

*35° Incontro GEEFSM
Cofrentes -Muela de Cortes, Valencia - España
1-4 giugno 2017*

Virus emergenti nei chirotteri: identificazione di coronavirus e paramyxovirus in Italia Nord Occidentale

Autori: Rizzo F.¹, Bertolotti L.², Robetto S.¹, Rosati S.², Toffoli R.³, Calvini M.³, Culasso P.³, Kurth A.⁴, Lander A.⁴, Zoppi S.¹, Dondo A.¹, Orusa R.¹, Mandola M.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IT)

² Sezione Malattie Infettive, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino (IT)

³Associazione Chirospheira (IT)

⁴ ZBS5, Robert Koch Institute, Berlino (D)



INTRODUZIONE (1)

Negli ultimi 15 anni il ruolo dei pipistrelli nel mantenimento e trasmissione di agenti virali emergenti, altamente virulenti e a potenziale zoonosico, quali Hendra, Nipah, SARS e Ebola è stato ampiamente dimostrato, mettendo in luce l'inusuale capacità di questi mammiferi di ospitare virus geneticamente molto diversi fra loro, che, spesso, sembrano non rivestire carattere di patogenicità per il chiroterro ospite [1].

Le specie di Chiroterri ad oggi segnalate in Italia sono 35, per lo più insettivore [2], comprensive di specie sedentarie, migratrici su scala regionale e migratrici a lungo raggio (asse NE-SW in Europa). In Piemonte e Liguria risultano segnalate, rispettivamente, 28 e 24 specie.



INTRODUZIONE (2)

Nell'ambito di un progetto di Ricerca Corrente finanziato dal Ministero della Salute (IZSPLV 09/13), è stato realizzato uno studio di sorveglianza attiva e passiva al fine di identificare la eventuale presenza di virus appartenenti alle famiglie Coronavirinae (CoV) e Paramyxovirinae (PMV), comprendenti agenti virali a potenziale impatto zoonosico, nella teriofauna del Piemonte e Liguria.

PROGETTO RICERCA CORRENTE 2013

“Chiroteri e malattie infettive emergenti: indagine conoscitiva preliminare a tutela della salute animale ed umana ”

Responsabile Scientifico: Riccardo Orusa – Ce.R.M.A.S., IZS PLVA, Aosta

Unità operative coinvolte:

1. Centro di Referenza Nazionale per le malattie degli animali selvatici (CeRMAS) IZS PLV
2. S.S.Lab. Specialistico Diagnostica molecolare virologica e ovocoltura IZS PLV
3. S.S. Diagnostica specialistica e rabbia IZS PLV
4. Sezione territoriale di Imperia IZS PLV
5. Centro di Referenza Nazionale per la Rabbia IZSve
6. Reparto virologia IZSLER
7. Associazione CHIROSPHERA

Obiettivi

- definire e caratterizzare gli agenti virali e batterici circolanti nella popolazione di chiroteri del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
- indagare la distribuzione e le correlazioni filogenetiche a livello di specie di chiroterero
 - allestimento di una banca di RNA e DNA da chiroterero

MATERIALI E METODI STRATEGIA DI CAMPIONAMENTO

Disegno dello studio

- **Popolazione target:** specie coloniali stanziali e migratrici del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
- **Periodo:** primavera- estate (periodo di attività)



Monitoraggio attivo

corridoi di volo in
abbeverata/alimentazione

all'ingresso di grotte
in possibili
siti di swarming

Monitoraggio passivo

carcasse in buono
stato di conservazione



- Catture con **mist-net** e **harp-trap** da **professionisti autorizzati**
- Raccolta parametri biometrici e fisiologici e prelievi di tamponi:
 - **Saliva**
 - **Urina**
 - **Feci**



MATERIALI E METODI

Flusso analisi laboratorio

Fase 1
LBS3

Esclusione infezione rabica
LYSSAVIRUS in LBS3

Organi
IFD

Tamponi
Inattivazione
in Buff. Lisi

Fase 2

Estrazione con EZ1 Advanced Instrument
Qiagen

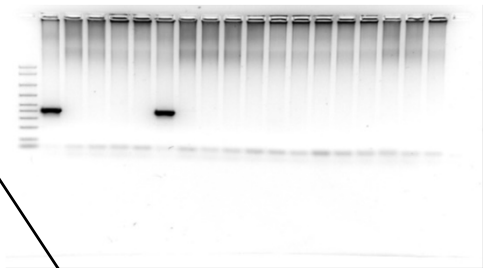


One step RT-PCR, RdRp gene
(Sottofamiglia Coronavirinae)_ Poon, 2005

One step RT-PCR, L gene
(Sottofamiglia Paramyxovirinae)_ Tong, 2008

NEG

POS



Fase 3

Sequenziamento, allineamento,
costruzione di albero filogenetico
bayesiano

ISOLAMENTO su cellule
(VERO, MARK 145 e TB1Lu)
da materiale partenza

Next Generation Sequencing
MiSeq Illumina

Saggi PCR specifici per frammenti genici delle polimerasi virali sono stati utilizzati per identificare i virus appartenenti alle famiglie *Coronavirinae* [3] e *Paramyxovirinae* [4]. Gli ampliconi che in elettroforesi su gel di agarosio dimostravano una banda delle dimensioni attese, sono stati sottoposti a sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state analizzate filogeneticamente, con l'obiettivo di costruire alberi filogenetici utilizzando metodi bayesiani (MrBayes ver. 3.1.2).

RISULTATI (1)

Da giugno 2013 a Settembre 2016 sono stati analizzati 302 animali (35 morti e 267 vivi) appartenenti a 19 specie di chiroterro, nel corso di 49 sessioni di cattura in 30 differenti siti del Piemonte e in tre diversi siti della Liguria (Tabella 1)

Genere	Specie	N° campioni (n° positivi)	pos/tot; prevalenza CoV	pos/tot; prevalenza PMV
Pipistrellus	Pipistrellus kuhlii	56 (4)	2/56; 3.6%	2/56; 3.6%
	Pipistrellus pipistrellus	20 (5)	4/20; 20%	1/20; 5%
	Pipistrellus nathusii	2		
Myotis	Myotis mistacinus	3		
	Myotis bechsteinii	1		
	Myotis brandtii	1		
	Myotis myotis	43 (4)	4/43; 9.3%	
	Myotis nattereri	22 (3)	3/22; 13,6%	
	Myotis daubentonii	24 (2)	2/24; 8.3%	
	Myotis oxygnathus	23 (2)	2/23; 8.7%	
	Myotis emarginatus	29		
Hypsugo	Hypsugo savii	5		
Plecotus	Plecotus auritus	14 (1)	1/14; 7.1%	
	Plecotus austriacus	1		
	Plecotus macrobullaris	1		
	Barbastella barbastellus	17		
Nyctalus	Nyctalus leisleri	1		
Rhinolophus	Rhinolophus hipposideros	1		
	Rhinolophus ferrumequinum	38 (18)	18/38; 47.4%	
	Total	302 (39)	12% [95%CI: 9.6-17]	1% [95%CI: 0.3-3.1]

Tab.1: Elenco specie di chiroterri campionate e prevalenza di infezione.

RISULTATI (2)

- Le analisi biomolecolari sono state realizzate su 35 pools di organi, 123 tamponi orali, 49 urine e 158 feci.
- La matrice rivelatasi più positiva alle analisi in PCR sono state le feci (21%; 33/158) e le urine (12.2%; 6/49). Nessun pool di organi né tampone orale è risultato infetto.
- La presenza di RNA appartenente a CoV e/o PMV è stata rilevata in 38 animali catturati in 11 siti del Piemonte e in uno della Liguria, in otto differenti specie di Chiroterri.
- L'analisi filogenetica, resa possibile per 23 sequenze con caratteristiche qualitative idonee ha portato alla identificazione di 14 alpha-coronavirus, 6 beta-coronavirus e tre paramyxovirus (non classificabili a livello di genere).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Negli ultimi dieci anni, la scoperta in diversi ospiti animali di un crescente numero di virus nuovi e geneticamente distanti tra loro, ha contribuito a moltiplicare la schiera di paramyxovirus , ad oggi in corso di classificazione.

L'identificazione di sequenze virali identiche in animali appartenenti alla stessa specie (i.e. *R. ferrumequinum* e *P. pipistrellus*), ma residenti in colonie diverse, anche geograficamente distanti (90-120 km), conferma la specie-specificità dei CoV, i quali risultano maggiormente associati alla specie ospite piuttosto che alla località geografica [5].

Questo studio rappresenta la prima segnalazione di CoV nelle specie *Plecotus auritus* e *M. oxygnathus*, così come il primo report di PMV in *P. kuhlii*.

I dati provenienti dagli studi di sorveglianza sono fondamentali per definire lo spettro di virus albergati dai chiroteri in Europa e rappresentano la base per una ottimale gestione delle popolazioni di chiroteri e del loro habitat; sono, inoltre, fondamentali per predisporre misure di controllo preventive a tutela della salute pubblica.

Bibliografia

- 1- Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? Wang L.F, Walker P & Poon LLM. (2011). *Curr Opin Virol*, 1: 649–657.
- 2- Linee guida per il monitoraggio dei Chiroterri: indicazioni metodologiche per lo studio e la conservazione dei pipistrelli in Italia. Agnelli P, Martinoli A, Patriarca E, Russo D, Scaravelli D & Genovesi P. (a cura di). (2004). *Quad Cons Natura*, 19, Min. Ambiente – Ist. Naz. Fauna Selvatica.
- 3- Identification of a novel coronavirus in bats. Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris (2005) *J Virol*, 79(4): 2001-2009.
- 4- Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. Tong S, Wang Chern SW, Li Y, Pallansch MA, and Anderson LJ. (2008). *J Clin Microbiol* , 46(8): 2652-2658.
- 5- Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Gottsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Muller M, Pfeffrle S, and Drosten C. (2008). *Emerg Infect Dis* 14: 626-631.

Lavoro svolto nell'ambito della Ricerca Corrente 2013 del Ministero della Salute (IT)

“Chiroterri e malattie infettive emergenti: indagine conoscitiva preliminare a tutela della salute animale ed umana ”

