

Societa' Italiana di Medicina Preventiva

Malattie Emergenti e Riemergenti

Sala Schianchi presso sede ENPAV
Roma, Via Castelfidardo, 41 -
19 e 20 dicembre 2016

“*Virosi emergenti e chiropteri: quali scenari?...*”

Riccardo Orusa

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA
STRUTTURA COMPLESSA VALLE D'AOSTA CON ANNESSO
Ce.R.M.A.S

ZOONOSES and the RISK of DISEASE EMERGENCE

Taylor, L.H. and Woolhouse, M.E.J., U. of Edinburg, U.K.
 Int. Conf. Emerg. Infect. Diseases, Atlanta, GA, USA, July 16-19, 2000

| Infectious Organisms | Human Pathogens (N=1709) | Zoonoses (N=832) | Emerging Pathogens (N=156) |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Viruses/Prions | 507 (30%) | 183 (22%) | 64 (41%) |
| Bacteria/Rickettsia | 541 (32%) | 250 (30%) | 48 (31%) |
| Fungi | 309 (18%) | 83 (10%) | 16 (10%) |
| Helminths | 286 (17%) | 275 (33%) | 9 (6%) |
| Protozoa | 66 (3%) | 41 (5%) | 19 (12%) |

49% of the human pathogens are zoonotic and 9% are emerging pathogens. 73% (114/156) of the emerging pathogens are zoonotic. Overall, zoonotic pathogens are more than 3 times more likely to be associated with emerging diseases than non-zoonotic pathogens.

❑ n° 1709 i patogeni “noti” che colpiscono l'uomo

❑ 49% di essi (832/1709) sono agenti zoonosici

❑ 9% (156/1709) sono patogeni emergenti

❑ 73% (114/156) sono patogeni zoonosici

- Taylor et al. 2001. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**, 983-9
- Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005. Emerg Infect Dis **11**, 1842-7

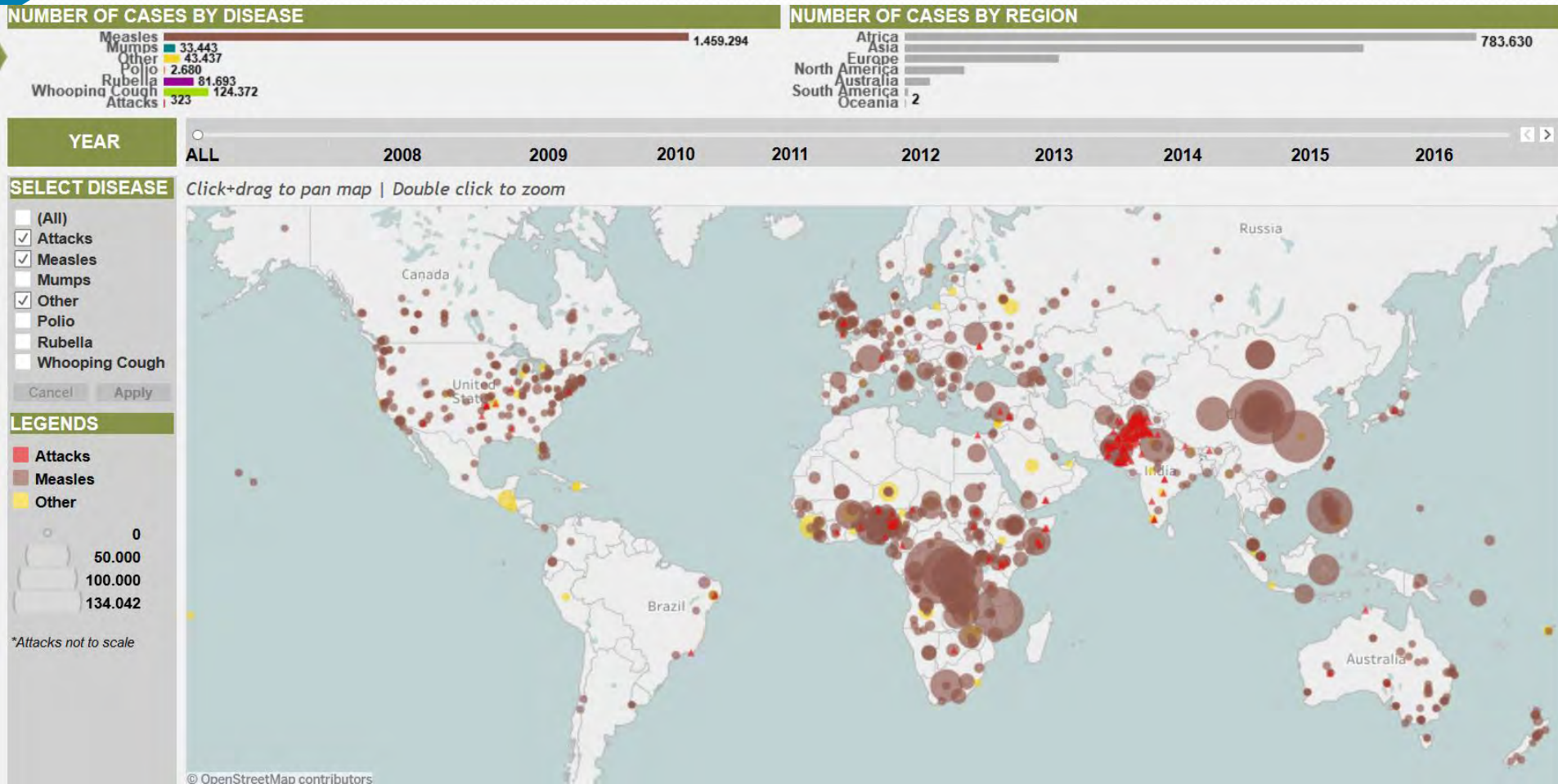
Emerging and Reemerging infections - 70% vector-borne or zoonotic



□ numerosi virus zoonosici emersi in varie aree del pianeta negli ultimi 20 anni sono enzootici nei chiroterri

□ studi recenti mettono in relazione i chiroterri a fenomeni di “spillover”, con trasmissione di virus a potenziale zoonosico (animali selvatici/domestici/....uomo?) (rara la trasmissione diretta!!!)

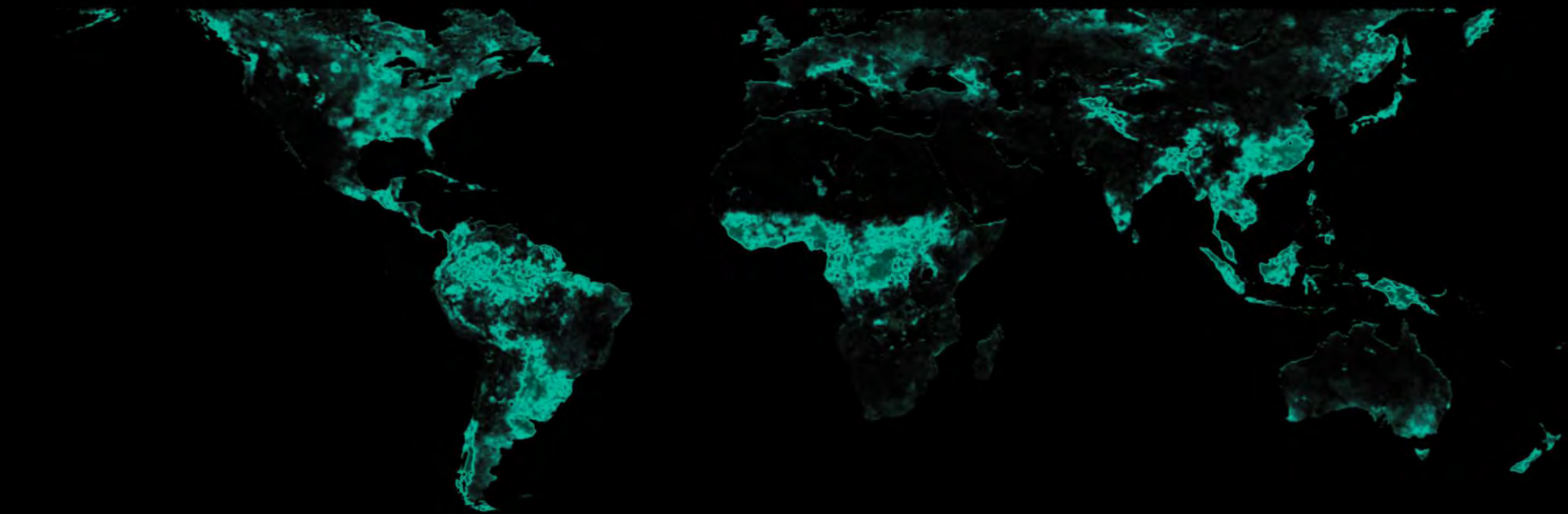
Council on Foreign Relations outbreaks dal 2008 al 2016



Source: http://www.cfr.org/interactives/GH_Vaccine_Map/index.html?cid=nlc_news_release-news_release-link2-20141023&sp_mid=47257856&sp_rid=ZWFuZHJld0BsYWJ4LmNvbOS2#map

By courtesy of: Dott. Tommaso Orusa

Soil moisture layer from NASA Smap, Aqua and Aquarius satellites updated every frame via interpolation (every 15 minutes) distinct data sets are every 3 days from 02 Jun 2014 at 00:00 GMT to 05 Oct 2014 at 00:00 GMT



Source: NASA Hyperwall Scientific Visualization Studio <https://svs.gsfc.nasa.gov/4439>

By courtesy of: Dott. Tommaso Orusa



Trends in Microbiology

Vol 23, issue 3, March 2015, Pages 172-180

Review

Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens

Brook C.E., Dobson A.P.



Viruses 2014,6,3110-3128

European Bats as Carriers of Viruses with Zoonotic Potential

Kohl C, Kurth A.



Science. 2005 Oct 28;310(5748):676-9. Epub 2005 Sep 29.

Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses.

Li W¹, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF.

Ma chi sono realmente i pipistrelli ?

Tanto per cominciare,
sono gli unici mammiferi capaci di volo attivo



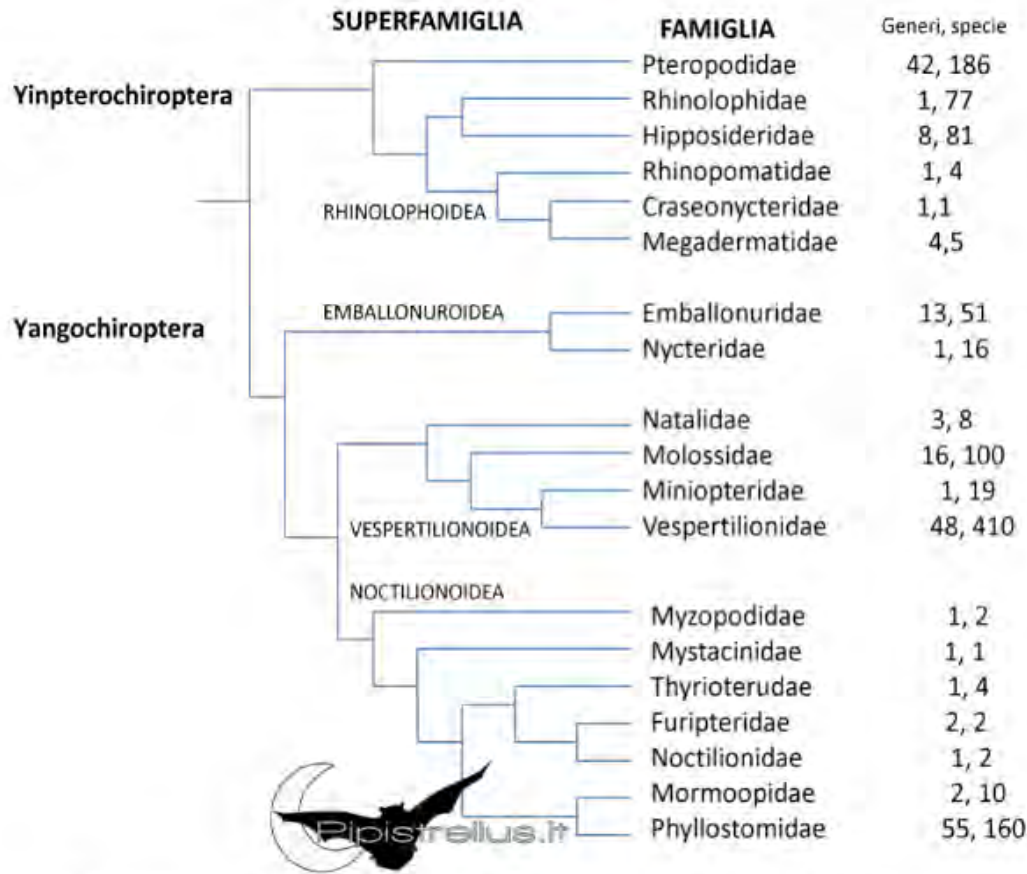
dal greco **Cheiròpteros** → **Cheir** (mano) **Pteròn** (ala)

Classificazione dei chirotteri

| Ordine | Sotto-ordine | Famiglia |
|-------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Chiroptera</i> | | |
| | <i>Megachiroptera</i> | <i>Pteropodidae</i> |
| | <i>Microchiroptera</i> | <i>Vespertilionidae</i> |
| | | <i>Phyllostomidae</i> |
| | | <i>Rhinolophidae</i> |
| | | <i>Hipposideridae</i> |
| | | <i>Molossidae</i> |
| | | <i>Emballonuridae</i> |
| | | <i>Nycteridae</i> |
| | | <i>Mormoopidae</i> |
| | | <i>Megadermatidae</i> |
| | | <i>Natalidae</i> |
| | | <i>Rhinopomatidae</i> |
| | | <i>Thyropteridae</i> |
| | | <i>Mystacinidae</i> |
| | | <i>Furipteridae</i> |
| | | <i>Noctilionidae</i> |
| | | <i>Craseonycteridae</i> |
| | | <i>Myzopodidae</i> |
| | | <i>Myniopteridae</i> |

Oltre 1100 specie al mondo
divise in Megachirotteri e
Microchirotteri

Relazioni evolutive dell'Ordine Chiroptera



Prima e principale classificazione: due sottordini: sottordine Microchiroptera e Megachiroptera (volpi volanti).

Origine monofiletica o difiletica dei due sottordini.

Con ipotesi difiletica:

Megachiropteri → da antenati comuni ai primati

Microchiropteri → da un antenato insettivoro

**Genetica molecolare e analisi anatomica:
→ origine monofiletica dell'ordine
(progenitore insettivoro arboricolo)**

Nuovi dati analisi molecolare:

**→ Microchiropteri = gruppo parafiletico
poiché i rinolofoidi appartengono a un
medesimo clado che include anche i
Megachiropteri**

Cladogramma con le relazioni evolutive dell'ordine Chiroptera. Modificato da Altringham (2011)

Famiglie, Generi e Specie in Italia

| <i>Famiglia (4)</i> | <i>Genere (11)</i> | <i>Specie (34)</i> |
|-------------------------|---------------------|---|
| <i>Rhinolophidae</i> | <i>Rhinolophus</i> | <i>euryle</i> - <i>ferrumequinum</i> - <i>hipposideros</i> - <i>mehelyi</i> |
| <i>Vespertilionidae</i> | <i>Myotis</i> | <i>alcatheae</i> - <i>bechsteinii</i> - <i>blythii</i> - <i>brandtii</i> - <i>capaccinii</i> - <i>daubentonii</i> - <i>emarginatus</i> - <i>myotis</i> - <i>mystacinus</i> - <i>nattererii complex</i> - <i>punicus</i> |
| | <i>Pipistrellus</i> | <i>kuhlii</i> - <i>nathusii</i> - <i>pipistrellus</i> - <i>pygmaeus</i> |
| | <i>Nyctalus</i> | <i>lasiopterus</i> - <i>leisleri</i> - <i>noctula</i> |
| | <i>Hypsugo</i> | <i>savii</i> |
| | <i>Eptesicus</i> | <i>nilssonii</i> - <i>serotinus</i> |
| | <i>Vespertilio</i> | <i>murinus</i> |
| | <i>Barbastella</i> | <i>barbastellus</i> |
| | <i>Plecotus</i> | <i>auritus</i> - <i>austriacus</i> - <i>macrobullaris</i> - <i>sardus</i> - <i>gaisleri</i> |
| <i>Miniopteridae</i> | <i>Miniopterus</i> | <i>schreibersii</i> |
| <i>Molossidae</i> | <i>Tadarida</i> | <i>teniotis</i> |

Famiglie Generi e Specie presenti in Italia

In Italia

**34 le specie individuate,
esclusivamente insettivore,
riunite in 11 generi e
4 famiglie**

Rinolofidi, Vespertilionidi, Miniotteridi, Molossidi

**Tutte le specie comprese sono considerate specie animali d'interesse
comunitario che richiedono una protezione rigorosa
(Direttiva 92/43/CEE)**

i chirotteri specie protette in Europa

L'Italia

una tra le prime nazioni europee a dotarsi di una legislazione in materia di protezione di questi mammiferi (**articolo 38** legge sulla caccia **1016/1939**);

I pipistrelli godono inoltre di grande tutela, specialmente in Europa, con la **convenzione di Bonn sulle specie migratrici (1979)**;

l'accordo sulla conservazione dei Chirotteri (European Bat Agreement) del 1991,
e la cosiddetta **Direttiva Habitat (92/43/CEE)**.

La maggior parte delle specie europee è da considerarsi rara o a rischio di estinzione.

Nei territori di competenza dell'IZS PLV sono segnalate:

- **Piemonte: 28 specie**
- **Liguria: 24 specie**
- **Valle d'Aosta: 17 specie**

Ordine CHIROTTERI

Reservoir di virus zoonosici

CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2006, p. 531–545
0893-8512/06/\$08.00+0 doi:10.1128/CMR.00017-06
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 19, No. 3

Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses

Charles H. Calisher,^{1*} James E. Childs,² Hume E. Field,³ Kathryn V. Holmes,⁴ and Tony Schountz⁵

Le caratteristiche eco-biologiche dei chirotteri

- antichissima origine evolutiva
- caratteristiche immunologiche peculiari
- notevole diversità di specie
- ogni specie ospite può infettarsi con n° agenti virali zoonosici superiore rispetto ai roditori
- altissima densità di popolazione
- lunga aspettativa di vita
- abilità di volo/metabolismo/temperatura
- migrazione/ efficace ecolocalizzazione
- abitudini di nidificazione
- abitudini alimentari varie; predatori e prede
- capacità di torpore e ibernazione

**facilitano il
mantenimento e la
trasmissione di
agenti infettivi**



❑ **antichissima origine evolutiva**

Relazione filogenetica con alcuni gruppi virali;
più antico taxon ospite;
coevoluzione;
presenza di componenti virali endogeni

Lyssavirus
Henipavirus
Hepadnavirus
Hepacivirus
Influenzavirus
Coronavirus

- ❑ **caratteristiche immunologiche peculiari**
presenza di componenti virali endogeni
(riduzione risposta immune → tolleranza immunitaria
sviluppo di infezioni persistenti)

EMERGING INFECTIOUS DISEASES™



Emerg Infect Dis. 2014 May; 20(5): 741–745.

PMCID: PMC4012789

doi: [10.3201/eid2005.130539](https://doi.org/10.3201/eid2005.130539)

Bat Flight and Zoonotic Viruses

[Thomas J. O'Shea](#), [Paul M. Cryan](#), [Andrew A. Cunningham](#), [Anthony R. Fooks](#), [David T.S. Hayman](#), [Angela D. Luis](#), [Alison J. Peel](#), [Raina K. Plowright](#), and [James L.N. Wood](#)

[Author information](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

Eme

Trends in Microbiology



Volume 23, Issue 3, March 2015, Pages 172–180

Review

Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens

[Cara E. Brook](#) , [Andrew P. Dobson](#)

[+ Show more](#)

doi: [10.1016/j.tim.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004)

[Get rights and content](#)

□ notevole diversità di specie

Al mondo ci sono oltre
1100 specie di chirotteri

megachirotteri
186 specie

microchirotteri
930 specie



Disegno di E. Giuliano
www.parchilagomaggiore.it/

□ ogni specie ospite
può infettarsi con numero
agenti virali zoonosici >
rispetto roditori

PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B

BIOLOGICAL SCIENCES

Advanced

[Home](#) [Content](#) [Information for](#) [About us](#) [Sign up](#) [Submit](#)



A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?

Angela D. Luis, David T. S. Hayman, Thomas J. O'Shea, Paul M. Cryan, Amy T. Gilbert, Juliet R. C. Pulliam, James N. Mills, Mary E. Timonin, Craig K. R. Willis, Andrew A. Cunningham, Anthony R. Fooks, Charles E. Rupprecht, James L. N. Wood, Colleen T. Webb

Published 1 February 2013. DOI: 10.1098/rspb.2012.2753

- ❑ **altissima densità di popolazione**
(colonie/densità/contatti intra e inter-specie/rapida diffusione virus)



- ❑ **lunga aspettativa di vita**
(sviluppo infezioni persistenti)



Ordine CHIROTTERI

Reservoir di virus zoonosici



□ **abitudini alimentari**
predatori e prede



☐ **capacità di torpore e ibernazione**



metabolismo
risposta immune
replicazione virale

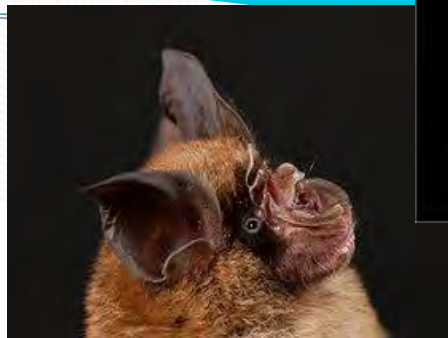
I pipistrelli praticano il risparmio energetico



Tratto da: http://www.centroregionalechiroterri.org/download/proiezione_vda.pdf

Ordine CHIROTTERI

Reservoir di virus zoonosici



Viruses 2014, 6

Schountz et al.

Table 1. High impact viruses and their (suspected) bat reservoir hosts.

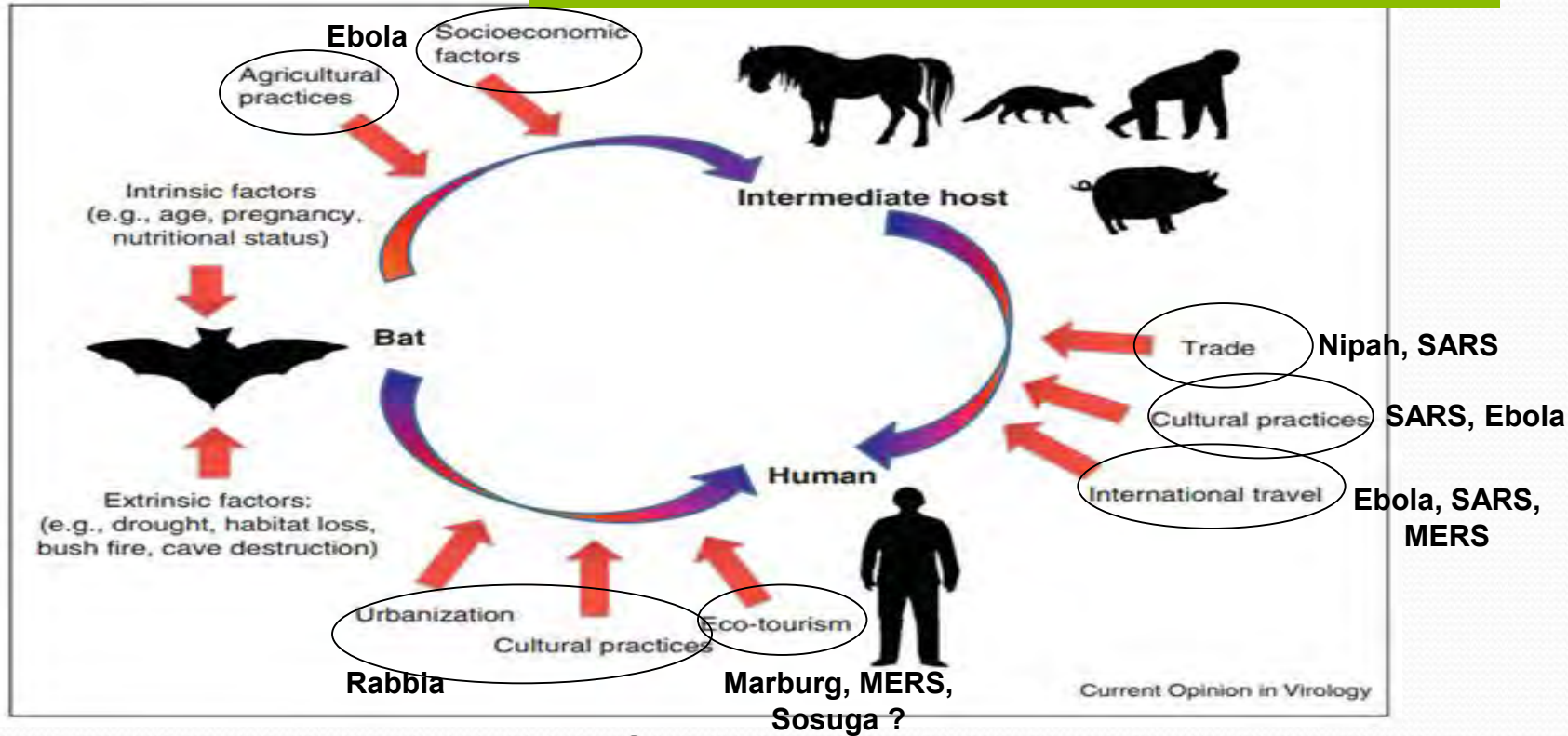
| Virus | Disease | Reservoir Host |
|--|-----------------------------------|--|
| Rabies virus and other lyssaviruses [1,32] | Rabies | Many bat species, world-wide distribution |
| Marburg virus [33] | Marburg virus disease | Egyptian fruit bat (<i>Rousettus aegyptiacus</i>) |
| Ebolaviruses [34] | Ebola virus disease | Hammer-headed bat (<i>Hypsignathus monstrosus</i>), Franquet's epauletted fruit bat (<i>Epomops franqueti</i>), little collared fruit bat (<i>Myonycteris torquata</i>) ¹ |
| SARS-CoV [26] | Severe acute respiratory syndrome | Chinese horseshoe bat (<i>Rhinolophus</i> spp.) ² |
| MERS-CoV [35] | Middle East respiratory syndrome | Egyptian tomb bat (<i>Taphozous perforatus</i>) ² |
| Nipah and Hendra viruses [36,37] | Encephalitis | Certain flying foxes (<i>Pteropus</i> spp.) |
| Sosuga virus [38] | Severe Acute Febrile Disease | <i>Rousettus</i> spp. ¹ |

¹ Suspected reservoirs; ² Nucleotide sequences found with high similarity to SARS or MERS coronaviruses.

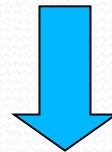
Ordine CHIROTTERI

Reservoir di virus zoonosici

Interaction between bats and humans and the possible causes of spill-over events. Source; Wang and Smith, 2013).



Malattie infettive emergenti



costante evoluzione in risposta ai rapidi cambiamenti delle relazioni tra patogeno e ospite

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 chiroterro
 - allestimento di una banca di RNA e DNA da chiroterro

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

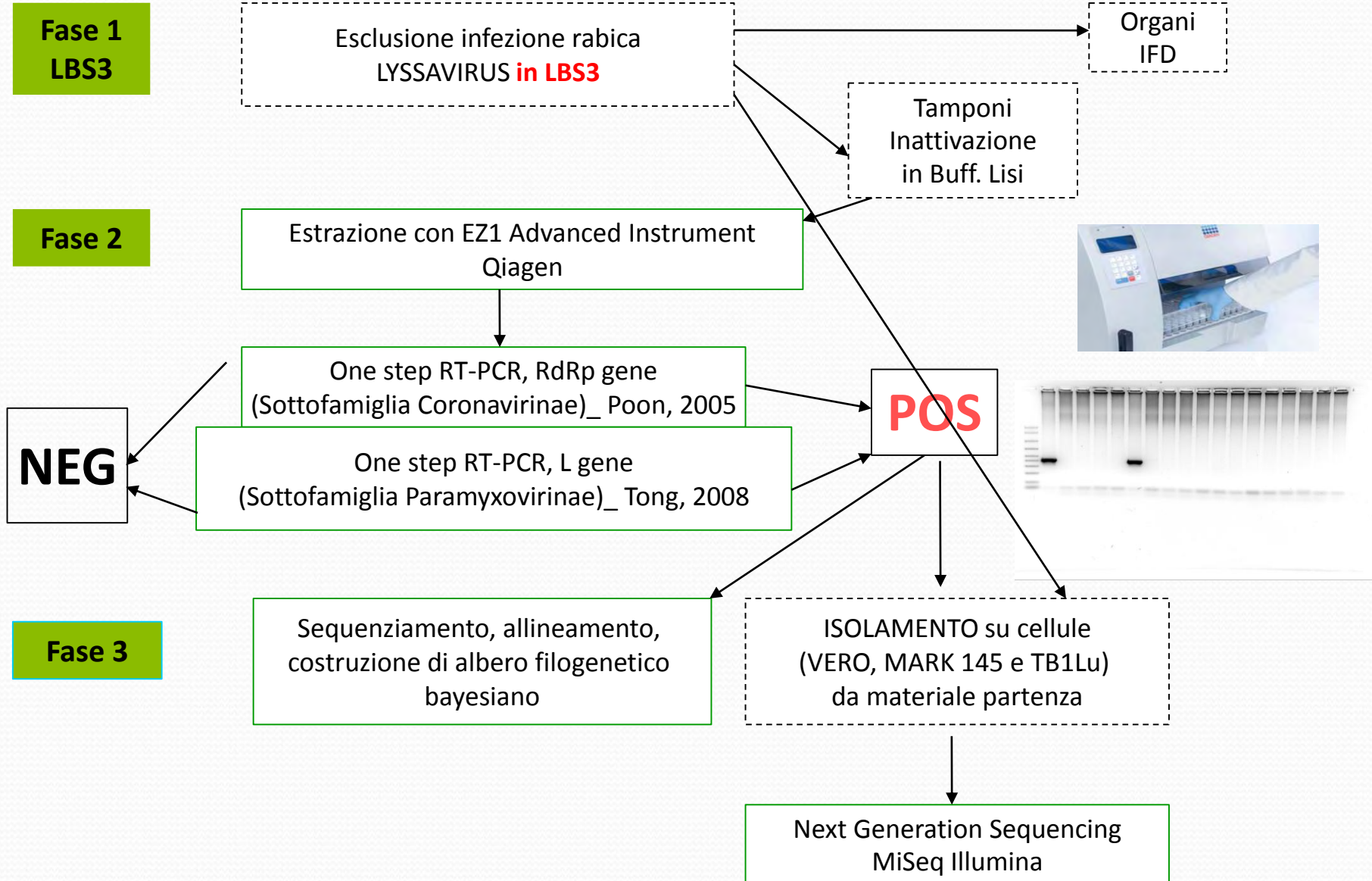
carcasse in buono
stato di conservazione

- 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

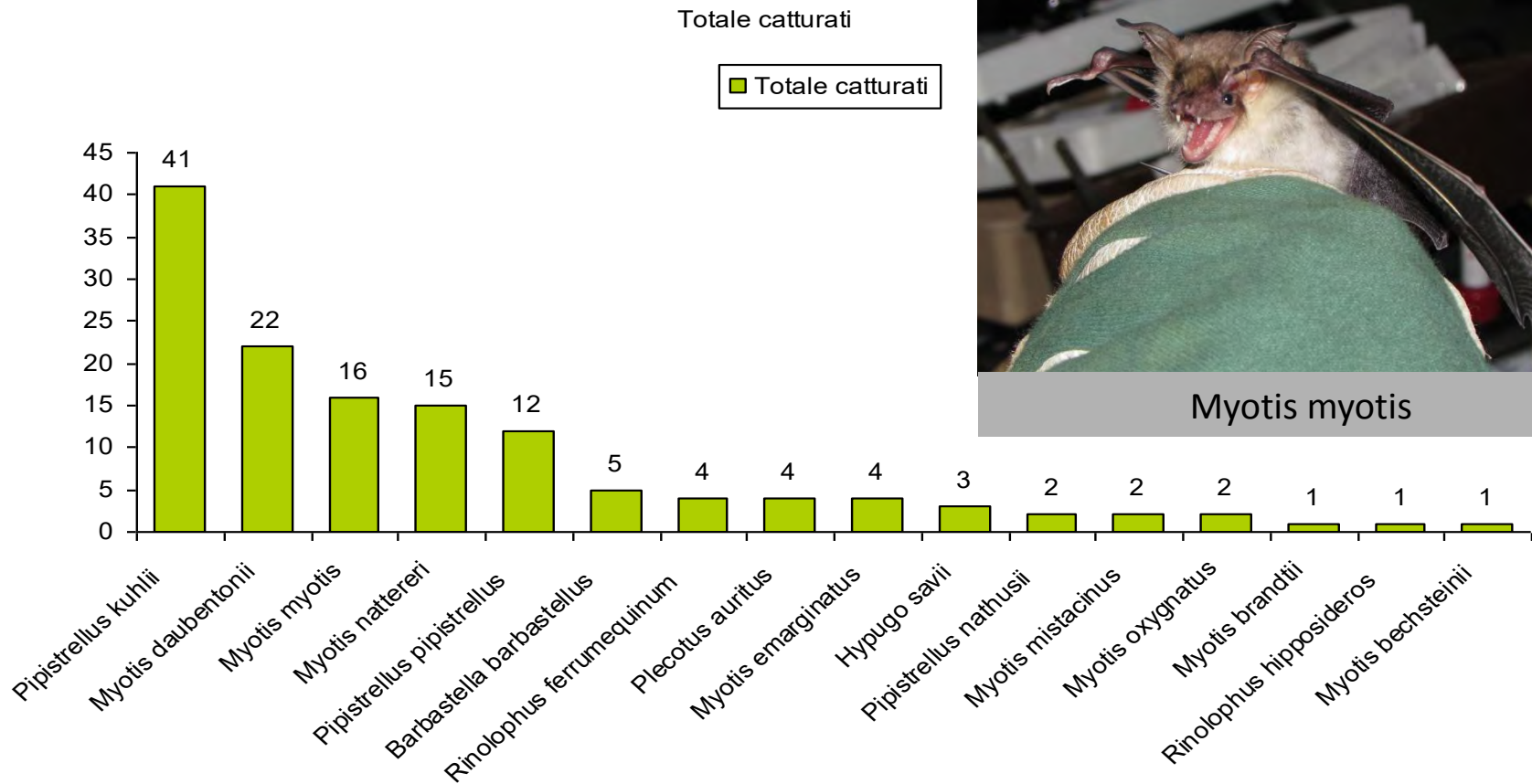
Flusso analisi laboratorio



RISULTATI PRELIMINARI

Catture

- ▶ **21** sessioni di cattura effettuate in **10** diversi siti del Piemonte e Liguria
- ▶ **110** animali vivi e **27** esemplari morti; **16** specie totali
- ▶ Numerosità di cattura per specie
- ▶ 2/137: specie non individuata



RISULTATI PRELIMINARI + RT-PCR CoV

POSITIVI RT-PCR CoV: 12 campioni **9 sequenze**

► 7 feci (23.3%; 7/30) ► 5 urine (17.2%; 5/29)

PREVALENZA per SPECIE

| ID | Matrice | Data | Luogo | Specie |
|------|---------|----------|----------------|----------------------------------|
| 560 | Feci | 31/08/13 | Ormea (CN) | Myotis nattereri |
| 562 | Urina | | | Myotis nattereri |
| 605 | Feci | 19/08/14 | Rodello (CN) | Pipistrellus kuhlii |
| 619 | Urina | 06/08/14 | Tassarolo (AL) | Pipistrellus kuhlii |
| 999 | Urina | | | |
| 1000 | Feci | | | |
| 1013 | Urina | | | |
| 1015 | Urina | 11/08/14 | Baceno (VCO) | Pipistrellus pipistrellus |
| 1016 | Feci | | | |
| 1021 | Feci | | | |
| 1272 | Feci | | | |
| 1274 | Feci | | | |



Myotis nattereri

20% IC95%: 4-48
(3/15)



Pipistrellus kuhlii

4.9% IC95%: 6-16.5
(2/41)



Pipistrellus pipistrellus

33.3% IC95%: 10-65
(4/12)



Myotis daubentonii

9% IC95%: 1-29
(2/22)

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

- ✓ Primo rilievo di alpha CoV in *P. pipistrellus*
- ✓ Primo rilievo di alpha CoV in *M. nattereri* sp. A?
- ✓ Associazione specie specifica CoV - pipistrello?



OBIETTIVI FUTURI

Ampliamento campionamenti

→ Stima prevalenza infezione

→ Ospite-specificità?

Implementazione
metodi biomolecolari

→ Analisi mtDNA chiroterro --> attribuzione di specie

→ Impiego RT-PCR Paramixovirinae → nuove conoscenze

→ Nuovi marker filogenetici → migliore caratterizzazione α CoV

→ NGS su campioni positivi → migliore caratterizzazione α CoV

PRODOTTI DELLA RICERCA

- **9th Annual Meeting of EPIZONE “ Changing viruses in a changing world”-
2-3rd September 2015, Montpellier, France**



Detection of a divergent Alpha Coronavirus in bats in Piedmont (Italy).

Rizzo F., Bertolotti L., Robetto S., Lo Vecchio C., Guidetti C., Zoppi S., Dondo A., Rosati S., Culasso P., Calvini M., Toffoli R., Orusa R., Mandola M.L. (Poster selezionato come breve pres. ORALE)

- **XVI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Montesilvano (PE), 30 Sett.- 2 Ottobre 2015**

Identificazione e caratterizzazione genetica di bat-CoV in chiroterri nel Nord Italia

Lo Vecchio C., Rizzo F., Robetto S. , Guidetti C., Zoppi S., Dondo A., Ballardini M., Mignone W., Bertolotti L., Rosati S., Toffoli R., Orusa R. and Mandola M.L.
(Presentazione ORALE)



- **III Convegno Italiano sui Chiroterri, Trento, 9-11 ottobre 2015**

Individuazione di Alphacoronavirus nella chiroterrofauna nord-occidentale: risultati preliminari.

Rizzo F., Robetto S. , Guidetti C., Lo Vecchio C., Zoppi S., Dondo A., Ballardini M., Mignone W., Bertolotti L., Rosati S., Calvini M., Toffoli R., Orusa R., Mandola M.L.
(Presentazione ORALE)



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

**CeRMAS (Centro di Referenza Nazionale per le
Malattie degli Animali Selvatici)**

Direttore: Prof. Riccardo Orusa

Regione Amerique 7G -11020 Quart (AO)

Tel +39 0165 238558

Fax +39 0165 236775

E-Mail:

- **riccardo.orusa@izsto.it**
- **cermas.diagnostica@izsto.it**
- **[Sito web: www.izsto.it](http://www.izsto.it)**