is collaborating with an academic group to engineer a rat model by altering its ACE2 receptor. Vaccine studies, for example, often assess how different doses affect antibody responses over several days. Premssirut notes that “most toxicology studies” of drugs also start in rats. “If you can study a drug directly in rats, you’re a step ahead.”

Ferrets are a mainstay of research on another respiratory disease, influenza, because the flu virus not only infects them, but produces symptoms that mimic the human disease. Infected ferrets even sneeze, readily spreading flu through the air. The animals may not prove as faithful a model for COVID-19, however. The virus does infect them and causes increases in body temperature, Young Ki Choi of Chungbuk National University and colleagues reported online on 6 April in *Cell Host & Microbe*. But it did not replicate to high levels and the ferrets didn’t develop other symptoms.

The team did find evidence that ferrets might mimic one aspect of COVID-19: respiratory transmission. The animals they infected not only spread SARS-CoV-2 to cage mates, but to two of six ferrets in adjoining cages. Although researchers suspect SARS-CoV-2 primarily transmits through relatively large respiratory droplets that quickly fall to surfaces, this finding suggests finer particles, able to drift in the air for longer periods and over longer distances, can also carry infectious virus. “Aerosol infection is not as highly efficient as direct contact, but it’s possible,” concludes co-author Jae Jung of the University of Southern California.

The animals likely to carry the most weight in assessing potential drugs and vaccines are monkeys. Although they are expensive and difficult to handle, their close genetic relationship to humans often makes monkeys the gate keeper to clinical trials of drugs and vaccines. “This is going to be our near clinical model that we’re going to rest heavily on,” Roy says. Intense efforts to infect four different monkey species with SARS-CoV-2 began shortly after the isolation of the virus from people. “There’s not been an emergent species that leads me to say, ‘Oh wow, this is it,’” says Roy, who is testing African greens and rhesus macaques, and has looked closely at infection data from cynomolgus monkeys. (Marmosets are also being examined.)

In a Dutch study of eight cynomolgus monkeys inoculated with SARS-CoV-2, the four oldest ones developed higher levels of the virus in nose and throat swabs than younger animals. None developed symptomatic disease, but autopsies found some lung damage in two of four animals. “This looks like what you see in mild cases of humans,” says Bart Haagmans from Erasmus University Medical Center, whose team published its data on 17 March on bioRxiv.

Monkey studies have also begun to explore questions about immune protection. Two rhesus monkeys that recovered from being infected with SARS-CoV-2 at Peking Union Medical College were resistant to reinfection 4 weeks later. The finding provides a hint of good news, as it suggests both natural infections and vaccine-triggered immunity will provide at least some subsequent protection.

Like ferrets, monkeys are being used to address the controversial issue of how much risk people face from aerosol transmission of SARS-CoV-2, which could inform debates about the value of homemade face masks. Roy and, separately, Douglas Reed at the University of Pittsburgh are staging experiments in air chambers that attempt to infect monkeys through this route. Humans who suffer from severe COVID-19 often have underlying diseases, such as hypertension or diabetes, and Roy says researchers may have to find or create monkeys with these comorbidities to develop the most meaningful model.

The list of animal models likely will grow rapidly. A study published online on 8 April by *Science*, for example, reported that the virus can infect cats. Autopsies showed the infection led to “massive” lesions in their nasal passages, trachea, and lungs.

Dave O’Connor of the University of Wisconsin, Madison, who is studying SARS-CoV-2 in cynomolgus monkeys, says the field will ultimately winnow down models. “It might turn out that some models are not really worth pursuing after we do this sort of foundational work, but I just don’t think we’re there yet. We need to let the data guide us.”