



UNIVERSITÀ DI PARMA

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Medicina Molecolare

CICLO XXXVII

*Pipistrelli e virus emergenti: indagini eco-epidemiologiche a tutela della salute pubblica e della biodiversità*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Dottorando: Davide Lelli

Anni Accademici 2021/2022 – 2023/2024

# **INDICE**

## **PARTE GENERALE**

1. Introduzione	pag. 2
2. Biologia ed ecologia dei pipistrelli	pag. 3
3. Malattie emergenti e spillover	pag. 4
4. La sorveglianza virologica nei chiroterteri in Italia	pag. 6
5. Obiettivi dello studio	pag. 7
6. Principali virus oggetto dello studio	pag. 8
6.1 Coronavirus	pag. 8
6.2 Orthoreovirus	pag. 9
6.3 Lyssavirus	pag. 10
6.4 Orthonairovirus	pag. 12

## **PARTE SPERIMENTALE**

2. Materiali e metodi	pag. 15
2.1 Campionamento	pag. 15
2.2 Identificazione di specie	pag. 16
2.3 Esame post-mortem	pag. 16
2.4 Analisi virologiche	pag. 16
2.4.1 Preparazione del campione	pag. 16
2.4.2 Isolamento virale	pag. 17
2.4.3 Microscopia elettronica	pag. 17
2.4.4 Test molecolari	pag. 17
2.4.5 Sequenziamento ed analisi delle sequenze genomiche	pag. 19
3. Risultati	
3.1. Campionamento e identificazione di specie	pag. 20
3.2 Esame autoptico	pag. 22
3.3. Analisi virologiche	pag. 23
3.3.1 Coronavirus	pag. 23
3.3.2 Orthoreovirus	pag. 29
3.3.3 Lyssavirus	pag. 33

3.3.4 Orthonairovirus	pag. 33
3.3.5 Adenovirus	pag. 39
<b>4. Discussione</b>	pag. 41
<b>5. Conclusioni</b>	pag. 45
<b>6. Disseminazione dei risultati</b>	pag. 46
<b>7. Bibliografia</b>	pag. 49

# PARTE GENERALE

## 1. Introduzione

Le prime ricerche sui virus dei pipistrelli risalgono agli anni '30, quando Joseph Pawan identificò per la prima volta il virus della rabbia nei pipistrelli ed eseguì infezioni sperimentali in diverse specie (Pawan, 1936). Nei decenni successivi si è assistito ad un lento e graduale incremento del numero di studi sui pipistrelli in ambito di ricerca virologica ed in particolare a partire dal 1994 con l'epidemia causata dal virus Hendra in Australia. Le origini di questa zoonosi, che ha causato la morte di dodici cavalli e sette esseri umani (Murray *et al.*, 1995; Field, 2016), sono rimaste ignote fino a quando non è stata identificata la specie serbatoio di questo nuovo paramyxovirus: i pipistrelli della frutta del genere *Pteropus* (Halpin *et al.*, 2000; Young *et al.*, 1996). Quattro anni dopo l'identificazione del virus Hendra, un virus strettamente correlato, denominato virus Nipah, è emerso inizialmente in Malesia e successivamente in India e Bangladesh. L'ospite serbatoio del virus Nipah è stato identificato nelle volpi volanti (Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002) e la trasmissione dell'infezione è avvenuta inizialmente attraverso il contagio da pipistrello a suino, in seguito da suino a suino e successivamente dal suino all'uomo, con un tasso di mortalità del 70%-90% (Chua *et al.*, 2000; Gurley *et al.*, 2007).

Più recentemente, nel 2003, l'epidemia SARS (sindrome respiratoria acuta grave) ha rappresentato una vera svolta sia per il crescente interesse nei confronti dei coronavirus, ma soprattutto per l'interesse da parte della comunità scientifica e dell'opinione pubblica verso il loro principale serbatoio in natura, i pipistrelli (Wang, 2009). Nel 2008 è stata la volta del coronavirus MERS responsabile della sindrome respiratoria del Medio Oriente in Arabia Saudita e nel 2019 con SARS-Cov-2, responsabile della pandemia COVID-19, l'attenzione ai chiroterti ha raggiunto l'apice.

Oggi i chiroterti sono universalmente riconosciuti come importanti ospiti reservoir di virus emergenti a carattere zoonosico alcuni dei quali sono stati responsabili di gravi epidemie nell'uomo. Ne rappresentano un ulteriore esempio i filovirus Marburg ed Ebola responsabili di epidemie di febbre emorragiche caratterizzate da elevata letalità e contagiosità. I pipistrelli sono ospiti di un'ampia varietà di virus rispetto ad altri ordini di mammiferi che riflette l'elevato numero di specie caratterizzate da una elevata variabilità genetica che la si ritrova di conseguenza anche nei loro virus. Sono infatti ad oggi note un elevato numero di specie e

varianti virali associate ai pipistrelli appartenenti ad almeno 28 diverse famiglie virali (Calisher *et al.*, 2006).

## 2. Biologia ed ecologia dei pipistrelli

L'ordine dei chiroteri (Chiroptera Blumenbach, 1779) è un gruppo molto antico di mammiferi placentati con elevata diversità genetica che conta quasi 1400 specie suddivise in 20 famiglie e distribuite in tutto il mondo, ad eccezione dell'Artico, dell'Antartide e di alcune isole oceaniche (Burgin *et al.*, 2018; Fenton & Simmons, 2015). I pipistrelli appartengono al superordine Laurasiatheria che comprende anche carnivori, ungulati e cetacei e si sono separati dagli altri mammiferi euteri circa 88 milioni di anni fa (Tsagkogeorga *et al.*, 2013; Lei e Dong, 2016).

Le specie di pipistrello presenti in Europa sono 53 (Russo *et al.*, 2016) delle quali le 35 presenti in Italia appartengono alle 4 famiglie *Rinolophidae*, *Vespertilionidae*, *Miniopteridae* e *Molossidae*.

Tradizionalmente il sistema di classificazione divide i pipistrelli in due sottordini: Microchiroptera e Megachiroptera. Il primo è caratterizzato da piccole dimensioni (4–16 cm), dieta prevalentemente insettivora, dall'uso dell'ecolocalizzazione e dal letargo/ibernazione invernale per molte delle specie. Il secondo include specie di dimensioni maggiori (fino a 1,6 kg di peso e 1,7 m di apertura alare) con dieta prevalentemente frugivora (pipistrelli della frutta) e prive della capacità di ecolocalizzare (Baker & Schountz, 2018). Questa classificazione in realtà non riflette una corrispondente divisione nella storia evolutiva delle specie di chiroteri e studi filogenetici hanno più recentemente riclassificato i pipistrelli nei sottordini Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (Teeling *et al.*, 2016). La classificazione tradizionale continua tuttavia ad essere utilizzata per scopi descrittivi.

I pipistrelli sono gli unici mammiferi in grado di volare, sono migratori e questo li rende vettori a lungo raggio di potenziali patogeni. Vivono gregari in colonie molto numerose con migliaia di individui a stretto contatto tra loro ed hanno un sistema immunitario e metabolico complesso e particolare che contribuisce alla loro peculiare resistenza alle malattie virali. Ciò è anche probabilmente riconducibile ad una relazione ancestrale tra pipistrelli e virus che ha portato ad una coevoluzione tra i due creando un equilibrio ospite-virus (Subudhi *et al.*, 2019; O'Shea *et al.*, 2014).

L'adattamento al volo nei pipistrelli sembra essere un fattore cruciale alla base del funzionamento del loro particolare sistema immunitario. La capacità di volare comporta un

tasso metabolico molto elevato con il rilascio di grandi quantità di radicali liberi dell'ossigeno. I pipistrelli hanno probabilmente sviluppato meccanismi per controllare la risposta immunitaria che verrebbe innescata dal DNA danneggiato generato attraverso il volo, portando a una riduzione dell'infiammazione.

E' importante e doveroso infine ricordare che i pipistrelli in Europa sono animali protetti da una specifica normativa comunitaria (EUROBATS) e devono pertanto essere salvaguardati in virtù dell'importante ruolo che rivestono per la salute degli ecosistemi e per il mantenimento della biodiversità e per il fatto che molte specie, secondo IUCN (Unione internazionale per la conservazione della natura), sono considerate vulnerabili o minacciate e le loro popolazioni sono in declino.

### **3. Malattie emergenti e spillover**

Oltre il 60% degli agenti patogeni umani è di origine animale (agenti zoonosici) e di questi oltre il 70% ha origine dalla fauna selvatica (Jones *et al.*, 2008). Le malattie infettive emergenti (EID) sono definite come malattie che hanno subito un incremento nell'incidenza, ampliato la distribuzione geografica o la gamma di ospiti, oppure che sono state scoperte di recente o sono causate da nuovi agenti patogeni (Morse, 1995; Daszak *et al.*, 2000). Le EID rappresentano gravi minacce per la salute pubblica e l'economia globale, ma anche per le specie domestiche e la biodiversità (Jones *et al.*, 2008; Daszak *et al.*, 2000). Tra i patogeni responsabili di malattie emergenti e riemergenti i virus rivestono un ruolo importante. In particolare i virus a RNA sono più inclini a generare mutazioni genetiche durante la replicazione e pertanto hanno un'elevata capacità di adattamento a nuovi ospiti. Spillover, o salto di specie, è definito come il momento in cui un patogeno passa da una specie ospite ad un'altra e molti dei fenomeni di spillover che hanno in seguito generato le epidemie più note sono derivati da virus a RNA come paramyxovirus, coronavirus e filovirus (Jones *et al.*, 2008; Luis *et al.*, 2013). Il salto di specie è quindi un fenomeno favorito da mutazioni ed adattamento genetico dei virus. L'elemento chiave nell'emergere di nuove malattie infettive risiede in un cambiamento nell'ecologia del patogeno, dell'ospite o di entrambi e l'ambiente svolge un importante ruolo di modulazione tra i due (Schrag e Wiener, 1995).

E' stato accennato in precedenza che l'infezione da parte di un agente patogeno virale, raramente è in grado di provocare una malattia clinicamente evidente nei pipistrelli che restano permissivi alla moltiplicazione del virus e alla sua eliminazione attraverso secreti ed

escreti (es: feci, urina, saliva). A questo proposito è importante sottolineare che il passaggio diretto di un patogeno dal pipistrello all'uomo è un evento che accade in realtà di rado e le malattie sono state generalmente mediate da un ospite intermedio permissivo alla replicazione/amplificazione del virus con rapida disseminazione. Gravi epidemie nell'uomo sono state causate da virus geneticamente simili ai virus dei pipistrelli che rappresentano gli ancestor (virus antenati) che si sono adattati ad un ospite intermedio il quale ha poi acquisito la capacità di trasmettere l'infezione all'uomo in maniera autonoma ed indipendente dalla presenza dei pipistrelli (Plowright *et al.*, 2015).

Il crescente interesse nei confronti dei virus dei pipistrelli è proprio legato in larga parte alla comprensione dei meccanismi che regolano il fenomeno del salto di specie o spillover e l'evoluzione genetica dei virus. In questo contesto il fattore umano gioca un ruolo importante nel favorire il fenomeno dello spillover come frutto dell'adattamento di un patogeno ad una nuova specie. Lo stile di vita e l'utilizzo delle risorse ambientali sta impattando sulla natura e gli ecosistemi in maniera rilevante. La crescita esponenziale della popolazione umana, l'aumento delle aree urbanizzate, il riscaldamento globale, la deforestazione e la distruzione degli habitat, la globalizzazione, il commercio (e quindi lo spostamento) di specie domestiche e selvatiche hanno inevitabilmente portato ad una sovrapposizione della sfera antropica con quella degli ecosistemi selvatici, aumentando così le occasioni di contatto tra uomo e patogeni.

Altri fattori importanti sono legati ad aspetti culturali e comportamentali, come il consumo e il commercio di animali selvatici vivi nei mercati, soprattutto in quelle aree del mondo con realtà socio-economiche e igienico-sanitarie precarie (Ruiz-Aravena *et al.*, 2021, Rodriguez-Morales *et al.*, 2019). I mercati di animali vivi si inseriscono in questo contesto in modo rilevante perché sono stati l'epicentro di alcune importanti epidemie negli ultimi anni.

La comunità scientifica attualmente mira a comprendere le dinamiche ecologiche alla base di un evento di spillover e a sviluppare modelli predittivi che descrivano i modelli di insorgenza delle malattie utilizzabili per mitigare, controllare e prevenire nuove emergenze epidemiche. Lo spillover tuttavia è un fenomeno complesso e composito che richiede l'allineamento di una serie di fattori predisponenti e spesso casuali che sono correlati alle caratteristiche del patogeno, del serbatoio, della specie ricevente e dell'ambiente. Le interazioni ospite-patogeno sono spesso difficili da comprendere perché si verificano attraverso processi complessi su larga scala sia nel tempo che nello spazio (Plowright *et al.*, 2008).

La sorveglianza sanitaria nelle popolazioni di chiroteri attraverso la ricerca di virus nelle specie presenti dovrebbe essere implementata in ogni territorio (Moratelli e Calisher, 2015).

#### **4. La sorveglianza virologica nei chiroteri in Italia**

In Italia la sorveglianza virologica nei pipistrelli è una attività recente e relativamente nuova che da subito ha fornito importanti e significative evidenze in merito alla grande eterogeneità dei virus circolanti ad essi associati. Indagini condotte in Nord Italia hanno dimostrato che i pipistrelli insettivori veicolano un'ampia varietà di *Mammalian orthoreovirus* (MRV), inclusi virus riassortanti (Lelli *et al.*, 2015), e numerosi coronavirus (COV) appartenenti ai generi *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* (MERS e SARS-related CoVs) (Balboni *et al.* 2012, Lelli *et al.*, 2013; De Benedictis *et al.*, 2014; 2018; Rizzo *et al.* 2017). La ricerca su adenovirus ha consentito di evidenziare il riemergere di un adenovirus di tipo 2 precedentemente rilevato nei pipistrelli in Germania [JN252129] nel 2007 (Diakoudi *et al.*, 2019) e sporadiche positività per astrovirus (Amoroso *et al.*, 2018). *Vaprio ledantevirus* (VAPV) è un nuovo rhabdovirus appartenente al genere *Ledantevirus* isolato dagli organi di un *Pipistrellus kuhlii* e ufficialmente riconosciuto come nuova specie virale (Lelli *et al.*, 2018). *Hypsugopoxvirus* (HYPV), isolato dai visceri di *Hypsugo savii* rappresenta l'unica segnalazione in Europa di un poxvirus associato ai chiroteri riconducibile anch'esso ad una nuova specie virale con i più elevati valori di identità nucleotidica nei confronti del virus *Eptesipoxvirus* strain Washington isolato da *Eptesicus fuscus* in USA (Lelli *et al.*, 2019). Ulteriori studi confermano inoltre la circolazione nelle popolazioni di chiroteri in Italia di paramyxovirus (Rizzo *et al.*, 2017), e lyssavirus (LYSV), quest'ultima supportata dalla presenza di anticorpi specifici in pipistrelli appartenenti alle specie *Myotis spp.* e *Tadarida teniotis* (Leopardi *et al.*, 2018). A giugno 2020, *West Caucasian Bat Lyssavirus* (WCBV) è stato identificato in un gatto in provincia di Arezzo deceduto a seguito di malattia neurologica dopo aver morso il proprietario ed il veterinario che l'aveva in cura. L'indagine epidemiologica che ne è seguita ha consentito di ricondurre l'origine dell'infezione ai chiroteri, identificando nelle vicinanze dell'area dove risiedeva il gatto, una colonia di pipistrelli della specie *Miniopterus schreibersi* sieropositivi per WCBV (Leopardi *et al.*, 2021).

## 5. Obiettivi dello studio

Questo studio sfrutta le conoscenze, le competenze e i risultati acquisiti nel corso di precedenti indagini sui virus associati ai chiroteri in Italia. I dati ottenuti in precedenza consentono di indirizzare le nuove attività in maniera mirata. Particolare attenzione verrà rivolta alle infezioni sostenute da coronavirus, lyssavirus e orthoreovirus con lo scopo di caratterizzare i virus circolanti ed investigare sulla circolazione e l'ecologia di agenti virali nelle popolazioni di pipistrelli in Italia tramite il potenziamento della sorveglianza passiva. Attraverso l'utilizzo di un protocollo diagnostico ad ampio spettro, la messa a punto di specifiche metodiche diagnostiche e l'utilizzo di tecniche di sequenziamento di nuova generazione verrà inoltre investigata la presenza di possibili nuovi virus potenzialmente zoonotici o patogeni per gli stessi pipistrelli.

I risultati della ricerca risulteranno utili ai fini della valutazione del rischio derivante da eventi di contatto con i pipistrelli e per determinare e mitigare l'impatto per la salute pubblica e animale in caso di emergenze sanitarie fornendo al contempo indicazioni in ambito di conservazione della fauna selvatica e mantenimento della biodiversità. L'attenzione alle specie selvatiche ha infatti acquisito negli anni un'importanza sempre più rilevante ed è oggi imprescindibile per il controllo e la gestione delle malattie infettive. La sorveglianza nei confronti di agenti infettivi nella fauna selvatica (pipistrelli inclusi) è determinante sia per garantire una corretta gestione e conservazione delle specie selvatiche, sia per la tutela della sanità animale e della salute pubblica.

Lo studio consentirà inoltre di potenziare la collaborazione tra virologi, veterinari, ecologi, biologi e specialisti esperti in chiroteri rappresentando un esempio di approccio sinergico multidisciplinare alla previsione di emergenze di interesse pubblico-sanitario in ottica "One Health" (Ryu *et al.*, 2017) e nella sua visione ancor più ampia ed evoluta di "Planetary Health" che allarga il concetto includendo fattori economici, sociali, politici e culturali che sempre più diventano determinanti e vincolanti nella gestione delle problematiche sanitarie.

## 6. Principali virus oggetto dello studio

### 6.1 Coronavirus

I coronavirus (CoV) sono un gruppo di virus a RNA a singolo filamento con polarità positiva caratterizzati da elevata variabilità genetica. La famiglia *Coronaviridae* comprende quattro generi: Alphacoronavirus ( $\alpha$ -CoV) e Betacoronavirus ( $\beta$ -CoV) che causano infezioni in un'ampia gamma di specie di mammiferi compreso l'uomo e Gammacoronavirus ( $\gamma$ -CoV) e Deltacoronavirus ( $\delta$ -CoV) che infettano principalmente gli uccelli (Ruiz-Aravena *et al.*, 2022).

Negli ultimi due decenni sono emersi nuovi coronavirus responsabili di gravi epidemie che hanno causato significative conseguenze sulla salute globale: la sindrome respiratoria acuta grave (SARS, causata da SARS-CoV, 2003), la sindrome respiratoria mediorientale (MERS, causata da MERS-CoV, 2012) e la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19, causata da SARS-CoV-2, 2019) (Guarner, 2020).

La letteratura scientifica riconosce i pipistrelli come gli ospiti ancestrali, nonché i serbatoi evolutivi naturali e driver ecologici della diversità dei coronavirus umani e animali. Le teorie più accreditate indicano che anche SARS-CoV-2 abbia avuto origine dai pipistrelli e sia stato trasmesso agli esseri umani tramite un ospite intermedio (Alanagreh *et al.*, 2020). Quanto appena detto è sostenuto principalmente dal fatto che CoV strettamente correlati circolano nelle popolazioni di pipistrelli in Cina e i virus geneticamente più prossimi a SARS-CoV-2 sono stati ritrovati nei pipistrelli rinolofidi prima della pandemia di COVID-19. Ad oggi, sono stati rilevati più di 200 nuovi coronavirus nei pipistrelli (Banejree *et al.*, 2019) e sono state identificate oltre 4800 sequenze di CoV da 14 famiglie di pipistrelli. Queste rappresentano oltre il 30% di tutte le sequenze di virus da pipistrello disponibili (Ruiz-Aravena *et al.*, 2021).

In Europa virus simili a SARS-CoV sono stati identificati in pipistrelli appartenenti alla famiglia dei *Rhinolophidae* nel Regno Unito, Slovenia, Italia, Lussemburgo, Francia, Spagna e Bulgaria (Kohl *et al.*, 2021). Le analisi filogenetiche hanno dimostrato che i SARS-CoV identificati nei pipistrelli in Europa appartengono ad un cluster distinto rispetto a quelli identificati nei pipistrelli asiatici (Kohl *et al.*, 2021) e non presentano le modifiche a carico delle strutture recettoriali della proteina spike tali da consentire il legame al recettore ACE2 delle cellule umane (Andersen *et al.*, 2020). La trasmissione diretta di CoV dai pipistrelli ad altre specie di mammiferi dipende principalmente dalle strutture recettoriali

delle cellule ospiti e dall'affinità di legame funzionale dei RBD (Receptor Binding Domain) virali. Questo è un aspetto cruciale per caratterizzare il potenziale zoonotico dei CoV dei pipistrelli esistenti (Ruiz-Aravena *et al.*, 2022). In effetti, l'ampia gamma di ospiti di diversi CoV può essere spiegata dall'ampia varietà di strutture recettoriali cellulari conservate in diverse specie animali.

Nonostante alcune condizioni alla base dello spillover dei coronavirus siano state chiarite, ci sono ancora molti aspetti epidemiologici che rimangono incerti. Per quanto sopra esposto, la ricerca ed il monitoraggio dei CoVs circolanti nei pipistrelli e la loro caratterizzazione risulta fondamentale per poter comprendere i meccanismi alla base della trasmissione e prevedere potenziali spillover ad altre specie animali e all'uomo con l'obiettivo di mitigare i potenziali rischi per la salute umana e per la biodiversità.

## 6.2 Orthoreovirus

Gli Orthoreovirus (famiglia *Reoviridae*) sono virus senza envelope con genoma ad RNA segmentato diffusi a tutti i mammiferi e caratterizzati dall'elevata resistenza ambientale (Chappell *et al.*, 2005). Il suffisso REO, dal nome della famiglia virale *Reoviridae*, deriva da "Respiratory Enteric Orphan" in quanto originariamente questi virus venivano frequentemente isolati dal tratto respiratorio ed enterico di bambini asintomatici e si pensava che non fossero quindi associati ad alcuna patologia. Oggi è invece documentato che gli orthoreovirus possono essere causa di malattie respiratorie, enteriche e neurologiche negli animali e nell'uomo ed il loro potenziale zoonosico è stato dimostrato.

La natura segmentata del loro genoma contribuisce a renderli suscettibili a fenomeni di riassortimento con possibilità di generare nuove varianti virali con proprietà biologiche sconosciute (Lelli *et al.*, 2015).

Il genere *Orthoreovirus* include cinque specie virali: *mammalian orthoreovirus (MRV)*, *avian orthoreovirus (ARV)*, *reptilian orthoreovirus (RRV)*, *baboon orthoreovirus (BRV)* e *pteropine orthoreovirus (PRV)*. Sono inoltre classificati in virus fusogenici e non fusigenici sulla base della capacità di indurre la formazione di sincizi cellulari multinucleati sulle colture cellulari (Duncan, 1999). Il genoma virale di natura segmentata è costituito da 10 segmenti genici (L1-3, M1-4, S1-4). Il gene S1 codifica la proteina  $\sigma 1$  che è responsabile dell'interazione del virus con il recettore cellulare, determina le attività di neutralizzazione ed emoagglutinazione e determina il sierotipo virale (Weiner *et al.*, 1977).

Il primo reovirus identificato nei pipistrelli, Nelson Bay Virus (NBV), è stato isolato nel 1968 da una volpe volante (*Pteropus poliocephalus*) in Australia e circa 30 anni dopo un ulteriore

orthoreovirus correlato a NBV (virus Pulau) è stato isolato da *Pteropus hypomelanus* sull'isola di Tioman (Chua *et al.*, 2007). Questi virus appartengono alla specie virale *pteropine orthoreovirus (PRV)*, sono virus fusogenici e sono tipicamente associati ai pipistrelli della frutta presenti nelle aree tropicali e sub tropicali. Più recentemente due nuovi orthoreovirus denominati virus Melaka (MeIV) e virus Kampar, strettamente correlati a NBV e al virus Palau sono stati associati ad episodi di malattia respiratoria acuta nell'uomo in Malesia. Esistono solide prove epidemiologiche a dimostrazione che MeIV sia stato trasmesso da uomo a uomo all'interno della stessa famiglia, sollevando preoccupazioni circa la potenziale insorgenza di una nuova malattia da reovirus negli esseri umani (Chua *et al.*, 2007). Uno studio sierologico retrospettivo sugli isolani di Tioman ha rilevato una sieropositività del 13% per l'orthoreovirus, indicando che le infezioni da ortoreovirus dei pipistrelli negli esseri umani potrebbero essere più frequenti di quanto riportato (Wang *et al.*, 2009).

Per la specie MRV sono noti tre distinti sierotipi e sebbene abbiano un'ampia distribuzione geografica e siano stati rilevati in molte specie di mammiferi domestici e selvatici, nei pipistrelli sono stati identificati solo di recente (Lelli *et al.* 2013; Kohl *et al.* 2012). Il potenziale patogeno e zoonotico della maggior parte dei ceppi MRV recentemente identificati non è noto con certezza. Infezioni da MRV sono state segnalate in numerose specie come pecore, cavalli, topi, cani, maiali ed esseri umani (Tyler, 2001) e si ritiene che sia in grado di attraversare le barriere di specie, favorire lo spillover ed essere un possibile candidato per future emergenze a carattere zoonosico.

### **6.3 Lyssavirus**

I lyssavirus (famiglia *Rhabdoviridae*) sono virus con genoma ad RNA a singolo filamento a polarità negativa che codifica per cinque proteine: nucleoproteina (N), fosfoproteina (P), matrice (M), glicoproteina (G) e polimerasi (L) (Johnson *et al.*, 2010). I lyssavirus sono noti per essere importanti agenti di zoonosi, e causa della rabbia, una grave forma di encefalite fatale (Walker *et al.*, 2018).

La rabbia è una zoonosi che causa decine di migliaia di morti ogni anno, prevalentemente in Asia e Africa. Nonostante la maggior parte dei casi umani sia riconducibile al virus della rabbia classica (RABV) trasmesso dal cane domestico, si considera che le 17 specie appartenenti al genere *Lyssavirus (LYSV)* siano tutte potenzialmente associate a sintomatologia rabida, con letalità vicina al 100%. Ad eccezione di *Mokola lyssavirus* e *Ikoma lyssavirus*, tutte le specie di lyssavirus rabbia-correlati (RRLVs) sono state riscontrate

nei chiroterteri in diverse parti del mondo. Tra queste, 6 specie sono state segnalate in Europa, ossia *European bat 1 lyssavirus* (EBLV-1), *European bat 2 lyssavirus* (EBLV-2), *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV), *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV), e *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV), descritto solo recentemente in Finlandia (Banyard *et al.*, 2014; Nokireki *et al.*, 2018). Tra questi, EBLV-1, EBLV-2 e BBLV sono particolarmente frequenti e diffusi e vengono segnalati quasi esclusivamente in ospiti specifici: *Eptesicus serotinus* ed *E. isabellinus* per EBLV-1, *Myotis daubentonii* e *M. dasycneme* per EBLV-2 e *M. nattereri* per BBLV. Tuttavia, anticorpi specifici sono stati segnalati in molte altre specie di pipistrello, in particolare per EBLV-1, suggerendo un'epidemiologia complessa con uno spettro d'ospite ampio (Pons-Salort *et al.*, 2014).

Nonostante l'ampia diffusione di EBLV-1 e EBLV-2 nei chiroterteri in Europa, questi virus non sono ancora stati identificati in Italia anche se evidenze sierologiche per EBLV-1 in *Myotis myotis*, *M. blythii* e *Tadarida teniotis* (Leopardi *et al.*, 2018), unitamente alla loro presenza negli stati confinanti ne fanno ipotizzare la presenza anche nel nostro paese. Dati recenti dimostrano che la sorveglianza per LYSSV nei chiroterteri e il numero di campioni analizzati è in crescita anche se le specie target di questi virus vengono campionate ed analizzate solo sporadicamente.

Poiché tutti i RRLVs sono potenzialmente in grado di trasmettersi ad altri mammiferi, incluso l'uomo, con esito letale (Fooks, A. R. *et al.*, 2003; Müller, T. *et al.*, 2004; Takumi *et al.*, 2009; Tjørnehøj *et al.*, 2006; Dacheux, L. *et al.*, 2009), è fondamentale che la sorveglianza verso RRLVs venga allargata ai chiroterteri su tutto il territorio. Nel contempo, dovrebbe essere applicato il principio di massima precauzione per la manipolazione dei chiroterteri e la gestione di incidenti relativi a morsi o graffi da parte di questi animali. Sebbene la trasmissione di lyssavirus dai chiroterteri all'uomo sia un evento raro, la rabbia dei pipistrelli rappresenta ancora una minaccia per la salute pubblica e il bestiame in America (Dato *et al.*, 2016).

Il RABV è presente nei carnivori terrestri in tutto il mondo e nei pipistrelli americani e la sua epidemiologia è stata studiata e conosciuta da molto tempo. È interessante notare che il RABV è stato identificato solo nei pipistrelli del Nuovo Mondo, mentre in Europa e in altri paesi del Vecchio Mondo è stato trovato solo nei mammiferi terrestri e mai in nessun pipistrello (Rupprecht *et al.*, 2008). Ad oggi, non esiste una spiegazione per questa particolare distribuzione virale. Un'altra differenza è che i RABV nel Nuovo Mondo sono stati rilevati in almeno 40 diverse specie di pipistrelli, mentre nel Vecchio Mondo i lyssavirus sembrano essere più strettamente correlati a una specie o a un piccolo gruppo di specie. I meccanismi con cui i lyssavirus vengono mantenuti nelle popolazioni di pipistrelli non sono

completamente compresi, ma si sospetta che la capacità di alcune specie di migrare e la condivisione dei siti di rifugio da parte di diverse comunità di pipistrelli svolgano un ruolo importante (Banyard *et al.*, 2014).

La trasmissione del lyssavirus dai pipistrelli ad altri animali, compresi gli esseri umani, è comunque un evento raro. Tuttavia, sono stati segnalati casi di lyssavirus in grado di attraversare le barriere di specie. Un valido esempio è rappresentato da West Caucasian bat Lyssavirus (WCBLV) isolato in Italia, in provincia di Arezzo, nel 2020 in un gatto con sintomi neurologici. L'indagine epidemiologica che ne è seguita ha consentito di identificare nelle vicinanze dell'area dove risiedeva il gatto, una colonia di pipistrelli sieropositivi per questo virus appartenenti alla specie *Miniopterus schreibersi* identificata come fonte dell'infezione (Leopardi *et al.*, 2021). Questo episodio ha evidenziato l'importanza della sorveglianza della circolazione virale dei lyssavirus anche in territori ufficialmente indenni dalla rabbia. Ha inoltre evidenziato come gli animali domestici possano potenzialmente fungere da ospite intermedio tra animali selvatici e ambienti urbani, in particolare i gatti che sono predatori e spesso vivono all'aria aperta. Ancora una volta, ci sono prove che i punti di connessione tra esseri umani e patogeni della fauna selvatica sono più frequenti e inaspettati di quanto si pensasse in precedenza.

#### **6.4 Orthonairovirus**

Gli orthonairovirus (famiglia *Nairoviridae*) sono virus sferici dotati di envelope con un diametro compreso tra 80 e 120 nm. Hanno un genoma ad RNA segmentato a singolo filamento di circa 18,8 Kb di lunghezza costituito da tre segmenti: L (11-14,4 kb) che codifica per la polimerasi virale, M (4,4-6,3 kb) che codifica per le glicoproteine Gn e Gc e S (1,7–2,1 kb) che codifica per la proteina nucleocapsidica (Kuhn *et al.*, 2024).

Il genere orthonairovirus comprende 41 specie virali la maggior parte delle quali sono trasmesse da zecche (tick-borne viruses) che possono infettare gli esseri umani ed altri ospiti vertebrati. Il nome della famiglia e del genere virale deriva dalla Nairobi sheep disease, malattia di notevole importanza veterinaria caratterizzata da gastroenterite emorragica letale nei piccoli ruminanti in Africa e in India. Il virus di maggior rilevanza in sanità pubblica appartenente al genere *Orthonairovirus* è il virus della febbre emorragica Congo Crimea (*Crimean–Congo hemorrhagic fever virus - CCHFV*) che causa febbre emorragica con alti tassi di mortalità. Esistono molti altri membri del genere orthonairovirus che possono essere causa di malattia non letale nell'uomo come il virus *Issyk-Kul (ISKV)* al quale sarà rivolta particolare attenzione nel presente studio essendo stato identificato per la prima volta in Italia

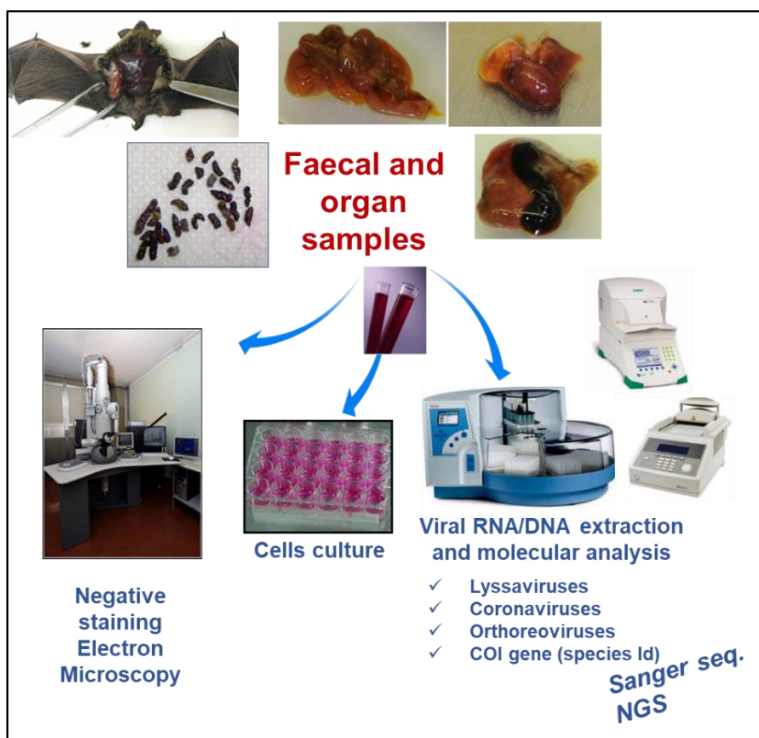
nel 2021 nel corso delle attività di ricerca sui virus dei chiroteri qui presentate. Di seguito vengono riportate le principali informazioni ad oggi conosciute su questo virus.

*ISKV* è stato isolato per la prima volta nel 1970 da un pipistrello della specie *Nyctalus noctula* campionato presso il lago Issyk-Kul, Kirghizistan (L'vov *et al.*, 1973). *ISKV* è stato successivamente rilevato nei paesi vicini dell'Asia centrale (Tagikistan e Kazakistan) in diverse specie di pipistrelli e zecche ed è stato descritto come causa di sporadici focolai di malattia nell'uomo caratterizzati da febbre, mal di testa, mialgia, e nausea con tempi di convalescenza anche di alcune settimane (L'vov *et al.*, 1984; Atkinson *et al.*, 2015). Si presume che i pipistrelli e le zecche siano entrambi serbatoi di *ISKV* con trasmissione all'uomo associata alle punture di zecca ed esposizione a feci e urina di pipistrello. Allo stato attuale si sa ancora poco su questo virus essendoci solo poche segnalazioni risalenti agli anni 70-80 in lingua russa. Recentemente porzioni del genoma di *ISKV* sono state rilevate in Germania in pipistrelli della specie *Eptesicus nilssonii* e in Svezia in *Myotis brandtii* (Brinkmann *et al.*, 2020; Cholletti *et al.*, 2022). Sulla base della letteratura scientifica disponibile, *ISKV* è in grado di infettare diversi ospiti ed è infatti stato rilevato in pipistrelli e zecche appartenenti a specie e generi diversi e nell'uomo. *ISKV* è stato rilevato prevalentemente nelle zecche tipiche dei pipistrelli, sia zecche molli (*Argas vespertilionis*) che zecche dure (*Ixodes vespertilionis*). Queste specie hanno un'ampia distribuzione in Europa e in Asia ma mentre *I. vespertilionis* raramente parassita l'uomo, *A. vespertilionis* è nota per essere una specie più aggressiva e generalista che può attaccare diverse specie incluso l'uomo. Alcuni studi hanno inoltre dimostrato, attraverso infezioni sperimentali, la competenza vettoriale di *Aedes Caspius* e il suo possibile ruolo come vettore di *ISKV* (Bulychev *et al.*, 1979; Kostiukov *et al.*, 1982). *A. caspius* è una delle zanzare più comuni e diffuse in Europa e Medio Oriente. Si rendono necessari studi finalizzati a comprendere l'epidemiologia e l'ecologia di questo virus emergente, a determinarne la presenza e diffusione nelle popolazioni di pipistrelli e chiarirne il potenziale zoonosico.

## PARTE SPERIMENTALE

Di seguito vengono descritte nel dettaglio le attività svolte nell'ambito del progetto relativamente alle fasi del campionamento per quanto concerne l'approvvigionamento e reperimento dei campioni di chiroteri da sottoporre alle analisi, la loro conservazione e processazione. Saranno inoltre descritti i metodi per l'identificazione delle specie di pipistrello basati su tecniche morfologiche e genetiche. Verranno poi dettagliate le metodiche diagnostiche utilizzate per la ricerca ed identificazione degli agenti virali oggetto dello studio. Particolare attenzione sarà rivolta ai virus appartenenti ai generi *Coronavirus*, *Orthoreovirus* e *Lyssavirus*, ma attraverso un protocollo diagnostico ad ampio spettro di sensibilità saranno investigati anche altri generi e specie virali potenzialmente zoonotiche o patogene per gli stessi pipistrelli. Il protocollo si avvale sia di metodiche di virologia classica, come l'isolamento su culture cellulari e la microscopia elettronica, sia tecniche molecolari come PCR (end point e Real time), tecniche di sequenziamento Sanger e di nuova generazione (NGS). Si riporta di seguito una immagine che riassume schematicamente il protocollo diagnostico sviluppato e utilizzato nell'ambito del progetto che verrà descritto nel dettaglio nei paragrafi successivi (fig 1).

Figura 1. Rappresentazione grafica del protocollo diagnostico utilizzato per le indagini virologiche nei chiroteri.



## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Campionamento

Il campionamento costituisce la prima fase del processo analitico, è quindi indispensabile applicare corrette pratiche di raccolta dei campioni biologici al fine di ottenere dal laboratorio risultati tecnicamente validi e affidabili. Condizione indispensabile per una corretta esecuzione e interpretazione delle prove richieste al laboratorio è l' idoneità del campione. Successivamente al prelievo, la corretta conservazione del campione e il suo corretto conferimento rappresentano fasi fondamentali affinché il campione giunto al laboratorio risulti idoneo. Un campione mal conservato durante le fasi di trasporto, prelevato e consegnato in quantità insufficiente, contaminato o privo di informazioni anamnestiche relative alla provenienza non può essere utilizzato ai fini diagnostici.

Al fine di consentire la raccolta di un cospicuo numero di campioni di buona qualità per le analisi virologiche previste, nel periodo oggetto dello studio sono state intensificati i rapporti di collaborazione con i centri di recupero animali selvatici (CRAS) presenti sul territorio delle due regioni Lombardia ed Emilia Romagna, con specialisti nel settore dei chiroterri e veterinari esperti in fauna selvatica. Sono state fornite allo scopo indicazioni utili per il corretto prelievo, conservazione e conferimento dei campioni biologici agli esperti che operano in campo.

In questo studio non è stata eseguita alcuna manipolazione di animali vivi. I campioni sono costituiti da carcasse di pipistrelli deceduti o sottoposti ad eutanasia presso I CRAS o feci prelevati presso colonie note di pipistrelli. I cadaveri sono stati immediatamente congelati dopo il decesso degli animali e conservati in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  in attesa di essere conferiti al Reparto di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Una volta giunti al laboratorio, i campioni sono stati registrati ed immediatamente riposti in congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$  in attesa di essere processati. Prima di effettuare qualsiasi ulteriore analisi, da ogni cadavere è stato prelevato un campione di cervello per essere sottoposto al test molecolare Real time PCR finalizzato all'esclusione di lyssavirus (Gigante *et al.* 2018). Una volta esclusa la possibile infezione da lyssavirus si è proceduto con l'esecuzione dell'esame autoptico per rilevare possibili lesioni e raccogliere campioni per indagini virologiche.

## **2.2. Identificazione di specie**

L'identificazione della specie è stata eseguita in prima battuta presso i CRAS su base morfologica utilizzando specifiche chiavi di identificazione per i chiroteri europei (Dietz, 2004). Per una corretta identificazione delle specie di pipistrello campioni di cervello precedentemente analizzati per escludere la presenza di lyssavirus, sono stati sottoposti ad identificazione su base genetica. La metodica molecolare consiste nell'amplificazione tramite PCR end-point di una regione di 600-700 bp della Citocromo Ossidasi I (COI) utilizzando i primer Forward COIBAT F1 (TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC) e primer Reverse COIBAT R1 (ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA). Per l'identificazione definitiva della specie, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger e i risultati ottenuti sono stati analizzati mediante la piattaforma online BOLD Systems© (Dawnay *et al.*, 2007).

## **2.3 Esame post-mortem**

Le carcasse di pipistrello conferite al laboratorio sono state sottoposte a un esame esterno approfondito per evidenziare eventuali fratture/lussazioni, lesioni cutanee, lacerazioni del patagium e per esaminare gli orifizi esterni (orecchie, occhi, naso, ano e cavità orale). Successivamente si è proceduto ad effettuare l'esame autoptico attraverso l'apertura del torace e dell'addome con esame visivo degli organi in situ per rilevare eventuali cambiamenti di posizione, dimensioni o colore o presenza di eventuali masse anomale. Sono stati quindi prelevati campioni di intestino ed un pool di organi costituito da polmone, cuore, milza e fegato. Eventuali endoparassiti ed ectoparassiti rilevati nel corso dell'esame sono stati raccolti separatamente ed esaminati per l'identificazione ed approfondimenti diagnostici.

## **2.4 Analisi virologiche**

### **2.4.1 Preparazione del campione**

Questa fase, eseguita in cappa a flusso laminare, consiste nella preparazione di omogenati d'organo da sottoporre alle successive analisi. Porzioni di 1 g di intestino e 1 g di pool di organi (cuore, polmoni, fegato e milza) prelevati nel corso dell'esame necroscopico sono stati omogenati in PBS in rapporto peso/volume 1:10 attraverso sistema meccanico manuale con utilizzo di potter o mediante il sistema automatico TissueLyser III Qiagen con biglie di acciaio. Allo stesso modo sono stati preparati gli omogenati dei campioni fecali.

Ogni campione di omogenato così preparato in provette da 15ml è stato sottoposto a chiarificazione tramite centrifugazione a 3750 rpm per 15 minuti. Il surnatante è quindi stato

prelevato e distribuito in 5 aliquote da 1 ml in criotubi da conservare in congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$  e in una provetta eppendorf per la successiva estrazione degli acidi nucleici virali e le analisi molecolari. Il campione di surnatante rimanente è stato utilizzato per l'esame virologico in coltura cellulare previa filtrazione con filtri da  $0,45\ \mu\text{m}$ .

#### **2.4.2 Isolamento virale**

I campioni sono stati inoculati su monostrati cellulari MARC 145 (foetal monkey kidney) e VERO (African green monkey kidney) ed in alcuni casi anche LLCMK-2 (rhesus monkey kidney) e Tb1 Lu (lung, Mexican free-tailed bat, “*Tadarida brasiliensis mexicana*”). Sono tutte linee cellulari continue di rene di primate ad esclusione della linea Tb1 Lu (polmone di pipistrello) caratterizzate da ampio spettro di sensibilità. Sono state utilizzate piastre per colture cellulari a 24 pozzetti incubate per 7 gg a  $37^{\circ}\text{C}$  in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ . I monostrati cellulari inoculati con i campioni in esame sono stati sottoposti ad osservazione giornaliera al microscopio ottico per evidenziare la presenza di eventuali effetti citopatici (ECP). Al termine dei 7 gg, i monostrati cellulari sono stati sottoposti a cicli di congelamento e scongelamento ed il criolisato è stato inoculato in monostrati freschi. In assenza di ECP, sono state effettuate almeno tre sub-colture prima che l'esame fosse considerato negativo.

#### **2.4.3 Microscopia elettronica**

Campioni selezionati di omogenato di organo e feci ed i sovranatanti delle colture cellulari con effetto citopatico (ECP) sono stati analizzati mediante osservazione in Microscopia Elettronica in colorazione negativa (nsEM) previa ultracentrifugazione con Airfuge Backman (Lavazza *et al.*, 1990). Le griglie sono state colorate con NaPT al 2%, pH 6,8, per 1,5 min ed esaminate a  $19.000\text{--}30.000\times$  utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 Spirit (FEI, Eindhoven, NL, Paesi Bassi) funzionante a 85 kV e dotato di una fotocamera digitale Olympus Veleta. La tecnica consente di identificare le caratteristiche morfologiche e di struttura dei virus. Il limite di rilevabilità del metodo è pari a  $10^4$  particelle/ml.

#### **2.4.4 Test molecolari**

L'estrazione degli acidi nucleici nei campioni biologici in esame è stata ottenuta attraverso il sistema di estrazione semiautomatico KingFisher (Thermo Fisher Scientific) che sfrutta il principio delle biglie magnetiche in grado di legare l'acido nucleico per consentire l'allontanamento di molecole contaminanti presenti nel campione che possono alterare o

inibire le successive fasi dell'analisi. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit Indimag Pathogen (Indical) secondo le indicazioni del produttore.

Per il rilevamento di coronavirus è stata utilizzata una nested rt-PCR pan-coronavirus in grado di amplificare un frammento di 440 bp del gene della RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) (Chu *et al.*, 2011) (Tab.1). Per l'identificazione di Mammalian Orthoreovirus (MRV) è stato utilizzato come test di screening una Real time RT-PCR in grado di amplificare una regione del gene L1 altamente conservata che codifica per la  $\lambda$ 3-RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Kohl *et al.*, 2012). I campioni risultati positivi al test di screening sono stati successivamente analizzati con ulteriori metodiche PCR per la tipizzazione e caratterizzazione virale attraverso il sequenziamento degli ampliconi prodotti. Nello specifico è stata utilizzata una metodica RT-PCR che amplifica una regione costante del gene L1 (416 bp) comune ai diversi sierotipi ed una multiplex RT-PCR in grado di amplificare frammenti del gene S1 utile ai fini dell'identificazione del sierotipo coinvolto (Decaro *et al.*, 2005; Lelli *et al.*, 2013) (Tab.1).

Per l'identificazione dei lyssavirus e dei dei lyssavirus rabbia-correlati è stata utilizzata una metodica PCR real-time pan-lyssavirus che amplifica una regione conservata del 3'UTR-gene N di Lyssavirus (Gigante *et al.*, 2018) L'elenco delle metodiche PCR utilizzate nell'ambito del progetto, le principali informazioni e i relativi riferimenti bibliografici sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. Metodiche diagnostiche molecolari utilizzate nello studio per l'identificazione di Coronavirus e Lyssavirus.

Virus target	PCR format	Primer	Sequence (5'→3')	References
Coronavirus	Two-step RT	Chu11-F1	GGKTGGGAYTAYCCKAARTG	Chu <i>et al.</i> , 2011. <i>Journal of Virology</i> 85
		Chu11-R1	TGYTGTSWRCARAAYTCRTG	
	Nested	Chu11-F2	GGTGGGACTATCCTAAGTGTGA	
		Chu11-R2	CCATCATCAGATAGAATCATCAT	
Lyssavirus	Real Time PCR	LN34 F1	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA	Gigante C.M. <i>et al.</i> 2018, <i>PLoS ONE</i> , 13:e0197074.
		LN34 F2	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG	
		LN34 R	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	
		LN34 Probe	FAM-AACACCYCTACAATGGA-BHQ1	

Tabella 2. Metodiche diagnostiche molecolari utilizzate nello studio per l'identificazione e la tipizzazione di Mammalian orthoreovirus.

Virus	PCR format	Primer	Sequence 5' to 3'	Target	MRV specificity	References
		Bat Reo F	CACCATgTCAAgCTgCTCCC			
		Bat Reo R	ACCgCCATgTATgTCCTCCAg			

<b>Mammalian Orthoreovirus (MRV)</b>	Real Time PCR	Bat Reo Probe	6FAMCCCAgTCgCggTCATTACCACTCCg-BBQ-	L1	All types	Kohl <i>et al.</i> , 2012. <i>PLoS ONE</i> 7 (8): e43106
	RT-PCR	L1-rv5F <sup>a</sup>	gCATCCATTgTAAATgACgAGTCTg	L1	All types	Lelli <i>et al.</i> , 2013. <i>Zoonoses Public Health</i> , 60:84-92. Decaro. <i>et al.</i> , 2005. <i>Vet Microbiol</i> , 109:19-27
		L1-rv6R <sup>a</sup>	CTTgAgATTAgCTCTAgCATCTTCTg			
		S1-R1F <sup>b</sup>	ggAgCTCgACACAgCAAATA	S1	Type 1	
		S1-R1R <sup>b</sup>	gATgATTgACCCCTTgTGC			
		S1-R2F <sup>c</sup>	CTCCgTCACggTTAATTTg	S1	Type 2	
		S1-R2R <sup>c</sup>	gATgAgTCgCCAAGTgTgC			
S1-R3F <sup>d</sup>	TgggACAAGTgAgACAaggA	S1	Type 3			
S1-R3R <sup>d</sup>	CTgAAgTCCACRTTTTgWA					

#### 2.4.5 Sequenziamento ed analisi delle sequenze genomiche

Al fine di verificare la specificità degli amplificati PCR ed ottenere la sequenza dei genomi virali identificati, i prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento tramite metodica Sanger.

Il metodo consente di determinare l'ordine delle basi nucleotidiche (adenina, citosina, guanina e timina) che compongono una data sequenza di DNA precedentemente amplificato tramite una reazione di PCR specifica per il target ricercato. Le tre fasi principali che costituiscono il metodo prevedono i) il sequenziamento del prodotto PCR amplificato, ii) l'analisi del prodotto della reazione di sequenza mediante elettroforesi capillare con lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi, iii) l'elaborazione e interpretazione delle sequenze tramite il motore di ricerca di sequenze nucleotidiche BLAST.

Alcuni campioni ritenuti di particolare interesse o per i quali è stato possibile ottenere l'isolamento virale in colture cellulari, sono stati selezionati per essere sottoposti al sequenziamento dell'intero genoma virale tramite approccio di Next generation sequencing (NGS). Allo scopo è stata utilizzata la piattaforma Illumina MiSeq. Nel dettaglio, 100 µl di sovrantante di colture cellulari infette sono stati trattati con 250 unità di Omnicleave endonuclease (Epicentre, Tebu-bio, Milan, Italy) a 37°C per 2 ore. L'RNA virale è stato estratto utilizzando One for all Vet kit (QIAGEN, Milan, Italy). Le librerie di sequenziamento sono state preparate utilizzando TruSeq RNA sample preparation kit v2 (Illumina Inc. San Diego, CA, USA) ed il sequenziamento è stato realizzato su sequenziatore MiSeq Illumina utilizzando MiSeq Reagent Nano Kit v2, 300 cycles (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Le reads sono state assemblate de-novo e/o tramite resequencing con l'applicazione Seqman NGen nel pacchetto Lasergene DNASTAR (v. 11.2.1) (DNASTAR, Madison, WI, USA). Nel corso delle attività del progetto, il protocollo *Illumina NGS platforms* sopra descritto è stato oggetto di modifiche ed aggiornamenti al fine di ottimizzare il protocollo in funzione dei diversi virus target selezionati.

L'analisi filogenetica e gli eventuali ulteriori studi di pressione selettiva, analisi molecolare delle proteine, studi di ricombinazione sono stati eseguiti tramite l'utilizzo di software specifici (MEGA 6.0, RDP4, SimPlot).

### 3. Risultati

#### 3.1 Campionamento ed identificazione di specie

Nel periodo di attività del progetto di dottorato sono stati complessivamente raccolti ed analizzati 702 campioni raccolti nel periodo 2020-2023 appartenenti a 19 differenti specie di pipistrello (*Hypsugo savii*, *Pipistrellus kuhlii*, *Myotis mystacinus*, *Myotis emarginatus*, *Nyctalus leisleri*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Rhinolophus hipposideros*, *Pipistrellus nathusii*, *Eptesicus serotinus*, *Tadarida teniotis*, *Plecotus auritus*, *Barbastella barbastellus*, *Myotis bechsteinii*, *Vespertilio murinus*, *Eptesicus nilssonii*, *Myotis daubentonii*, *Miniopterus schreibersii*, *Plecotus macbullaris*, *Pipistrellus nathusii*) suddivisi in 656 carcasse di soggetti deceduti presso i CRAS delle due regioni Lombardia ed Emilia Romagna e e 46 campioni fecali (Tab. 3). I campioni fecali sono stati campionati esclusivamente presso due colonie riproduttive di *Rhinolophus hipposideros* e sono costituiti da pool di feci raccolte a terra tramite posizionamento di un telo in plastica al di sotto della colonia nelle 24h precedenti il prelievo. Le due specie maggiormente rappresentate sono risultate essere *Pipistrellus kuhlii* (44,4%) e *Hypsugo savii* (37,7%). Il numero e la tipologia dei campioni analizzati e la distribuzione in base al sesso dei pipistrelli campionati è riportata nella figura 2. La distribuzione delle specie di pipistrello campionati nel periodo 2020-2023 è riportata nella figura 3. Inoltre, nel corso della stagione di campionamento 2024 appena conclusa sono stati raccolti e conferiti ad oggi al laboratorio ulteriori 139 campioni (136 carcasse e 3 campioni fecali) per i quali le relative analisi sono attualmente in corso e non saranno oggetto di questo studio.

Tabella. 3: Totale campioni suddivisi per specie, raccolti nel periodo 2020- 2023.

Year	Bat species	Number of animals
2020	<i>Hypsugo savii</i>	98
	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	105
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	1
	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	11
	<i>Myotis daubentonii</i>	8
	<i>Myotis mystacinus</i>	2
	<i>Pipistrellus nathusii</i>	4
	<i>Plecotus auritus</i>	2
	<i>Plecotus macbullaris</i>	1

	<i>Tadarida teniotis</i>	1
	<i>Eptesicus serotinus</i>	2
	<i>Not identified</i>	21
	<b>Totale 2020</b>	<b>256</b>
2021	<i>Hypsugo savii</i>	23
	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	34
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	4
	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	7
	<i>Myotis mystacinus</i>	1
	<i>Myotis crypticus</i>	1
	<i>Plecotus auritus</i>	1
	<i>Pipistrellus nathusii</i>	2
	<i>Eptesicus serotinus</i>	1
	<i>Vespertilio murinus</i>	1
	<i>Not identified</i>	13
	<b>Totale 2021</b>	<b>88</b>
	2022	<i>Hypsugo savii</i>
<i>Pipistrellus kuhlii</i>		81
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>		4
<i>Rhinolophus hipposideros</i>		9
<i>Miniopterus schreibersii</i>		2
<i>Pipistrellus nathusii</i>		3
<i>Myotis daubentonii</i>		2
<i>Eptesicus serotinus</i>		1
<i>Eptesicus nilssonii</i>		1
<i>Nyctalus leisleri</i>		1
<i>Tadarida teniotis</i>		3
<i>Plecotus sp.</i>		1
<i>Not identified</i>		11
<b>Totale 2022</b>		<b>197</b>
2023	<i>Hypsugo savii</i>	66
	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	71
	<i>Myotis mystacinus</i>	1
	<i>Myotis emarginatus</i>	1
	<i>Nyctalus leisleri</i>	1
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	2
	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	3
	<i>Pipistrellus nathusii</i>	2
	<i>Eptesicus serotinus</i>	1
	<i>Tadarida teniotis</i>	2
	<i>Plecotus auritus</i>	1
	<i>Barbastella barbastellus</i>	1
	<i>Myotis bechsteinii</i>	1
	<i>Vespertilio murinus</i>	1
	<i>Not identified</i>	7
<b>Totale 2023</b>	<b>161</b>	
<b>Totale 2020-2023</b>		<b>702</b>

Fig.2: Sorveglianza virologica nei chiroterri in Nord Italia, 2020-2023. Numero e tipologia di campioni analizzati e distribuzione in base al sesso dei pipistrelli campionati.

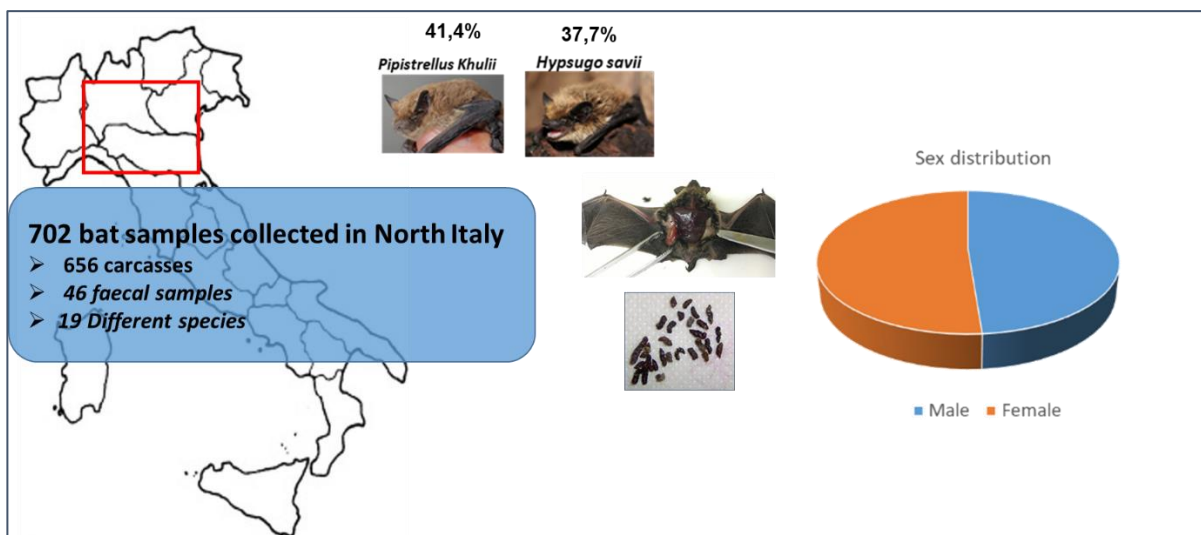
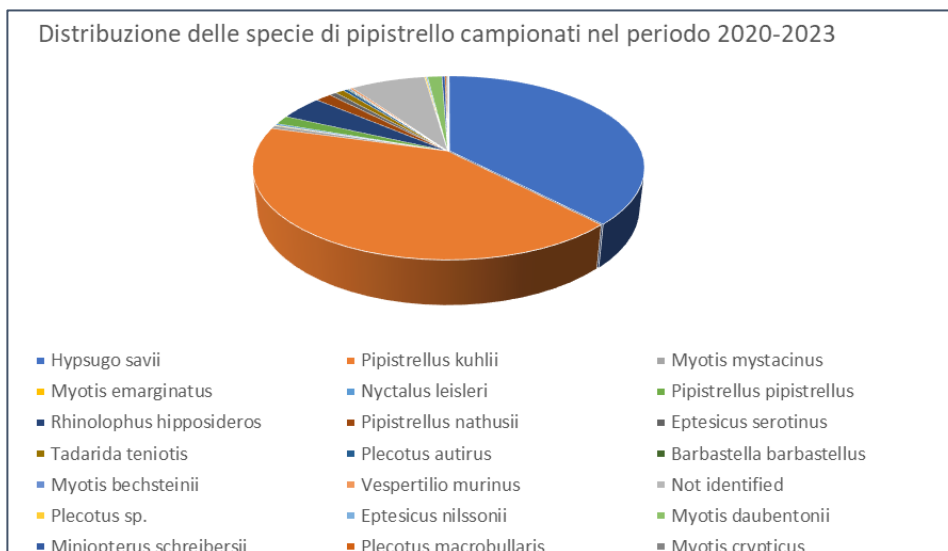


Figura 3: Distribuzione delle specie di pipistrello campionati nel periodo 2020-2023.

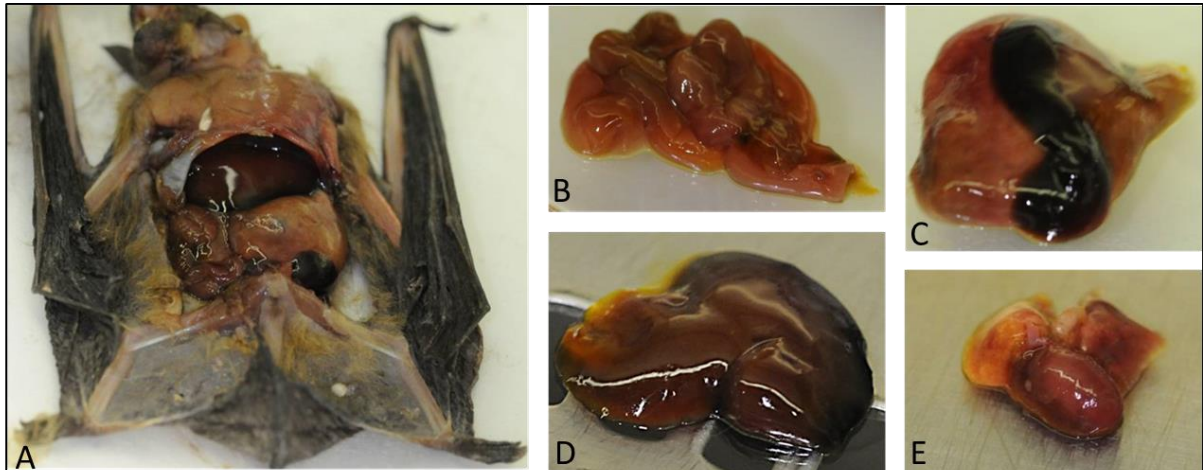


### 3.2 Esame autoptico

I risultati dell'esame post-mortem hanno evidenziato nella maggior parte dei soggetti lesioni di tipo traumatico come lacerazioni della membrana alare e fratture degli arti soprattutto a livello radio-ulnare, dell'omero o a carico del carpo e delle falangi dovute a cause sconosciute o predazione. La valutazione macroscopica di lesioni anatomico patologiche a carico degli organi interni è risultata difficoltosa per via delle dimensioni ridotte degli animali, del congelamento e in alcuni casi dello stato di conservazione. Molti soggetti presentavano lesioni traumatiche anche agli organi interni con emotorace o emoperitoneo. In alcune carcasse sono stati rinvenuti ectoparassiti, in particolare zecche appartenenti alla specie *Ixodes vespertilionis*, *Nycteribidae* e endoparassiti riconducibili a nematodi presenti liberi a livello toracico e addominale. Nella figura 4 sono riportate a titolo di esempio alcune immagini

acquisite nel corso dell'esame necroscopico e del prelievo degli organi da sottoporre agli esami virologici.

Figura 4. Immagini acquisite nel corso dell'esame necroscopico e prelievo di organi da chirotteri. Carcassa (A), Intestino (B), Milza e stomaco (C), fegato (D), cuore e polmone (E).



### 3.3 Analisi virologiche

Il protocollo diagnostico utilizzato per le indagini virologiche condotte sui 702 campioni di pipistrello oggetto dello studio hanno consentito di identificare agenti virali riconducibili ai generi *Orthoreovirus*, *Coronavirus* mentre nessun campione è risultato positivo per *Lyssavirus*. Il protocollo diagnostico sviluppato ha inoltre consentito di identificare virus non precedentemente sospettati o attivamente ricercati con tecniche specifiche come Adenovirus e Orthonairovirus. Nei paragrafi che seguono vengono riportati nel dettaglio i risultati degli esami di diagnostica virologica suddivisi nei diversi gruppi virali identificati e i relativi risultati delle analisi di caratterizzazione virale su base molecolare.

#### 3.3.1 Coronavirus

Sono stati complessivamente identificati 34 campioni positivi per CoVs su 702 campioni esaminati in totale (p=4,84%) provenienti da 6 differenti specie: *Pipistrellus kuhlii* (5), *Hypugo Savii* (13), *Rhinolophus hipposideros* (12), *Miniopterus schreibersii* (1), *Myotis crypticus* (1), *Plecotus auritus* (1).

Nella tabella 3 è riportato in dettaglio l'elenco dei campioni risultati positivi al test nested RT-PCR per CoV e successivamente confermati tramite sequenziamento Sanger. Per ogni campione viene indicato il numero identificativo di laboratorio e l'anno di campionamento,

la specie di pipistrello coinvolta, la matrice, la provenienza, il genere virale di appartenenza identificato a seguito del sequenziamento e l'identificativo delle sequenze virali disponibili nel database Genbank che hanno mostrato i valori più elevati di identità nucleotidica.

Tabella 3: Campioni biologici da pipistrello risultati positivi per CoV.

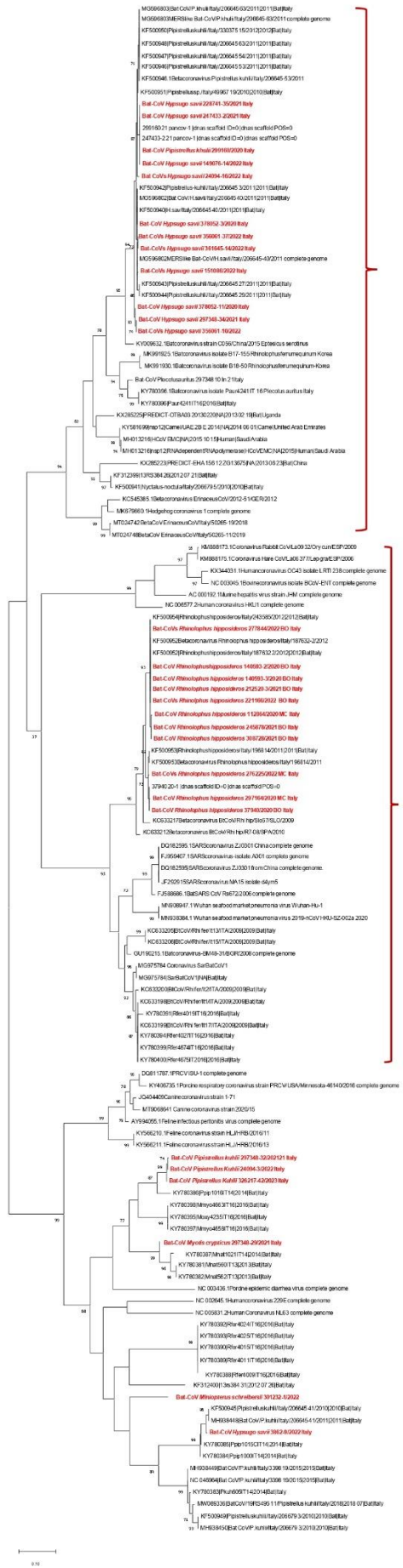
N°	Id IZSLER/ Anno	Specie ospite	Matrice	Conferente/ Comune di ritrovamento	Genere CoVs	Nucleotide identity (BLAST) RdRp 385 pb Accession n.
1	112864/2020*	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/ Massa Carrara	β-CoV (SARS-related)	98,56% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952.1
2	140593/2/2020	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/ Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,28% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952.1
3	140593/3/2020*	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,28% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952.1
4	37940/1/2020	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	98,53% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/196814/2011 KF500953.1
5	299160/2020	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Intestino	Centro Monte Adone/Sasso Marconi (BO)	β-CoV (MERS-related)	98,58% MERS -related CoV Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
6	247433/2/2020	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	Centro Monte Adone/Sasso Marconi (BO)	β-CoV (MERS-related)	100% MERS -related CoV Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
7	228741/35/2021	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Galbiate (LC)	β-CoV (MERS-related)	98,61% MERS -related CoV Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
8	378052/3/2020	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/ Cenate Sopra (BG)	β-CoV (MERS-related)	99,32% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011 MG596802.1
9	378052/11/2020	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/ Zandobbio (BG)	β-CoV (MERS-related)	98,41% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011 MG596802.1
10	378052/44/2020	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Brembate (BG)	β-CoV (MERS-related)	99% MERS -related CoV Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
11	297164/2020	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Massa Carrara	β-CoV (SARS-related)	98,28% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/196814/2011 KF500953.1
12	297348/10/2021	<i>Plecotus auritus</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Barzio (LC)	α-CoV	96,42% Bat coronavirus isolate Paur4241_IT_16 <i>Plecotus auritus</i> , Italy. KY780396.1
13	297348/29/2021	<i>Myotis crypticus</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Vilminore di scalve (BG)	α-CoV	96% Bat coronavirus isolate Mnat560_IT_13 <i>Myotis nattereri</i> , Italy. KY780381.1
14	297348/32/2021	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/ Rodengo Saiano (BS)	α-CoV	95,61% Bat coronavirus isolate Bat-CoV/P.nathusii/Russia/MOW15-16/2. OR241431.1
15	297348/34/2021	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Fuipiano Valle Imagna (BG)	α-CoV	98,15% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011. MG596802.1
16	308728/2021*	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,04% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952
17	245878/2021	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,04% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952
18	212520/3/2021	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,74% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952
19	183671/2/2022	nd	Intestino + pool organi	CRAS LIPI otus/Bologna	β-CoV (MERS-related)	98,64% con Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus
20	151086/2022	<i>Hypsugo savii</i>	Pool organi	Centro Monte Adone/Crespellano (BO)	β-CoV (MERS-related)	99,47% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011, complete genome. MG596802.1
21	221166/2022	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,04% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952
22	276225/2022*	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Massa Carrara	β-CoV (SARS-related)	98,53% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/196814/2011 KF500953.1
23	277844/2022*	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/Vergato (BO)	β-CoV (SARS-related)	99,28% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/187632-2/2012 KF500952
24	301232/1/2022	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Pool organi	USL Forlì/Cesena	α-CoV	100% Alphacoronavirus sp. isolate 21057954/26 <i>Miniopterus schreibersii</i> . Italy, Arezzo. ON834690.1
25	356061/10/2022	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Brescia	β-CoV (MERS-related)	98,18% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011. MG596802
26	356061/25/2022	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/ Brescia	β-CoV (MERS-related)	95,45% con Bat coronavirus isolate Bat-CoV/P.nathusii/Russia/MOW15. ON325606.
27	356061/37/2022	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina/ Cenate sopra (BG)	β-CoV (MERS-related)	99,09% MERS -related CoV Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011. MG596802.1
28	3862/9/2023	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	CRAS Rimini Corpòlo/ S.Agata Feltria (RN)	α-CoV	98,83% Alphacoronavirus Bat-CoV/P.kuhlii/Italy/206645-41/2011. MH938448.1
29	24094/3/2023	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Intestino	CRAS Piacenza/ Castell'arguato (PC)	β-CoV (MERS-related)	95,44% Bat coronavirus isolate Bat CoV/P.nathusii/Russia/MOW15-16/2. OR241431.1
30	24094/16/2023	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	CRAS Piacenza/ Rivergaro (PC)	β-CoV (MERS-related)	98,41% MERS -related CoV. Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
31	361645/14/2022	<i>Hypsugo savii</i>	Pool organi	CRAS Valpredina/ Cenate Sopra	β-CoV (MERS-related)	99,09% MERS-related CoV. Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011, MG596802.1
32	149076/14/2023	<i>Hypsugo savii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/ Bergamo	β-CoV (MERS-related)	98,64% MERS -related CoV Bat-CoV/P.khulii/Italy/206645-63/2011. MG596803.1
33	188272/2023	<i>R. hipposideros</i>	Feci (pool da colonia)	Privato/ Massa Carrara	β-CoV (SARS-related)	98,77% <i>Rhinolophus hipposideros</i> /Italy/196814/2011 KF500953.1
34	326217/42/2023	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Intestino + pool organi	CRAS Valpredina //	α-CoV	96,05% Bat coronavirus isolate Bat-CoV/P.nathusii/Russia/MOW15-33/2. OQ725987.1...

\*Campioni selezionati per il sequenziamento completo tramite NGS

Nel complesso i risultati indicano che nelle popolazioni di pipistrelli studiate, circola una varietà di coronavirus appartenenti ai due differenti generi *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* e tra questi ultimi sia MERS-related COV del sottogenere *Merbecovirus* (correlati al virus della Sindrome respiratoria del Medio Oriente) e SARS-related CoV del sottogenere *Sarbecovirus* (correlati ai virus SARS e SARS-CoV-2). Sequenze virali riconducibili a SARS-related CoVs sono state rinvenute esclusivamente in campioni di pool di feci provenienti da due colonie riproduttive di *Rhinolophus hipposideros* in accordo con quanto riportato nella letteratura scientifica sulla specificità dei SARS-CoVs per i pipistrelli appartenenti alla famiglia dei Rinolofidi.

L'analisi filogenetica del gene codificante la RdRp ha confermato la distribuzione delle sequenze in diversi clade suddivisi nei due differenti generi virali (Fig. 5). Sette sequenze, identificate in *Pipistrellus kuhlii* (2), *Hypsugo savii* (2), *Plecotus auritus* (1), *Myotis crypticus* (1) e *Miniopterus schreibersii* (1) negli anni 2021-2022 appartengono al genere *Alpha-CoV* che comprende oltre a coronavirus da pipistrelli, i ceppi umani HCoV-229E e HCoV-NL63, i ceppi suini PEDV e TGEV e i CoVs del cane e del gatto CCoV e FCoV. Dodici sequenze identificate in *Rhinolophus hipposideros* negli anni 2020-2021-2022 si posizionano nel clade dei SARS-related CoV e appaiono correlate con i SARS-like-CoVs identificati in pipistrelli rinolofidi in Italia, Slovenia e Spagna negli anni 2009-2011. Le restanti 15 sequenze identificate in *Pipistrellus kuhlii* (3) e *Hypsugo savii* (11) nel periodo 2020-2023 appartengono al clade dei MERS-related COV (genere Beta-CoV) che raggruppa i ceppi MERS identificati nell'uomo e nei camelidi e altre sequenze da pipistrello identificate in precedenza in Italia e in Europa.

Figura 5. Albero filogenetico basato sul sequenziamento parziale del gene RdRp (385bp). L'albero è stato creato utilizzando il software MEGA6 e il metodo Maximum likelihood con un bootstrap di 1000 repliche. Solo i valori di bootstrap >70 sono riportati. Le sequenze identificate nei pipistrelli in Italia nel corso dello studio sono evidenziate in rosso.



Merbecovirus

Betacoronavirus

Sarbecovirus

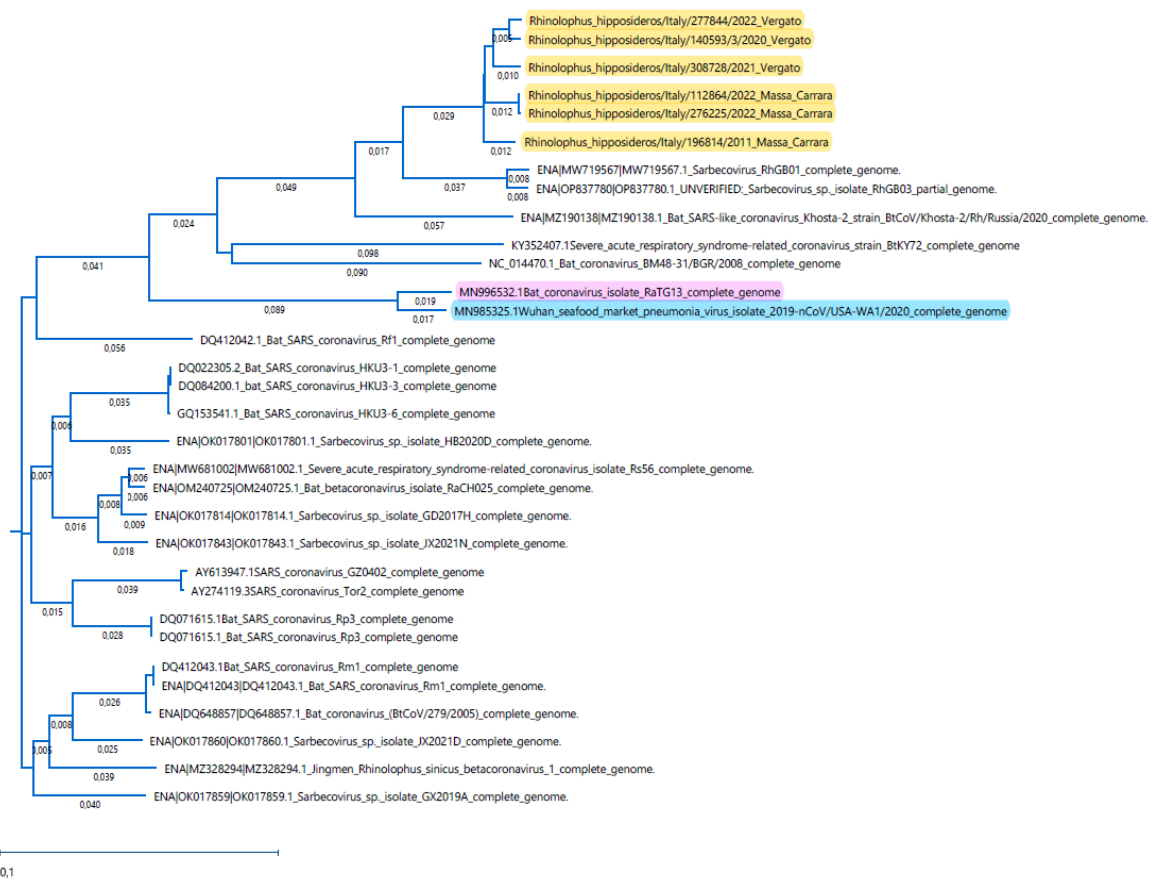
Alphacoronavirus



Cinque campioni identificati come SARS-related CoVs (Id. IZSLER 112864/2020, 140593-3/2020, 308728/2021, 276225/2022, 277844/2022) sono stati selezionati per il sequenziamento del genoma completo tramite NGS. Nello specifico, i campioni selezionati provengono da due differenti colonie riproduttive di *Rhinolophus hipposideros* localizzate a Vergato (BO) (Id. campioni 140593-4/2020, 308728/2021 e 277844/2022) e Massa Carrara (Id. campioni 112864/2020 e 276225/2022) che sono state sottoposte a campionamento periodico nel corso degli anni già a partire dal 2011.

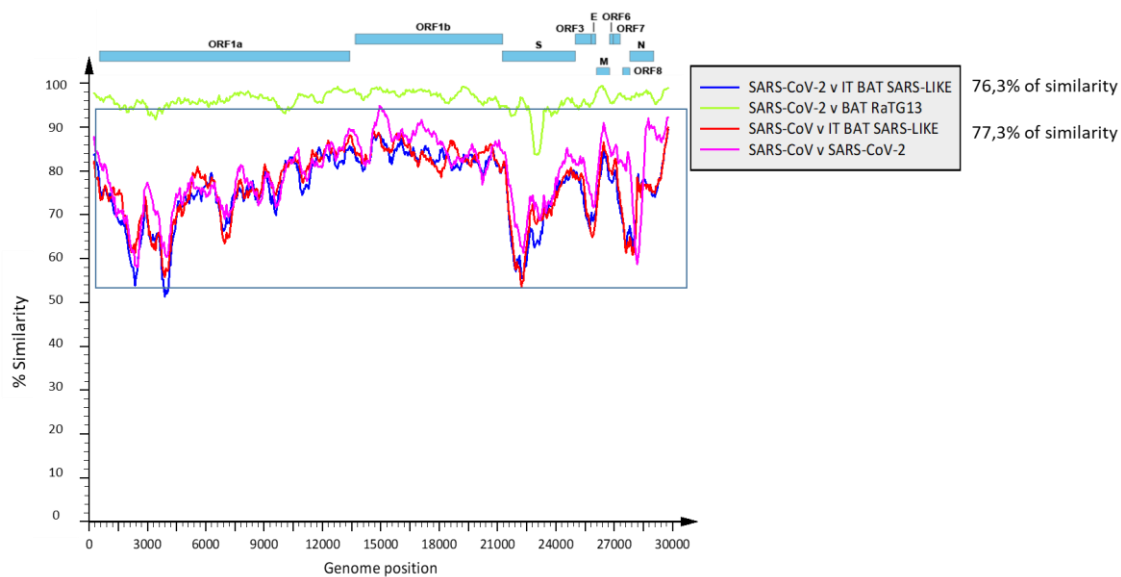
Nell'albero filogenetico (figura 6) sono riportate in colore giallo le sequenze complete del genoma dei SARS-related CoVs identificati nei pipistrelli rinolofidi in Italia. In blu è evidenziata la sequenza SARS-Cov-2 umana "ceppo Wuhan" identificata in China nel 2019 e in rosa è riportato il virus denominato RatG13 identificato in China nel 2013 in campioni di feci di *Rhinolophus affinis* e noto per essere stato riconosciuto come il probabile progenitore di SARS-COV-2 con il quale condivide il 96,1% di identità nucleotidica.

Figura 6. Albero filogenetico basato sulle sequenze genomiche complete dei Betacoronavirus, sottogenere Sarbecovirus, specie SARS-CoV. In giallo sono indicate le sequenze SARS-CoV identificate nei pipistrelli in Italia nel corso del presente studio. In blu è indicata la sequenza di SARS-CoV-2 strain Wuhan 2019, in rosa è indicata la sequenza del SARS-CoV RaTG13 identificato in *Rhinolophus affinis* in China. Maximum likelihood tree.



Nella figura 7 è riportato il grafico di similarità generato utilizzando SSE versione 1.2. Le sequenze genomiche complete di differenti BetaCoVs, inclusa una sequenza rappresentativa tra quelle identificate nel corso dello studio nei pipistrelli rinolofidi in Italia (IT-BatSARS-like CoV), sono state poste a confronto. Il grafico indica che IT-BatSARS-like CoV (linea blu) presenta complessivamente un valore di similarità con SARS-CoV-2 pari a 76,3% che si riduce a valori prossimi al 50% in corrispondenza della proteina S (spike). Diversamente la sequenza nucleotidica di Bat CoV RatG13 (linea verde) presenta valori di similarità con SARS-CoV-2 superiori al 95% lungo l'intero genoma con maggior divergenza presente solo a livello del dominio di legame del recettore (RBD) della proteina spike (S).

Figura 7: Identità di sequenza tra i BetaCoVs SARS-CoV, SARS-CoV-2, Bat RaTG13 CoV e IT-BatSARS-like CoV. Il grafico di similarità è stato generato utilizzando SSE versione 1.2 utilizzando una finestra scorrevole di 600 e una step size di 100 nucleotidi.



### 3.3.2 Orthoreovirus

Complessivamente sono risultati positivi al test di screening real-time RT-PCR per *Mammalian orthoreovirus (MRV)* 26 campioni su 702 analizzati (p=3,7%).

In totale sono stati isolati sulle colture cellulari MARC e VERO 9 MRV dai campioni con valori di ct più bassi al test real-time RT-PCR e provenienti da tre differenti specie di pipistrelli (*Pipistrellus kuhlii*, *Hypsugo savii* e *Rhinolophus hipposideros*). *Pipistrellus kuhlii* è la specie maggiormente rappresentata nel campionamento e quella dalla quale sono stati isolati il maggior numero di ceppi MRV (tot=5).

L'identificazione virale dei virus isolati è stata effettuata in prima battuta attraverso l'esame in microscopia elettronica (ME) che ha permesso di rilevare nei sovrantanti delle colture cellulari la presenza di numerose particelle virali icosaedriche senza envelope morfologicamente riconducibili a reovirus (Figura 8). L'identificazione virale è stata successivamente confermata tramite real-time RT-PCR.

Nella tabella 4 è riportato in dettaglio l'elenco dei campioni risultati positivi al test real time RT-PCR per MRV. Per ogni campione è indicato il numero identificativo di laboratorio e l'anno di campionamento, la specie di pipistrello coinvolta, la matrice e la provenienza.

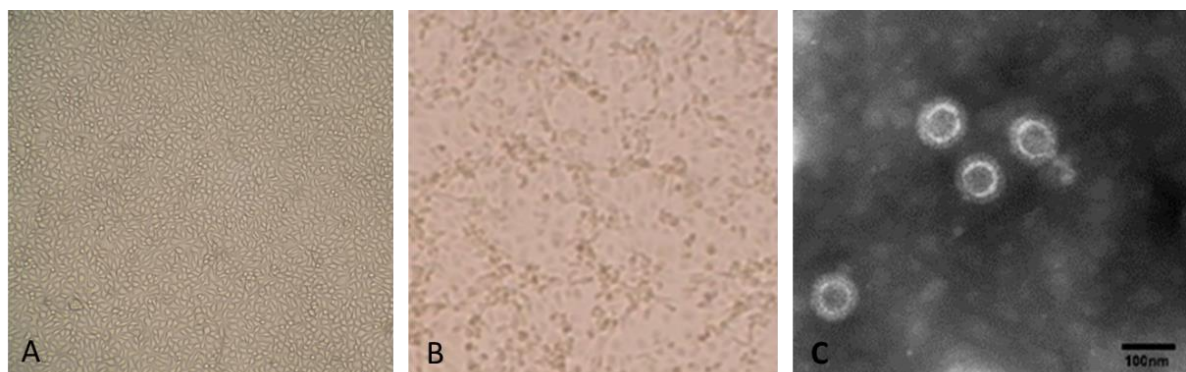
Tabella 4: Campioni biologici di pipistrello risultati positivi per MRV

N°	Id IZSLER/ Anno	Specie ospite	Matrice	Conferente/ Comune di ritrovamento	Real time PCR MRV	Isolamento virale (colture cellulari)
1	235811-4/2020	<i>H. savii</i>	Intestino	Centro Monte Adone/Sasso Marconi (BO)	Positivo	No
2	194409 /2020	<i>H. savii</i>	Intestino	Lipu Ferrara/Gussago (BS)	Positivo	No
3	238571-11/2020	<i>P. pipistrellus</i>	Intestino	Centro Caccia e Pesca Emilia R./Rivergaro (PC)	Positivo	No

4	238571-14/2020	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Centro Caccia e Pesca Emilia R./Rivergaro (PC)	Positivo	No
5	204140-1/2020	nd	Intestino	Cras Vanzago/Milano	Positivo	No
6	4896/2020	<i>P. kuhlii</i>	Pool organi	Lipu Ferrara/Sermide (MN)	Negativo (Positivo Nested (PCR))	Si
7	112864/2020	<i>R. hipposideros</i>	Feci	Privato/Massa Carrara	Negativo (Positivo Nested (PCR))	Si
8	228741-14/2020*	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Alzano Lombardo (BG)	Positivo	Si
9	228741-15/2020	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Rodengo Saiano (BS)	Positivo	No
10	228741-20/2020	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Giussano (MB)	Positivo	No
11	228741-24/2020	<i>H. savii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Concesio (BG)	Positivo	No
12	228741-38/2020	<i>H. savii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Bergamo	Positivo	Si
13	228741-39/2020	<i>H. savii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Caprino Bergamasco (BG)	Positivo	No
14	378052-72/2020	<i>T. teniotis</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Brescia	Positivo	No
15	297348-6/2022	<i>H. savii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Grumello del Monte (BG)	Positivo	No
16	119553/2021	<i>E. serotinus</i>	Intestino	Lipu Ferrara/Ferrara	Positivo	No
17	297348-25/2021*	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	CRAS Valpredina/Moniga del Garda (BS)	Negativo (Positivo Nested (PCR))	Si
18	110762/2022	nd	Intestino	Lipu Ferrara/Ferrara	Positivo	No
19	193579/2022	<i>H. savii</i>	Pool organi	Centro Monte Adone/ Castiglione dei Pepoli (BO)	Positivo	No
20	245519/2022	<i>H. savii</i>	Intestino	Centro Monte Adone/Sasso Marconi (BO)	Positivo	No
21	260551/2022	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Centro Monte Adone/Sa Lazzaro di Savena (BO)	Positivo	No
22	240714/2022	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Lipu Ferrara/Ferrara	Positivo	No
23	24094-5/2023	<i>Pipistrellus spp.</i>	Intestino/Pool organi	CRAS Piacenza/Alta Val Tidone (PC)	Positivo	Si
24	149076-10/2023*	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Cras Valpredina/ Bergamo	Negativo	Si
25	135080/2023	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Lipu Ferrara/Ferrara	Negativo	Si
26	135087/2023*	<i>P. kuhlii</i>	Intestino	Lipu Ferrara/Ferrara	Negativo	SI

\*Il campioni contrassegnati da asterisco sono stati selezionati per il sequenziamento complete del genoma virale tramite NGS



Figura 8. Isolamento di MRV su colture cellulari. (A) Cellule di controllo, linea MARC-145, ingrandimento 10x; (B) cellule MARC-145 infette con ECP, ingrandimento 10x; (C) Immagine di microscopia elettronica (EM) in colorazione negativa. Presenza di particelle virali morfologicamente attribuibili a Reovirus.



Ai fini del sequenziamento del genoma completo tramite NGS e successiva caratterizzazione molecolare sono stati selezionati 4 ceppi MRV isolati su colture cellulari. Nello specifico sono stati selezionati i virus denominati Bat-MRV1-IT 228741-14/2021, Bat-MRV3-IT 297348-25/2021, Bat-MRV3-IT 149076-10/2023 e Bat-MRV3-IT 135087/2023 isolati da soggetti appartenenti alla specie *Pipistrellus kuhlii* deceduti negli anni 2021 e 2023 presso i

centri di recupero che hanno collaborato allo studio. La sequenza completa del genoma virale di ciascun ceppo MRV selezionato è stata confrontata con quelle presenti in banca dati. Di seguito vengono riportati i risultati delle analisi fatte in BLAST che mostrano i più alti valori di identità nucleotidica ottenuti per ognuno dei 10 geni virali di ciascun ceppo MRV selezionato (Tabella 5, 6, 7, 8).

Tabella 5: Risultati dell'analisi in Blast per Bat-MRV1-IT 228741-14/2021.

BatMRV1 IT228741- 14/2021	% similarity	MRV strain	Serotype	Host	Country (year)	GenBank Acession No.
L1	99.29(98)	SL-MRV04	1	 <i>Eptesicus serotinus</i>	 Slovenia (2009)	MG457098
L2	99.12(99)					MG457099
L3	99.28(99)					MG457100
M1	98.69(99)					MG457101
M2	99.08(99)					MG457102
M3	99.10(98)					MG457103
S1	99.37(97)					MG457104
S2	99(97)					MG457105
S3	99.40(97)					MG457106
S4	99.01(100)					MG457107

Note: L, large segments; M, medium segments; S, small segments.

Tabella 6: Risultati dell'analisi in Blast per Bat-MRV3-IT 135087/2023.

Bat-MRV3-IT 135087/2023	% similarity	MRV strain	Serotype	Host	Country (year)
L1	97.87(99)	SI-MRV06 (MG457118)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
L2	98.80(99)	IT-5515-2/2012 (KU194659)	3	Pipistrellus Khulii	Italy 2012)
L3	98.75(100)	IT-5515-2/2012 (KU194660)	3	Pipistrellus Khulii	Italy 2012)
M1	94.92(100)	YNSZ/V207/2016 (MW198707)	1	Bovine	China (2016)
M2	97.45(100)	mew716_MRV-3 (KX932033)	3	Homo sapiens	Svizzera (2015)
	97.45(100)	IT-5515-2/2012 (KU194662)	3	Pipistrellus Khulii	Italy (2012)
M3	99(100)	IT-5515-2/2012 (KU194663)	3	Pipistrellus Khulii	Italy (2012)
S1	99.03(100)	SI-MRV02 (MG457082)	3	<i>Eptesicus serotinus</i>	Slovenia (2010)
S2	99(99)	IT-5515-2/2012 (KU194664)	3	Pipistrellus Khulii	Italy (2012)
S3	98.81(96)	SI-MRV02 (MG457086)	3	<i>Eptesicus serotinus</i>	Slovenia (2010)
S4	98.71(96)	T3/Bat/Germany/342/08 (JQ412764)	3	<i>Plecotus auritus</i>	Germany (2008)

Note: L, large segments; M, medium segments; S, small segments.

Tabella 7: Risultati dell'analisi in Blast per Bat-MRV3-IT 297348-25/2021.

Bat-MRV3-IT 297348-25/2021	% similarity (% query cover)	MRV strain (GenBank Acession No)	Serotype	Host	Country (year)
L1	98.11(99)	SI-MRV06 (MG457118)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
L2	96.97(100)	SI-MRV06 (MG457119)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
L3	95.24(99)	SI-MRV06 (MG457120)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
M1	98.01(100)	SI-MRV06 (MG457121)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
M2	98.07(100)	SI-MRV02 (MG457082)	3	<i>Eptesicus serotinus</i>	Slovenia (2010)

<b>M3</b>	97.14(100)	SI-MRV06 (MG457123)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>S1</b>	97.80(100)	BatMRV3-IT 206645-51/2011 (JQ979277)	3	<i>Tadarida teniotis</i>	Italy (2011)
<b>S2</b>	95.03(68)	SI-MRV06 (MG457125)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>S3</b>	95.74(99)	BatMRV1-IT2011 (KT900703)	1	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	Italy (2015)
<b>S4</b>	95.97(100)	SI-MRV06 (MG457127)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)

Note: L, large segments; M, medium segments; S, small segments.

Tabella 8: Risultati dell'analisi in Blast per Bat-MRV3-IT 149076-10/2023.

BatMRV1-IT2011	% similarity	MRV strain (GenBank Accession No)	Serotype	Host	Country (year)
<b>L1</b>	98.03(99)	SI-MRV06 (MG457118)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>L2</b>	96.94(100)	SI-MRV06 (MG457119)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>L3</b>	95.19(99)	SI-MRV06 (MG457120)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>M1</b>	97.88(81)	SI-MRV06 (MG457121)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>M2</b>	98.20(100)	SI-MRV02 (MG457082)	3	<i>Eptesicus serotinus</i>	Slovenia (2010)
<b>M3</b>	97.07(99)	SI-MRV06 (MG457123)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>S1</b>	97.92(100)	BatMRV3-IT 206645-51/2011 (JQ979277)	3	<i>Tadarida teniotis</i>	Italy (2011)
<b>S2</b>	94.81(100)	SI-MRV06 (MG457125)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)
<b>S3</b>	95.73(99)	BatMRV1-IT2011 (KT900703)	1	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	Italy (2011)
<b>S4</b>	96.15(100)	SI-MRV06 (MG457127)	1	<i>Myotis emarginatus</i>	Slovenia (2009)

Note: L, large segments; M, medium segments; S, small segments.

I risultati dimostrano che Bat-MRV1-IT 228741-14/2021 (Tab. 5), isolato da *Pipistrellus kuhlii* in provincia di Bergamo nel 2020, appartiene al sierotipo 1 ed ognuno dei suoi 10 segmenti genici mostra il più alto valore di identità nucleotidica (>99%) per il virus SL-MRV04 isolato da *Eptesicus serotinus* in Slovenia nel 2009 (Naglič *et al.*, 2018).

Bat-MRV3-IT 135087/2023 appartiene invece al sierotipo 3 e i 10 segmenti genici virali mostrano il più alto valore di identità nucleotidica per virus identificati in diversi ospiti (pipistrello, uomo, bovino) con differenti origini e appartenenti a diversi sierotipi senza apparente correlazione geografica o temporale. Bat-MRV3-IT 135087/2023 appare quindi come un virus originatosi a seguito di fenomeni di riassortimento genico.

Bat-MRV3-IT 297348-25/2021 e Bat-MRV3-IT 149076-10/2023 entrambi isolati da *Pipistrellus kuhlii* rispettivamente in provincia di Bergamo nel 2021 e Ferrara nel 2023, appartengono al sierotipo 3 e presentano identico pattern genetico indicativo di riassortimento e caratterizzato dalla presenza di 7 segmenti genici (L1-L3, M1, M3, S2, S4)

correlati al virus SI-MRV06 appartenente al sierotipo 1 e identificato nel 2009 in Slovenia in *Myotis emarginatus*; il gene M2 correlato al virus SI-MRV02 identificato in *Eptesicus serotinus* in Slovenia nel 2010; i geni S1 e S3 correlati a virus identification in Italia nel 2011 rispettivamente in *Tadarida teniotis* (BatMRV3-IT 206645-51/2011) e *Rhinolophus hipposideros* (BatMRV1-IT2011).

### 3.3.3 Lyssavirus

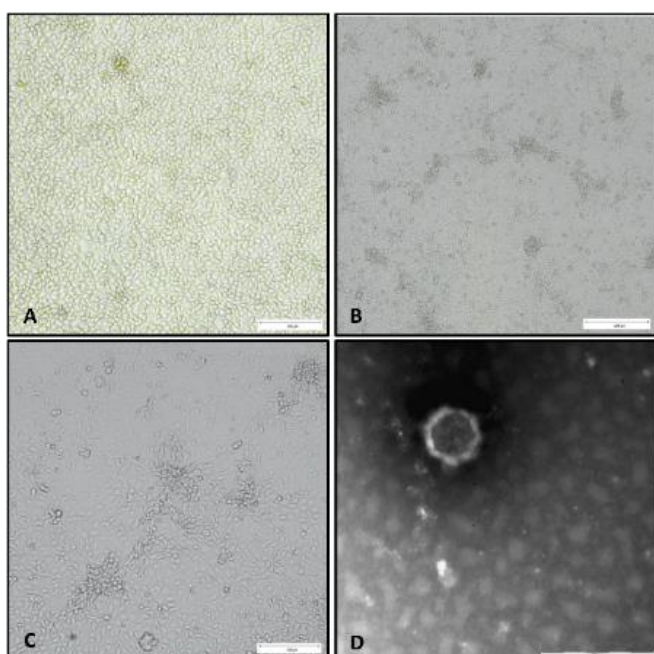
Gli esami condotti tramite real-time PCR pan-lyssavirus per la ricerca del genoma virale nei campioni di cervello di pipistrello testati nel corso dello studio sono risultati tutti negativi. A questo proposito è importante specificare che le specie target per la sorveglianza dei due lyssavirus maggiormente diffusi nelle popolazioni di chiroteri in Europa (EBLV-1, EBLV-2) non rientrano nel campionamento. Le specie importanti per la sorveglianza in termini di rischio di infezione sono *Eptesicus serotinus* ed *E. isabellinus* per (EBLV-1) e *Myotis daubentonii* e *M. dasycneme* per EBLV-2. La sorveglianza per lyssavirus in Italia prevede comunque che tutte le specie di chiroteri di ogni sesso ed età debbano essere testate, ma l'indicazione deriva più dall'assenza di dati certi che da evidenze scientifiche che dimostrano che effettivamente i lyssavirus circolano nelle diverse specie di pipistrelli. Altro aspetto importante è che la sorveglianza viene condotta su animali non affetti da sintomatologia neurologica e quindi con ridotta probabilità di essere infetti da lyssavirus.

### 3.3.4 Orthonairovirus

Nel corso delle analisi virologiche condotte nell'ambito dello studio, dal campione di pool di organi Id. IZSLER 297348-34/2022 è stato isolato un agente virale citopatico sulla linea cellulare MARC-145. Il campione è stato prelevato da un pipistrello femmina appartenente alla specie *Hypsugo savii* originariamente ritrovato il 17 agosto 2021 in provincia di Bergamo da un cittadino e consegnato al Centro di Recupero per la fauna selvatica più vicino. Clinicamente, il pipistrello mostrava letargia, inappetenza e perdita di peso ed il decesso è sopraggiunto 11 giorni dopo il ricovero. All'autopsia non sono stati osservati traumi o lesioni patologiche macroscopicamente evidenti riconducibili a malattie infettive. Il pool di organi (polmone, cuore, fegato, milza) prelevati nel corso dell'esame post-mortem è stato inoculato sulla linea cellulare continua MARC-145 e VERO. Al secondo passaggio in coltura, dal 5° giorno post-infezione, è stato evidenziato effetto citopatico indicativo di replicazione virale caratterizzato da degenerazione del monostrato cellulare con focolai isolati di cellule arrotondate e aggregate (Figura 9A, 9B, 9C). La microscopia elettronica eseguita sul

surnatante della coltura cellulare infetta ha confermato la presenza di numerose particelle virali distinte di 55–60 nm, morfologicamente riferibili a Orthonairovirus (Figura 9D).

Figura 9. A) Monostrato cellulare MARC-145 non infetto, 10X; B) Monostrato cellulare MARC-145 infetto da ISKV IT-297348-34/2022 con ECP. Immagine acquisita a 120h post-infezione, 4X; C) Monostrato cellulare MARC-145 infetto da ISKV IT-297348-34/2022 con ECP. Immagine acquisita a 120h post-infezione, 10X; D) Immagine di Microscopia Elettronica (ME) in colorazione negativa. Particella virale di 55-60 nm morfologicamente riferibile ad orthonairovirus nel sovrinatante di colture cellulari MARC-145. Barra della scala = 200 nm.



Il campione è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione (NGS) tramite un protocollo standardizzato. La sequenza genomica completa del virus isolato IT-297348–34/2022 (IT-ISKV) ha rivelato la presenza dei 3 segmenti genici tipici del genoma degli Orthonairovirus: L (large, 11.978 nt), M (medium, 4.907 nt) e S (small, 1.457 nt). L’analisi della sequenza virale eseguita in BLAST ha evidenziato i più alti valori di identità nucleotidica per ciascun segmento genico verso ceppi ISKV (ceppo Sun-2020, k99\_1658, k99\_589) rilevati in Svezia in *Myotis brandtii* e nelle zecche associate ai pipistrelli e in Germania in *Eptesicus nilssonii* (ceppo PbGER) (Tabella 1). Le sequenze genomiche ottenute sono state depositate in GenBank con numeri di accesso OR583909–11 (Lelli *et al.*, 2024).

L'analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze complete del gene L dei virus appartenenti al genere Orthonairovirus, ha confermato l'appartenenza di IT-ISKV al genogruppo Keterah. Questo genogruppo include le poche sequenze ISKV ad oggi disponibili rilevate in pipistrelli e zecche in Svezia, Germania e Asia centrale, ed altre sequenze del virus Keterah, virus Uzun Agach e virus Gossas tutte identificate in pipistrelli rispettivamente in Malesia, Kazakistan e Senegal (Figura 10A) (11).

L'analisi filogenetica condotta con le sequenze complete dei geni virali S e M ha fornito risultati analoghi con topologia sovrapponibile negli alberi filogenetici preparati (dato non mostrato).

Tabella 9. Identità nucleotidica per ciascuna proteina del virus Issyk-kul ceppo IT-ISKV identificato in *Hypsugo savii* in Italia.

Gene	% Similarity (query cover, %)	ISKV strain	Host	Country (year)	GenBank accession no.	Reference
<b>Large</b>	95.44 (99)	K_k99_1658_len_12288	Bat-associated tick	Sweden (2020)	OP514654	Unpub. data
	95.34 (99)	LEZ 86–787	<i>Carios vespertilionis</i> tick	Germany (1986)	KR537441	Walker <i>et al.</i> , 2016
	95.31 (99)	Sun-2020	<i>Myotis brandtii</i> bat	Sweden (2020)	OP380632	Cholletti <i>et al.</i> , 2022
<b>Medium</b>	81.55 (72)	Sun-2020	<i>M. brandtii</i> bat	Sweden (2020)	OP380631	Cholletti <i>et al.</i> , 2022
	81.11 (78)	k99_589	Bat-associated tick	Sweden (2020)	OP804626	Unpub. data
	81.34 (71)	LEIV-315K	<i>Nyctalus noctula</i> bat	Kyrgyzstan (1973)	KR709220	Atkinson <i>et al.</i> , 2015
<b>Small</b>	97.51 (90)	PbGER	<i>Eptesicus nilssonii</i> bat	Germany (2008–2011)	MW275296	Brinkmann <i>et al.</i> , 2020
	89.11 (100)	Sun-2020	<i>M. brandtii</i> bat	Sweden (2020)	OP380630	Cholletti <i>et al.</i> , 2022
	89.04 (100)	LEZ 86–787	<i>C. vespertilionis</i> tick	Germany (1986)	KR537443	Walker <i>et al.</i> , 2016

\*IT-ISKV, Issyk-Kul virus IT-297348-34/2022.

A seguito dell'identificazione di IT-ISKV nell'area del Mediterraneo è stata sviluppata una metodica end point RT-PCR per l'identificazione di ISKV disegnando i primer IZSLER-ISKV F (5'- CTAGCTCTGCTGATTATGAG -3') e IZSLER ISKV R (5'-GCCAAGATAGTTGCGTCAATC -3') che hanno come target una regione conservata di 844 bp del gene L del Keterah Genogroup che codifica per la RNA polimerasi RNA-dipendente.

La metodica sviluppata è stata utilizzata per confermare la presenza di ISKV nei campioni di organo prelevati dal pipistrello infetto e per l'analisi delle colture cellulari con ECP. Col test

messo a punto è stata inoltre condotta una sorveglianza specifica per ISKV nei pipistrelli campionati nel periodo 2017-2023 con l'obiettivo di determinare la presenza e la diffusione del virus nelle popolazioni di pipistrelli nel nord Italia. Sono stati analizzati complessivamente 415 pipistrelli appartenenti a 13 specie nelle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna (tabella 10). Sono stati rilevati complessivamente ulteriori 8 pipistrelli positivi per ISKV appartenenti alla specie *Hypsugo savii* (7 soggetti) e *Myotis mystacinus* (1 soggetto) (Tabella 11) campionati negli anni 2017, 2020, 2021, 2022 e 2023 (Tabella 11B). Nessuno dei pipistrelli risultati positivi al virus ISKV è risultato infestato da zecche. Alcune zecche della specie *Ixodes vespertilionis* ritrovate in pipistrelli inclusi nello studio sono state testate con esito negative. L'albero filogenetico basato sulle sequenze parziali del gene L con tutti gli ISKV rilevati in Italia è riportato in Figura 10B.

Tabella 10: A) Elenco delle specie di pipistrello analizzate per ISKV. B) Numero di pipistrelli analizzati suddivisi per anno di campionamento

A)

Species	N	%
<i>Eptesicus serotinus</i>	1	0,2
<i>Hypsugo savii</i>	170	41
<i>Myotis emarginatus</i>	1	0,2
<i>Myotis crypticus</i>	1	0,2
<i>Myotis daubentonii</i>	9	2,2
<i>Myotis mystacinus</i>	4	1,0
<i>Nyctalus leisleri</i>	3	0,7
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	151	36,4
<i>Pipistrellus nathusii</i>	6	1,5
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	15	3,6
<i>Plecotus uratus</i>	3	0,7
<i>Plecotus macrobullaris</i>	1	0,2
<i>Tadarida teniotis</i>	4	1,0
<i>Plecotus sp.</i>	2	0,5
<i>Vespertilio murinus</i>	1	0,2
<i>Pipistrellus spp.</i>	43	10,4
<b>Total</b>	<b>415</b>	<b>100</b>

B)

Year	N° bats
2017	98
2018	42
2019	30
2020	117
2021	58
2022	52
2023	18
<b>Total</b>	<b>415</b>

Tabella 11. Elenco dei pipistrelli ISKV-positivi rilevati nello studio con il numero di accesso GenBank assegnato alle sequenze genomiche.

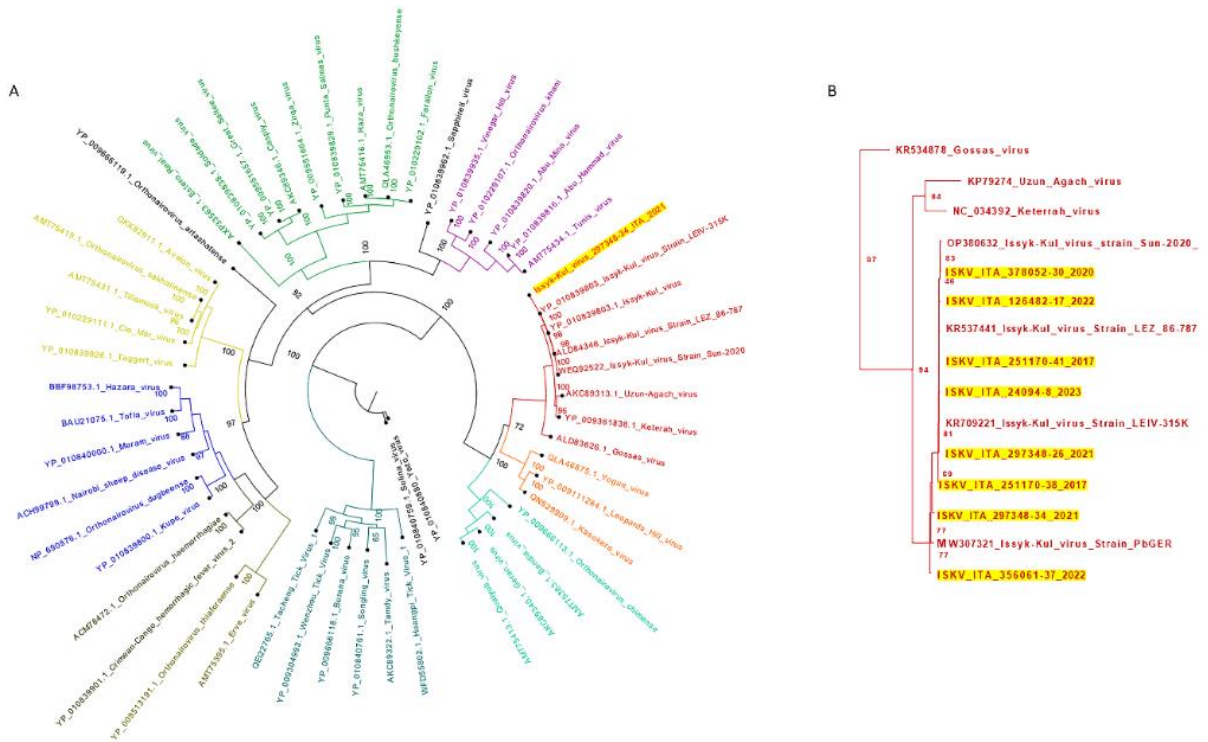
Sample	Year	Bat species	Origin	Virus isolation (cell culture)	Sequence	GenBank accession no.	Nucleotide similarity (%)
251170-38/2017	2017	<i>Hypsugo savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	No	Partial L gene	OR583901	Issyk-Kul virus LEZ 86-787 (98.79)
251170-41/2017	2017	<i>H. savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	No	Partial L gene	OR583902	Issyk-Kul virus LEZ 86-787 (99.27)

378052-30/2020	2020	<i>H. savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	No	Partial L gene	OR583903	Issyk-Kul virus K_k99_1658_len_12288 (99.17)
297348-34/2022	2021	<i>H. savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	Yes	Full genome	OR583909–11, OR583905	Issyk-Kul virus/Prackenbach bat nairovirus (96.65)
297348-26/2022	2021	<i>H. savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	No	Partial L gene	OR583904	Issyk-Kul virus LEZ 86–787 (99.42)
126482-17/2022	2022	<i>H. savii</i>	WRC Piacenza, Italy	No	Partial L gene	OR583906	Issyk-Kul virus LEZ 86–787 (99)
356061-37/2022	2022	<i>H. savii</i>	WRC WWF Valpredina. Bergamo, Italy	No	Partial L gene	OR583907	Issyk-Kul virus/Prackenbach bat nairovirus (98.42)
24094-8/2023	2023	<i>Myotis mystacinus</i>	WRC Piacenza, Italy	No	Partial L gene	OR583908	Issyk-Kul virus LEZ 86-787 (98.91)

\*L, large; WRC, wildlife recovery center; WWF, World Wildlife Fund.

Figura 10. A) Analisi filogenetica delle sequenze proteiche degli Orthonairovirus per il segment genomico L, inclusa la sequenza completa ottenuta da *Hypsugo savii* evidenziata in giallo. Le sequenze sono state colorate in base ai genogruppi proposti da Ozeki *et al.* 2022. B) Ingrandimento dell'allineamento nucleotidico della porzione conservata del gene L (844 bp).

Sono evidenziate in giallo tutte le sequenze identificate nel corso della sorveglianza per ISKV condotta nei pipistrelli campionati nel period 2017-2023.



## **Produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali (mAbs) anti-ISKV e antigeni ricombinanti**

Al fine di poter disporre di immunoreagenti potenzialmente impiegabili per lo sviluppo di metodiche diagnostiche sierologiche e di antigen-detection, sono stati prodotti e caratterizzati anticorpi monoclonali specifici per ISKV.

L'isolato ISKV è stato propagato su cellule MARC-145, inattivato, purificato tramite ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio e utilizzato come fonte di antigene per l'immunizzazione di due topi BALB/c. Gli ibridomi generati sono stati sottoposti a screening mediante ELISA indiretta e tramite saggio di immunoperossidasi (IPMA) su cellule MARC-145 infettate con ISKV e non infette (Figura 11). Per la caratterizzazione dei mAbs sono stati eseguiti saggi Western Blotting (WB) utilizzando il virus ISKV purificato. Per caratterizzare ulteriormente i mAbs, la nucleoproteina virale (NP) è stata prodotta in *E. coli* utilizzando la sequenza dell'isolato ISKV italiano (OR583911), con ottimizzazione dell'uso del codone. La NP ricombinante (rNP) è stata ottenuta in condizioni denaturate e purificata mediante cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC), con una resa di 2 mg/L (Fig. 12A). La reattività di rNP e mAbs è stata quindi valutata in WB ed ELISA indiretta. In totale 69 ibridomi hanno mostrato buona reattività in IPMA nei confronti di ISKV e 7 mAbs sono risultati reattivi anche in WB verso una proteina virale del peso molecolare di 55 kDa, presumibilmente corrispondente a NP (Fig. 12B). Gli stessi 7 mAbs hanno reagito in WB verso rNP dimostrando reattività verso epitopi di tipo lineare (Fig 12C). Altri 3 mAbs hanno riconosciuto rNP in solo in ELISA indiretta, dimostrando la loro reattività nei confronti di epitopi di tipo conformazionale.

Figure 11: Immunoperossidasi indiretta (IPMA). Monostrato cellulare Marc 145 infetto con Issyk-Kul virus IT-297348-34/2022 colorato con Mab anti-ISKV (20X).

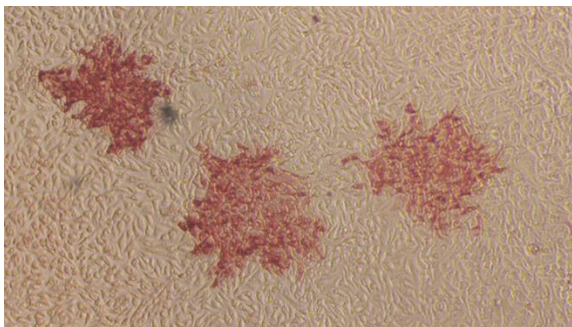
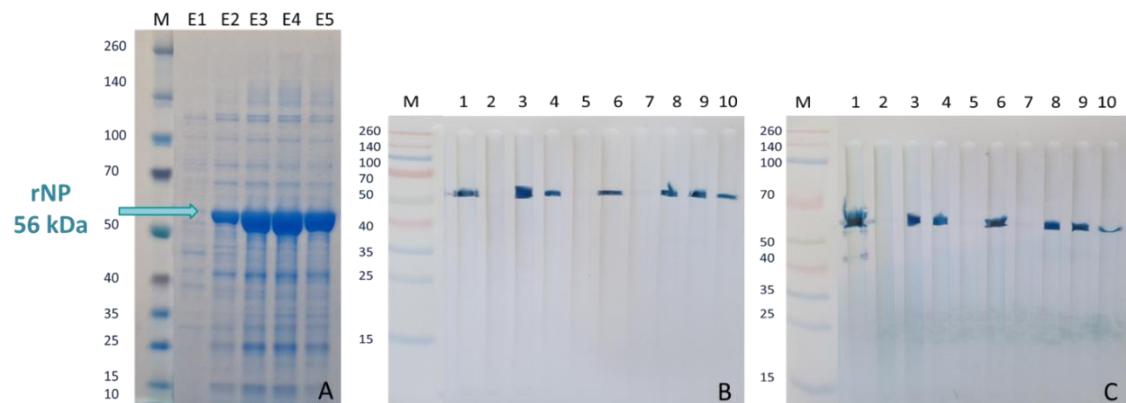


Figure 12: A) Analisi SDS-PAGE delle diverse eluizioni (da 1 a 5) ottenute dalla purificazione di rNP in condizioni denaturanti. M= SpectraProtein Ladder Marker. Il peso molecolare previsto di rNP è 56 kDa. B) WB eseguito con antigene virale ISKV e dieci mAb, dove 1=1D6, 2=1G12, 3=2A1, 4=2B9, 5=2C1, 6=2F7, 7=3A10, 8=3D2, 9=4G12 e 10=5H5. C) WB eseguito con antigene ricombinante rNP e dieci mAb, dove 1=1D6, 2=1G12, 3=2A1, 4=2B9, 5=2C1, 6=2F7, 7=3A10, 8=3D2, 9=4G12 e 10= 5H5.



### 3.3.5 Adenovirus

Nel corso degli esami virologici condotti in colture cellulari sui campioni di pipistrello, è stato isolato su linea cellulare VERO E6 un agente virale citopatogeno identificato a seguito di approfondimenti diagnostici in microscopia elettronica e sequenziamento genomico come appartenente alla famiglia *Adenoviridae* A (Fig. 13). Il campione di origine era stato prelevato da un soggetto della specie *Hypsugo savii* consegnato morto al CRAS (conf. IZSLER n° 356061-39/2022). L'analisi BLAST della sequenza completa del genoma virale (31.735 pb), ottenuta tramite NGS con assemblaggio de novo ha mostrato un valore di identità nucleotidica di 99.98% con il ceppo Bat mastadenovirus B strain ITA/2018/251170-16 (GenBank: MK625182.1) identificato nel 2018 in un campione di intestino prelevato da un *Pipistrellus kuhlii* deceduto nel mese di giugno 2017 presso un CRAS nella medesima area (Diakoudi *et al.*, 2019). I virus sono altamente correlati (Id. nt 99%) al virus BtAdV-2\_PPV1\_JN252129 identificato in *Pipistrellus pipistrellus* in Germania nel 2011 (Kohl *et al.*, 2012).

Figura 13. A) Monostrato cellulare VERO E6 non infetto (ingrandimento 10X); B) Monostrato cellulare VERO E6 con ECP causato da BatAdV IT 356061-39/2022

(ingrandimento 10X); C) Immagine di Microscopia Elettronica (ME) in colorazione negativa. Particella virale riconducibile ad Adenovirus nel sovranatante di colture cellulari VERO E6.

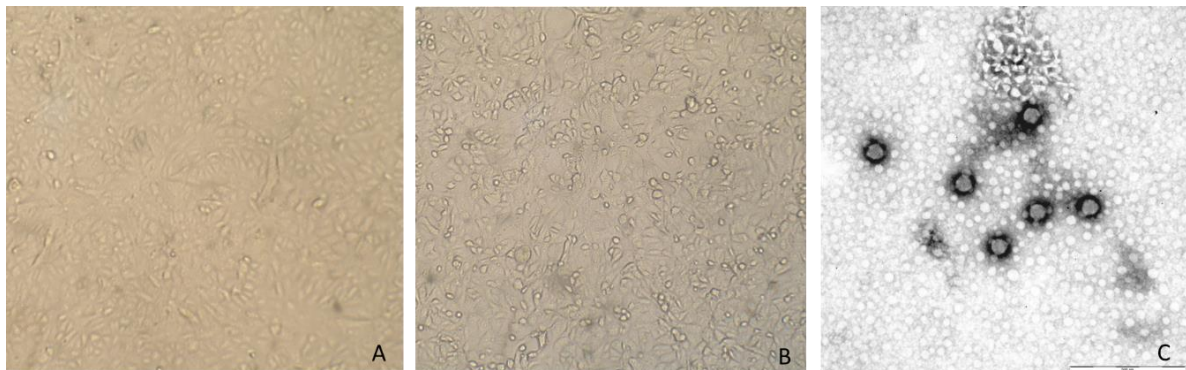
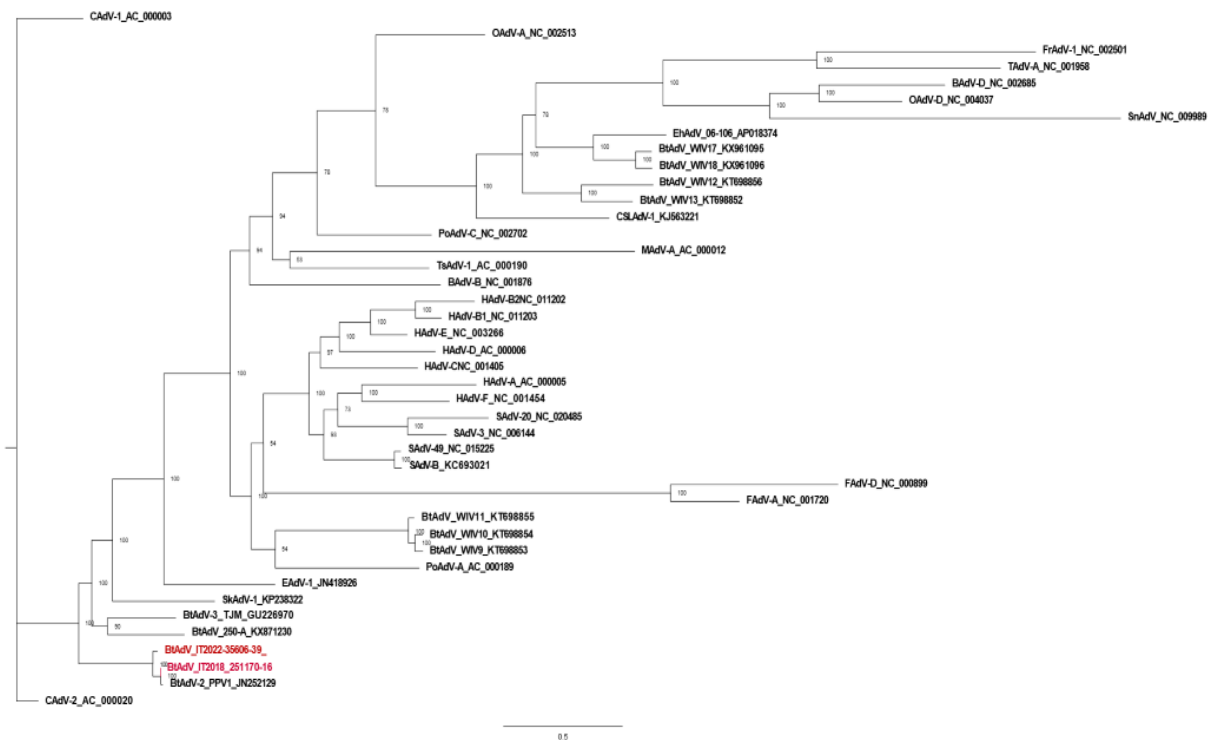


Figura 14. Analisi filogenetica basata sulle sequenze del genoma completo di ceppi di adenovirus rappresentativi. In rosso sono indicate le sequenze dei virus oggetto del presente studio. I numeri di accesso GenBank vengono forniti per i ceppi di riferimento.



## 4. Discussione

Un crescente numero di nuovi virus e nuove varianti virali sono stati identificati negli ultimi anni nei pipistrelli, ma diversi aspetti della relazione ancestrale tra pipistrelli e virus e il loro coinvolgimento nel mantenimento e nella diffusione delle infezioni restano ancora poco chiari (Letko *et al.*, 2020). La maggior parte delle specie virali identificate nei chiroteri sembra essere in realtà piuttosto specifica per l'ospite e con potenziale zoonotico limitato (Chen *et al.*, 2014; Letko *et al.*, 2020). Tuttavia, alcune famiglie virali associate ai pipistrelli rappresentano una reale minaccia per la salute pubblica a livello globale a causa della loro predisposizione ai fenomeni di mutazione e riassortimento, della comprovata capacità di andare incontro a spillover, della patogenicità, dell'assenza di trattamenti terapeutici o di vaccini; queste famiglie virali includono *Coronaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* (Letko *et al.*, 2020) e *Reoviridae*. Il crescente interesse da parte della comunità scientifica e dell'opinione pubblica nei confronti dei pipistrelli e degli agenti virali che essi ospitano è proprio legato in larga parte alla comprensione dei meccanismi che regolano il fenomeno del salto di specie e l'evoluzione genetica dei virus. Interesse che ha raggiunto senza dubbio l'apice in concomitanza della pandemia Covid-19 e che è rivolto a chiarire il ruolo dei pipistrelli nell'insorgenza di malattie infettive al fine di proteggere la salute umana e animale, ma anche la conservazione degli habitat e della fauna.

Complessivamente nell'ambito di questo studio sono stati raccolti, nel periodo 2020-2023, 702 campioni di pipistrello provenienti da 19 differenti specie. La specie di pipistrello di appartenenza è stata attribuita in prima istanza su base morfologica, ma per poter disporre di un dato certo e oggettivo si è proceduto all'identificazione anche su base genetica. Le difficoltà nell'identificazione di specie su base morfologica sono molteplici e risiedono principalmente in i) significativa somiglianza somatica tra alcune specie di pipistrelli ii) soggetti giovani con tratti tipici della specie difficilmente osservabili iii) congelamento o stato di conservazione non ottimale con perdita o alterazione delle caratteristiche somatiche tipiche (Korstian *et al.*, 2016). A questo proposito è importante sottolineare che l'identificazione molecolare ha permesso di rilevare specie non considerate o attribuite erroneamente ad altra specie sulla base della sola identificazione morfologica come *Plecotus macrobullaris*, *Myotis crypticus*, *Myotis mystacinus*, *Pipistrellus nathusii*. Le specie più rappresentate nello studio sono risultate invece essere *Pipistrellus kuhlii* (41,4%) e *Hypsugo savii* (37,7%) che appartengono alla famiglia dei *Vespertilionidae* e sono le più

frequentemente segnalate in Italia nelle aree urbane (Russo e Jones, 2003) e quindi anche quelle che con più facilità vengono ritrovate e soccorse dall'uomo e conferite ai centri di recupero.

In merito all'esame autoptico, nessuno dei pipistrelli esaminati ha presentato lesioni riconducibili macroscopicamente a malattie infettive e le lesioni più frequentemente riscontrate sono state di tipo traumatico come fratture e lacerazioni del patagio. È probabile che molte di queste lesioni siano state causate da predazione da gatto che è stata riconosciuta come la causa più frequente di ospedalizzazione dei pipistrelli nei centri di recupero della fauna selvatica italiana (Ancillotto *et al.*, 2013). Questo aspetto rappresenta una preoccupazione non solo dal punto di vista conservazionistico, ma anche sanitario per la possibile trasmissione di patogeni dall'ambiente selvatico agli animali domestici e all'uomo. Dalle indagini condotte per la ricerca di coronavirus COVs è stato ottenuto un dato di prevalenza del 4,84% che rientra nell'intervallo riscontrato in precedenti studi (Gloza-Rausch *et al.*, 2008). Nel complesso i risultati indicano che nelle popolazioni di pipistrelli presenti in Italia, circola una varietà di coronavirus appartenenti ai generi *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* e tra questi ultimi sia virus correlati ai SARS-CoVs che ai MERS-CoVs (SARS e MERS-related CoV). Nel corso delle indagini virologiche, SARS-related CoVs sono stati identificati esclusivamente nella specie *Rhinolophus hipposideros*. La sequenza completa del genoma virale è stata confrontata con quella di SARS-CoV-2 indicando complessivamente un livello di identità nucleotidica del 76,3% che presenta però valori molto inferiori (> divergenza) in corrispondenza della proteina spike di superficie dove sono presenti i siti di interazione con i recettori cellulari. Questo, unitamente alle risultanze dell'analisi filogenetica, è indicativo di quanto già suggerito da altri autori, ovvero che i SARS-CoVs che circolano nei pipistrelli che abbiamo analizzato e più in generale quelli presenti nei pipistrelli insettivori in Europa appartengono ad un clade distinto rispetto a quelli identificati nei pipistrelli asiatici (Kohl *et al.*, 2021) e non presentano le modifiche a carico delle strutture recettoriali della proteina spike tali da consentire il legame al recettore ACE2 delle cellule umane (Andersen *et al.*, 2020). Si sottolinea pertanto l'importanza di porre particolare attenzione allo studio delle sequenze genomiche e della struttura della proteina S per poter valutare la specificità del recettore e l'affinità di legame come elementi chiave per comprendere la biologia dei virus derivati dai pipistrelli, la loro potenziale minaccia per la salute umana e il loro percorso evolutivo.

Quanto detto è valido anche per i CoVs correlati ai virus MERS (MERS-related CoVs) identificati nel corso dello studio in pipistrelli Vespertilionidi delle specie *Hypsugo savii* e

*Pipistrellus kuhlii*. Questi risultano essere correlati a virus identificati in anni precedenti nella stessa area per i quali le analisi molecolari della sequenza proteica S non hanno dimostrato affinità per il recettore umano DPP4 utilizzato da MERS-CoV per l'ingresso nelle cellule. (Moreno *et al.*, 2017). Sono stati inoltre rilevati, negli anni 2021 e 2023, alphacoronavirus caratterizzati da elevata eterogeneità nelle specie *Pipistrellus kuhlii*, *Hypsugo savii*, *Miniopterus schreibersii*, *Myotis crypticus* e *Plecotus auritus* e originariamente provenienti dalle province di Lecco, Bergamo, Brescia, Cesena e Rimini.

La presenza di *Mammalian orthoreovirus* (MRV) è stata rilevata in 26 campioni appartenenti alle 6 specie *Pipistrellus kuhlii* (10), *Hypsugo savii* (8), *Pipistrellus pipistrellus* (1), *Rhinolophus hipposideros* (1), *Tadarida teniotis* (1), *Eptesicus serotinus* (1). Otto di questi reovirus sono stati isolati in coltura cellulare e quattro sono stati selezionati per il sequenziamento completo del genoma virale tramite NGS. A seguito delle dell'analisi delle sequenze sono stati assegnati al sierotipo 1 l'isolato denominato Bat-MRV1-IT 228741-14/2021 e al sierotipo 3 i virus Bat-MRV3-IT 135087/2023, Bat-MRV3-IT 149076-10/2023, Bat-MRV3-IT 149076-10/2023. Questi ultimi presentano un profilo genetico indicativo di possibile riassortimento genico con altri stipiti virali MRV e nel complesso l'indagine conferma ulteriormente la circolazione di *Mammalian Orthoreovirus* nei chiroteri nel territorio italiano. A causa della loro apparente mancanza di barriere di specie, della loro ampia distribuzione geografica, della buona resistenza ambientale e della loro suscettibilità al riassortimento genico (Leary *et al.*, 2002; Lelli *et al.*, 2015), i MRVs sono candidati eccellenti per un possibile spillover dagli animali all'uomo e viceversa.

Gli esami condotti nel corso dello studio per la ricerca dei lyssavirus sono risultati tutti negativi. A questo proposito è importante specificare che le specie target per la sorveglianza dei due lyssavirus maggiormente diffusi nelle popolazioni di chiroteri in Europa (EBLV-1, EBLV-2) non rientrano nel campionamento e sebbene questi virus non siano mai stati rilevati in Italia, la loro presenza è stata dimostrata su base sierologica (Leopardi *et al.*, 2018) e pertanto la sorveglianza dovrebbe essere potenziata. Il caso del gatto di Arezzo, infetto da WCBLV e citato nella prima parte di questa tesi, è una dimostrazione di come l'allerta e la sorveglianza per lyssavirus debba rimanere sempre elevata anche in paesi con status di rabbia indenne come l'Italia (Leopardi *et al.*, 2021) e di come un un predatore come il gatto possa rappresentare un importante punto di contatto e di trasmissione di agenti zoonotici tra uomo e pipistrelli (Salinas-Ramos *et al.*, 2021).

Un'ulteriore evidenza dell'efficacia del sistema di sorveglianza implementato nell'ambito del progetto è data dall'isolamento del virus *Issyk-Kul* (ISKV) da un pool di organi di un pipistrello appartenente alla specie *Hypsugo savii* deceduto presso uno dei centri di recupero. Porzioni del genoma di ISKV sono state rilevate anche in *Eptesicus nilssonii* in Germania (Brinkmann *et al.*, 2020) e in *Myotis brandtii* in Svezia (Cholletti *et al.*, 2022) suggerendo l'estensione dell'areale geografico di ISKV all'Europa. L'emergere di questo agente zoonotico negletto nell'area del mediterraneo presuppone una sensibilizzazione sui possibili rischi derivanti da questo virus e dovrebbe suggerire l'adozione di programmi specifici di sorveglianza e prevenzione. Inoltre, le analisi genomiche condotte soprattutto a carico del gene M suggeriscono che IT-ISKV potrebbe rappresentare una nuova variante di ISKV dell'area del mediterraneo derivata da possibili fenomeni di riassortimento con un virus ancora sconosciuto.

In aggiunta, le sequenze ISKV identificate in Italia sono state rilevate in pool di organi indicando un'infezione di tipo sistemico dei pipistrelli e non la semplice presenza di tracce di genoma a livello intestinale. Future indagini potranno fornire maggiori informazioni sulla distribuzione tissutale del virus e sulla patogenesi e potrebbero definire la prevalenza dell'infezione nelle popolazioni di pipistrelli mediante lo sviluppo di test diagnostici specifici. A questo scopo, è stato sviluppato nel corso dello studio un test molecolare specifico per l'identificazione di ISKV in campioni biologici attraverso il quale sono stati testati 415 pipistrelli raccolti nel periodo 2017-2023 ottenendo un dato preliminare di prevalenza dell'infezione pari a 1,92%. Con lo stesso obiettivo sono stati prodotti e caratterizzati anticorpi monoclonali (mAb) anti-ISKV al fine di valutarne il loro possibile impiego per lo sviluppo di strumenti diagnostici in grado di identificare con precisione la presenza e la diffusione di questo patogeno zoonotico emergente. Inoltre, la produzione dell'antigene ricombinante NP di ISK (principale bersaglio della risposta immunitaria umorale) e il suo utilizzo in associazione ai mAb prodotti, offre indiscutibili vantaggi per lo sviluppo di test diagnostici robusti superando al contempo i problemi di biosicurezza dovuti all'uso di antigeni virali.

La sorveglianza attiva delle colonie di pipistrelli non è stata considerata in questo studio, che è stato condotto in un contesto di sorveglianza passiva in collaborazione con i centri di recupero della fauna selvatica. Il successo nell'isolamento virale di 8 MRV, di ISKV e di un adenovirus dimostra che gli esperti coinvolti in campo hanno conferito al laboratorio campioni di buona qualità per le analisi virologiche. Inoltre il successo dell'isolamento virale in coltura cellulare per questi virus suggerisce non solo la presenza di RNA o DNA virale

non infettante, ma anche la presenza e possibile eliminazione di particelle virali infettive, punto cruciale per una corretta valutazione dei rischi zoonosici che possono emergere dai pipistrelli.

## **5. Conclusioni**

I risultati ottenuti contribuiscono alla definizione delle principali infezioni virali nelle popolazioni di pipistrelli analizzati che sono risultati essere ospiti e carrier di una varietà di Coronavirus, Orthoreovirus, ma anche di virus zoonotici emergenti come ISKV veicolati da specie di pipistrello sinantropiche, presenti nelle aree urbane e quindi con potenziali implicazioni in sanità pubblica.

Risulta chiaro che un approccio integrato secondo la visione One Health che considera la salute e il benessere dell'uomo, degli animali e dell'ambiente inestricabilmente legati e reciprocamente influenzati, è oggi imprescindibile per la gestione delle problematiche sanitarie ed in particolare delle malattie emergenti a carattere zoonotico. L'impatto umano sembra essere il principale determinante che, interferendo con la fauna selvatica e i patogeni correlati, porta a un contatto sempre più frequente tra esseri umani e agenti zoonotici. E' importante sottolineare che nella nostra realtà, la possibilità di contatto diretto tra uomo e pipistrello rimane comunque un evento non frequente per le persone che non siano professionalmente esposte ai chiroteri come speleologi e ricercatori o studiosi di ecologia e conservazione dei pipistrelli.

Attraverso i risultati ottenuti da questo studio si vuole sottolineare l'importanza di proseguire lo studio dei virus associati ai chiroteri promuovendo gli studi di "virus discovery" e di caratterizzazione dei nuovi virus non ancora classificati e associati a malattia. Questo perché al verificarsi di episodi di malattie infettive emergenti, le informazioni sui virus correlati (di tipo genetico ed antigenico) sono di fondamentale importanza per lo sviluppo di metodi diagnostici e la messa in atto di contromisure rapide ed efficaci.

## 6. Disseminazione dei risultati

I risultati degli studi condotti sono stati oggetto di tre articoli pubblicati su riviste scientifiche peer reviewed e di sei contributi scientifici presentati e pubblicati su atti di convegni internazionali. Nel periodo del Corso di Dottorato i risultati sono stati inoltre oggetto di presentazioni a corsi, seminari e workshop.

### Congressi internazionali

1. Lelli D, Moreno A, Trogu T, Sozzi E, Canziani S, Mauri M, Cavallari L, Chiapponi C, Lavazza A. 2022. Isolation and Genome Characterization of Bat-borne Issyk-Kul Virus in Italy. *12th International Congress for Veterinary Virology - ESVV 2022*, 20 -23th September - Ghent (Belgium). Congress proceedings.
2. Moreno A, Canziani S, Manzelli L, Trogu T, Tolini C, Salvato S, Castelli A, Sozzi, E, Lavazza A, Martinelli N, Lelli D. 2022. Coronavirus surveillance in bats in the Covid-19 era, Italy 2020-21. *14th Annual meeting EPIZONE «NEW HORIZONS NEW CHALLENGES»*, 18-20th May - Barcelona (Spain), Congress proceedin.gs
3. Lelli D, Moreno A, Trogu T, Sozzi E, Canziani S, Mauri M, Cavallari L, Chiapponi C, Lavazza A. 2022. Bat-borne Issyk-Kul virus in Italy: isolation and genome characterization. *3rd International Symposium on Infectious Diseases of Bats*, 24-27th July - Colorado State University Fort Collins, (Colorado). Congress proceedings.
4. Canziani S, Castelli A, Faccin F, Soliani L, Trogu T, Sozzi E, Chiapponi C, Moreno M, Lavazza A, Lelli D. 2023. Bat-borne Issyk-Kul virus: European expansion of a zoonotic agent? *15th Annual meeting EPIZONE*, 26-28th April, 2023 – Novi Sad, (Serbia), Congress proceedings.
5. Lelli D, Canziani S, Carrera M, Castelli A, Corsa M, G, Faccin F, Trogu T, Sozzi E, Moreno A, Lavazza A. Bat-borne Issyk-Kul virus in Italy: European emergence of a neglected zoonotic agent. *15th Scientific Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA 2024)*, September 9th-13th 2024, Stralsund (Germany), Congress proceedings, 73:152.
6. Castelli A, Corsa M, Soldati R, Facchini E, Maccarinelli F, Benevenia R, Lelli D, Pezzoni G. Production of monoclonal antibodies against bat-borne emerging zoonotic Issyk-kul virus. *EPIZONE 16th Annual Meeting*, 25-27 September 2024, Uppsala (Sweden), Congress proceedings.

#### Articoli pubblicati su riviste scientifiche peer reviewed

1. Lelli D, Moreno A, Canziani S, Soliani L, Carrera M, Castelli A, Faccin F, Trogu T, Sozzi E, Cavallari GL, Mauri M, Ferrari F, Salogni C, Garbarino C, Chiapponi C, Farioli M, Lavazza A. 2024. Isolation of Batborne Neglected Zoonotic Agent Issyk-Kul Virus, Italy. *Emerg Infect Dis*, 30(4):786-790. doi: 10.3201/eid3004.231186.
2. Colombino E, Lelli D, Canziani S, Quaranta G, Guidetti C, Leopardi L, Robetto S, De Benedictis P, Orusa R, von Degerfeld MM, Capucchio MT. 2023. Main causes of death of free-ranging bats in Turin province (North-western Italy): gross and histological findings and emergent virus surveillance. *BMC Veterinary Research*, 19:200. doi: 10.1186/s12917-023-03776
3. Leopardi S et al., 2023. One health surveillance strategy for coronaviruses in Italian wildlife. *Epidemiol Infect*, 151:e96. doi: 10.1017/S095026882300081X.

#### Corsi, seminari e workshop

1. Sperimentazione e ricerca avanzata in IZSLER “Patogeni virali emergenti in popolazioni di chiroteri: indagini eco-epidemiologiche a tutela della salute pubblica e della biodiversità”. Corso Fad 2024 organizzato dalla Fondazione iniziative zooprofilattiche, Brescia.
2. Si può prevedere la prossima pandemia? Esperti a confronto a cura di IZS. I pipistrelli e gli spillover. Festival sulla Salute Planetaria (Planetary Health Festival) – Verona, 3-5 ottobre 2024.
3. Aggiornamenti nelle attività di Laboratorio in Sanita’ Animale - 1^ Edizione. “Patogeni virali emergenti nelle popolazioni di pipistrelli in Regione Lombardia: indagini eco epidemiologiche a tutela della salute pubblica e della biodiversità”. Aula Reparto Virologia IZSLER – Brescia, 4 dicembre 2023.
4. Training on Biorisk Management supported by IAEA - Isolation and identification of viral pathogens from bats and of zoonotic agents. IZSLER - Brescia, 27 settembre 2023.
5. COVIDinPET - SARS-CoV-2 e non solo: i dati in sintesi “Non solo SARS-CoV-2: animali selvatici come possibili serbatoi di patogeni virali emergenti”. Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali (DIVAS) Via dell’Università, 6 Lodi, 07 Ottobre2022.

6. EJIP COVRIN Final Meeting. ST4.3.3 Coronavirus contamination in wildlife. Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria (CIIV) - IZSAM Teramo, 5-6 dicembre 2022.

## 7. Bibliografia

1. Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. 2020. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, 9(5):331. doi: 10.3390/pathogens9050331.
2. Amoroso MG, Russo D, Lanave G, Cistrone L, Pratelli A, Martella V, Galiero G, Decaro N, Fusco G. 2018. Detection and phylogenetic characterization of astroviruses in insectivorous bats from Central-Southern Italy. *Zoonoses Public Health*, 65(6):702-710. doi: 10.1111/zph.12484.
3. Ancillotto L, Serangeli MT, Russo D. 2013. Curiosity Killed the Bat: Domestic Cats as Bat Predators. *Mammalian Biology*, 78(5):369-73. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.01.003>.
4. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. 2020. The Proximal Origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 26(4):450–52. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
5. Atkinson B, Marston DA, Ellis RJ, Fooks AR, Hewson R. 2015. Complete genomic sequence of Issyk-Kul virus. *Genome Announc*, 3(4):e00662–00715. [10.1128/genomeA.00662-15](https://doi.org/10.1128/genomeA.00662-15).
6. Baker ML, e Schountz T. 2018. Mammalia: Chiroptera: Immunology of Bats. In *Advances in Comparative Immunology*, a cura di Edwin L. Cooper, 839–62. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_23).
7. Balboni A, Gallina L, Palladini A, Prosperi S, Battilani M. 2012. A real-time PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian greater horseshoe bat faecal sample surveys. *Scientific World Journal*, 2012:989514. doi: 10.1100/2012/989514.
8. Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, Frieman M, Mossman K. 2019. Bats and Coronaviruses. *Viruses*, 11(1):41. doi: 10.3390/v11010041.
9. Banyard A, Fooks A. 2017. The impact of novel lyssavirus discovery. *Microbiology Australia* 38(1): NULL. <https://doi.org/10.1071/MA17006>.
10. Banyard AC, Evans JS, Luo TR, Fooks AR. 2014. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses*, 6(8):2974–90. <https://doi.org/10.3390/v6082974>.
11. Banyard, A. C., Evans, J. S., Luo, T. R. & Fooks, A. R. 2014. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses* 6, 2974–2990 (2014).

12. Brinkmann A, Kohl C, Radonić A, Dabrowski PW, Mühldorfer K, Nitsche A, *et al.* 2020. First detection of bat-borne Issyk-Kul virus in Europe. *Sci Rep*, 10:22384. [10.1038/s41598-020-79468-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-79468-8).
13. Bulychev VP, Alekseev AN, Kostiuikov MA, Gordeeva ZE, L'vov DK. 1979. Issyk-Kul virus transmission by *Aedes caspius caspius* Pall. mosquitoes via experimental bite [in Russian]. *Med Parazitol (Mosk)*, 48:53–6.
14. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. 2006. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.
15. Chappell J, Duncan R, Mertens P, Dermody T. 2005. Genus Orthoreovirus. In: Fauquet, Claude M, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp 455-465. Elsevier Academic Press. London.
16. Chen L, Liu B, Yang J, Jin Q. 2014. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database (Oxford)*, 2014:bau021. doi: 10.1093/database/bau021.
17. Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. 2011. Avian Coronavirus in Wild Aquatic Birds. *Journal of Virology*, 85(23):12815-20. doi:10.1128/JVI.05838-11.
18. Chua KB, Crameri G, Hyatt A, Yu M, Tompang MR, Rosli J, McEachern J, Crameri S, Kumarasamy V, Eaton BT, Wang LF. 2007. A Previously Unknown Reovirus of Bat Origin Is Associated with an Acute Respiratory Disease in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(27):11424-9. doi: 10.1073/pnas.0701372104.
19. Chua KB, Koh CL, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, Chua BH, Chan YP, Lim ME, Lam SK. 2002. Isolation of Nipah Virus from Malaysian Island Flying-Foxes. *Microbes and Infection* 4(2):145–51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01522-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01522-2).
20. Dacheux L, Larrous F, Mailles A, Boisseleau D, Delmas O, Biron C, Bouchier C, Capek I, Muller M, Ilari F, Lefranc T, Raffi F, Goudal M, Bourhy H. 2009. European bat lyssavirus transmission among cats, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 280–284. doi: 10.3201/eid1502.080637.
21. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic Environmental Change and the Emergence of Infectious Diseases in Wildlif». *Acta Tropica* 78(2):103–16. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0).
22. Dato VM, Campagnolo ER, Long J, Rupprecht CE. 2016. A Systematic Review of Human Bat Rabies Virus Variant Cases: Evaluating Unprotected Physical Contact with

- Claws and Teeth in Support of Accurate Risk Assessment. *PLoS ONE*, 11(7):e0159443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159443>.
23. Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. 2007. Validation of the Barcoding Gene COI for Use in Forensic Genetic Species Identification. *Forensic Science International*, 173(1):1–6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.09.013>.
  24. De Benedictis P, Marciano S, Scaravelli D, Priori P, Zecchin B, Capua I, Monne I, Cattoli G. 2014. Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus Genes*, 48(2):366–71. doi: 10.1007/s11262-013-1008-x.
  25. Decaro N, Campolo M, Desario C, Ricci D, Camero M, Lorusso E, Elia G, Lavazza A, Martella V, Buonavoglia C. 2005. Virological and molecular characterization of a mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet Microbiol*, 109(1-2):19-27. doi:10.1016/j.vetmic.2005.05.014.
  26. Diakoudi G, Lanave G, Moreno A, Chiapponi C, Sozzi E, Prosperi A, Larocca V, Losurdo M, Decaro N, Martella V, Lavazza A, Lelli D. 2019. Surveillance for Adenoviruses in Bats in Italy. *Viruses*, 11(6):E523. doi:10.3390/v11060523.
  27. Dietz C, Helversen O. 2004. Illustrated Identification key to the Bats of Europe. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3908.5606>.
  28. Duncan R. 1999. Extensive Sequence Divergence and Phylogenetic Relationships between the Fusogenic and Nonfusogenic Orthoreoviruses: A Species Proposal. *Virology*, 260(2):316–28. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9832>.
  29. Fenton Brock M, Simmons N. 2015. *Bats: A world of science and mystery*. University of Chicago Press, ISBN-13: 978-0-226-06512-0.
  30. Field HE. 2016. Hendra Virus Ecology and Transmission. *Current Opinion in Virology* 16:120–25. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.02.004>.
  31. Fooks AR, McElhinney LM, Pounder DJ, Finnegan CJ, Mansfield K, Johnson N, Brookes SM, Parsons G, White K, McIntyre PG, Nathwani D. 2003. Case report: Isolation of a European bat lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis. *J. Med. Virol*, 71:281–289. doi: 10.1002/jmv.10481.
  32. Gigante CM, Dettinger L, Powell JW, Seiders M, Condori REC, Griesser R, Okogi K, Carlos M, Pesko K, Breckenridge M, Simon EMM, Chu MYJV, Davis AD, Brunt SJ, Orciari L, Yager P, Carson WC, Hartloge C, Saliki JT, Sanchez S, Deldari M, Hsieh K, Wadhwa A, Wilkins K, Peredo VY, Rabideau P, Gruhn N, Cadet R, Isloor S, Nath SS, Joseph T, Gao J, Wallace R, Reynolds M, Olson VA, Li Y. 2018. Multi-site evaluation

- of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. *PLoS One*, 13(5):e0197074. doi:10.1371/journal.pone.0197074.
33. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Götsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C. 2008. Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4):626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>.
  34. Guarner J. 2020. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades. *Am J Clin Pathol*, 9;153(4):420-421. doi: 10.1093/ajcp/aqaa029.
  35. Gurley ES, Montgomery JM, Hossain MJ, Bell M, Azad AK, Islam MR, Molla MA, Carroll DS, Ksiazek TG, Rota PA, Lowe L, Comer JA, Rollin P, Czub M, Grolla A, Feldmann H, Luby SP, Woodward JL, Breiman RF. 2007. Person-to-Person Transmission of Nipah Virus in a Bangladeshi Community. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7):1031–37. <https://doi.org/10.3201/eid1307.061128>.
  36. Halpin K, Young PL, Field HE, Mackenzie JS. 2000. Halpin, K., P. L. Young, H. E. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology*, 81 (8): 1927–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.
  37. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, Barrat J, Blanton JD, Briggs DJ, Cleaveland S, Costa P, Freuling CM, Hiby E, Knopf L, Leanes F, Meslin FX, Metlin A, Miranda ME, Müller T, Nel LH, Recuenco S, Rupprecht CE, Schumacher C, Taylor L, Vigilato MA, Zinsstag J, Dushoff J; Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies Prevention. 2015. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Neg. Trop Dis*, 16;9(4):e0003709. doi: 10.1371/journal.pntd.0003709.
  38. Johnson N, Vos A, Freuling C, Tordo N, Fooks AR, Müller T. 2010. Human Rabies Due to Lyssavirus Infection of Bat Origin. *Veterinary Microbiology*, 142(3):151–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.001>.
  39. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global Trends in Emerging Infectious Diseases. *Nature*, 451(7181):990–93. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
  40. Kohl C, Lesnik R, Brinkmann A, Ebinger A, Radonić A, Nitsche A, Mühldorfer K, Wibbelt G, Kurth A. 2012. Isolation and Characterization of Three Mammalian Orthoreoviruses from European Bats. *PLoS ONE*, 7(8):e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>.
  41. Kohl C, Nitsche A, Kurth A. 2021. Update on Potentially Zoonotic Viruses of European Bats. *Vaccines*, 9(7): 690. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070690>.

42. Korstian J, Hale A, Bennett T, Williams D. 2016. Using DNA barcoding to improve bat carcass identification at wind farms in the United States. *Conservation Genetics Resources*, 27–34. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0509-4>.
43. Kostiukov MA, Bulychev VP, Lapina TF. 1982. Experimental infection of *Aedes caspius* Pall. mosquitoes on dwarf bats, *Vespertilio pipistrellus*, infected with the Issyk-Kul virus and its subsequent transmission to susceptible animals [in Russian]. *Med Parazitol (Mosk)*, 51:78–9.
44. Kuhn JH, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Bergeron É, Burt F, Ergünay K, et al. 2024. ICTV Virus Taxonomy Profile: Nairoviridae 2024. *The Journal of General Virology*, 105(4). doi:10.1099/jgv.0.001974.
45. L'vov DK, Kostiukov MA, Daniyarov OA, Tukhtaev TM, Sherikov BK. 1984. Outbreak of arbovirus infection in the Tadzhik SSR due to the Issyk-Kul virus (Issyk-Kul fever) [in Russian]. *Vopr Virusol*, 29:89–92.
46. Lavazza, A, Pascucci S, Gelmetti D. 1990. Rod-Shaped Virus-like Particles in Intestinal Contents of Three Avian Species. *The Veterinary Record*, 126 (23):581. PMID: 2368308.
47. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Cruz AT, Wetzel JD, Desai SM, Mushahwar IK, Dermody TS. 2002. Detection of Mammalian Reovirus RNA by Using Reverse Transcription-PCR: Sequence Diversity within the  $\lambda 3$ -Encoding L1 Gene. *J Clin Microbiol*. 40(4):1368–75. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1368-1375.2002>.
48. Lei M, Dong D. 2016. Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. *Scientific Reports*, 6:27726. <https://doi.org/10.1038/srep27726>.
49. Lelli D, Moreno A, Canziani S, Soliani L, Carrera M, Castelli A, Faccin F, Trogu T, Sozzi E, Cavallari GL, Mauri M, Ferrari F, Salogni C, Garbarino C, Chiapponi C, Farioli M, Lavazza A. 2024. Isolation of Batborne Neglected Zoonotic Agent Issyk-Kul Virus, Italy. *Emerg Infect Dis*, 30(4):786-790. doi: 10.3201/eid3004.231186.
50. Lelli D, Lavazza A, Prosperi A, Sozzi E, Faccin F, Baioni L, Trogu T, et al. 2019. Hysugopoxvirus: A Novel Poxvirus Isolated from *Hypsugo Savii* in Italy. *Viruses*, 11 (6):568. <https://doi.org/10.3390/v11060568>.
51. Lelli D, Moreno A, Steyer A, Naglič T, Chiapponi C, Prosperi A, Faccin F, Sozzi E, Lavazza A. 2015. Detection and Characterization of a Novel Reassortant Mammalian Orthoreovirus in Bats in Europe. *Viruses*, 7(11):5844–54. <https://doi.org/10.3390/v7112908>.

52. Lelli D, Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. 2013. Detection of Coronaviruses in Bats of Various Species in Italy. *Viruses*, 5(11):2679–89. <https://doi.org/10.3390/v5112679>.
53. Lelli D, Prosperi A, Moreno A, Chiapponi C, Gibellini AM, De Benedictis P, Leopardi S, Sozzi E, Lavazza A. 2018. Isolation of a novel Rhabdovirus from an insectivorous bat (*Pipistrellus kuhlii*) in Italy. *Virology Journal*, 15:37. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0949-z>.
54. Lelli, D, Moreno A, Lavazza A, Bresaola M, Canelli E, Boniotti MB, Cordioli P. 2013. Identification of Mammalian Orthoreovirus Type 3 in Italian Bats. *Zoonoses and Public Health*, 60 (1):84–92. <https://doi.org/10.1111/zph.12001>.
55. Leopardi S, Barneschi E, Manna G, Zecchin B, Priori P, Drzewnioková P, Festa F, Lombardo A, Parca F, Scaravelli D, Maroni Ponti A, De Benedictis P. 2021. Spillover of West Caucasian Bat Lyssavirus (WCBV) in a Domestic Cat and Westward Expansion in the Palearctic Region. *Viruses*, 13(10):2064. <https://doi.org/10.3390/v13102064>.
56. Leopardi S, P. Priori, B. Zecchin, G. Poglayen, K. Trevisiol, D. Lelli, S. Zoppi, *et al.* 2018. Active and passive surveillance for bat lyssaviruses in Italy revealed serological evidence for their circulation in three bat species. *Epidemiology and Infection*, 147:e63. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003072>.
57. Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. 2020. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8):461-471. doi: 10.1038/s41579-020-0394-z.
58. Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL, Webb CT. 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci*, 280(1756):20122753. doi: 10.1098/rspb.2012.2753.
59. Lvov DK, Karas FR, Timofeev EM, Tsyarkin YM, Vargina SG, Veselovskaya OV, *et al.* 1973. “Issyk-Kul” virus, a new arbovirus isolated from bats and *Argas (Carios) vespertilionis* (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch*, 42:207–9. 10.1007/BF01270841.
60. Moratelli R, Calisher CH. 2015. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(1):1-22. doi: 10.1590/0074-02760150048.
61. Moreno A, Lelli D, de Sabato L, Zaccaria G, Boni A, Sozzi E, Prosperi A, Lavazza A, Cella E, Castrucci MR, Ciccozzi M, Vaccari G. 2017. Detection and full genome

- characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virology Journal*, 14:239. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0907-1>.
62. Morse, S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect. Dis* 1(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>.
  63. Müller T, Cox J, Peter W, Schäfer R, Johnson N, McElhinney LM, Geue JL, Tjørnehøj K, Fooks AR. 2004. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51:(2):49-54. doi: 10.1111/j.1439-0450.2003.00725.x.
  64. Murray K, Rogers R, Selvey L, Selleck P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Hooper P, Westbury H. 1995. A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1):31–33. doi: 10.3201/eid0101.950107.
  65. Naglič T, Rihtarič D, Hostnik P, Toplak N, Koren S, Kuhar U, Jamnikar-Ciglencečki U, Kutnjak D, Steyer A. 2018. Identification of novel reassortant mammalian orthoreoviruses from bats in Slovenia. *BMC Vet Res*, 14(1):264. doi:10.1186/s12917-018-1585-y.
  66. Nokireki T, Tammiranta N, Kokkonen UM, Kantala T, Gadd T. 2018. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound. Emerg. Dis*, 65;593–596. doi: 10.1111/tbed.12833.
  67. O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DT, Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JL. 2014. Bat Flight and Zoonotic Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5):741–45. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>.
  68. Ozeki T, Abe H, Ushijima Y, Nze-Nkogue C, Akomo-Okoue EF, Ella GWE, *et al.* 2022. Identification of novel orthonairoviruses from rodents and shrews in Gabon, Central Africa. *J Gen Virol*, 103:103. 10.1099/jgv.0.001796.
  69. Pawan JL. 1959. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus Rotundus Murinus*). *Caribb Med J*, 21:110-36. PMID:13858519.
  70. Plowright R, Susanne K, Sokolow H, Gorman ME, Daszak P, Foley JE. 2008. Causal Inference in Disease Ecology: Investigating Ecological Drivers of Disease Emergence. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(8):420–29. <https://doi.org/10.1890/070086>.
  71. Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, Middleton D, Reid PA, McFarlane RA, Martin G, Tabor GM, Skerratt LF, Anderson DL, Cramer G, Quammen D, Jordan D, Freeman P, Wang LF, Epstein JH, Marsh GA, Kung NY,

- McCallum H. 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc Biol Sci*, 282(1798):20142124. doi:10.1098/rspb.2014.2124.
72. Pons-Salort M, Serra-Cobo J, Jay F, López-Roig M, Lavenir R, Guillemot D, Letort V, Bourhy H, Opatowski L. 2014. Insights into persistence mechanisms of a zoonotic virus in bat colonies using a multispecies metapopulation model. *PLoS One*, 9(4):e95610. doi: 10.1371/journal.pone.0095610.
73. Rizzo F, Edenborough KM, Toffoli R, Culasso P, Zoppi S, Dondo A, Robetto S, Rosati S, Lander A, Kurth A, Orusa R, Bertolotti L, Mandola ML. 2017. Coronavirus and paramyxovirus in bats from Northwest Italy. *BMC Veterinary Research*, 13:396. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1307-x>.
74. Rodriguez-Morales AJ, Bonilla-Aldana DK, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Sah R, Paniz-Mondolfi A, Pagliano P, Esposito S. 2020. History Is Repeating Itself: Probable Zoonotic Spillover as the Cause of the 2019 Novel Coronavirus Epidemic. *Infez Med*, 28(1):3-5. PMID:32009128.
75. Ruiz-Aravena M, McKee C, Gamble A, Lunn T, Morris A, Snedden CE, Yinda CK, Port JR, Buchholz DW, Yeo YY, Faust C, Jax E, Dee L, Jones DN, Kessler MK, Falvo C, Crowley D, Bharti N, Brook CE, Aguilar HC, Peel AJ, Restif O, Schountz T, Parrish CR, Gurley ES, Lloyd-Smith JO, Hudson PJ, Munster VJ, Plowright RK. 2021. Ecology, Evolution and Spillover of Coronaviruses from Bats. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5):299-314. doi:10.1038/s41579-021-00652-2.
76. Rupprecht CE, Barrett J, Briggs D, Cliquet F, Fooks AR, Lumlerdacha B, Meslin FX, Müller T, Nel LH, Schneider C, Tordo N, Wandeler AI. 2008. Can Rabies Be Eradicated? *Dev Biol (Basel)*, 131:95-121. PMID: 18634470
77. Russo D, Billington G, Bontadina F, Dekker J, Dietz M, Gazaryan S, Jones G, Meschede A, Rebelo H, Reiter G, Ruczyński I, Tillon L, Twisk P. 2016. Identifying Key Research Objectives to Make European Forests Greener for Bats. *Frontiers in Ecology and Evolution*, Volume 4–2016. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.000874>.
78. Russo D, Jones G. 2003. Use of foraging habitats by bats in a Mediterranean area determined by acoustic surveys: Conservation implications. *Ecography*, 26:197–209. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0587.2003.03422.x>.
79. Ryu S, Kim BI, Lim JS, Tan CS, Chun BC. 2017. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 50(6):411–14. <https://doi.org/10.3961/jpmp.17.097>.

80. Schrag SJ, Wiener P. 1995. Emerging Infectious Disease: What Are the Relative Roles of Ecology and Evolution? *Trends in Ecology & Evolution*, 10(8):19–24. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(00\)89118-1](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(00)89118-1).
81. Subudhi S, Rapin N, Misra V. 2019. Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses*, 11(2):192. doi: 10.3390/v11020192.
82. Takumi K, Lina PH, VAN DER Poel WH, Kramps JA, VAN DER Giessen JW. 2009. Public health risk analysis of European bat lyssavirus infection in The Netherlands. *Epidemiol Infect*, 137:803–809. doi: 10.1017/S0950268807000167.
83. Teeling EC, Jones G, Rossiter SJ. 2016. Phylogeny, Genes, and Hearing: Implications for the Evolution of Echolocation in Bats. In *Bat Bioacoustics*, a cura di M. Brock Fenton, Alan D Grinnell, Arthur N. Popper, e Richard R. Fay, 25–54. *Springer Handbook of Auditory Research*, New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3527-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3527-7_2).
84. Tjørnehøj K, Fooks AR, Agerholm JS, Rønsholt L.. 2006. Natural and Experimental Infection of Sheep with European Bat Lyssavirus Type-1 of Danish Bat Origin. *J. Comp. Pathol*, 134:190–201. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.10.005.
85. Tsagkogeorga G, Parker J, Stupka E, Cotton JA, Rossiter SJ. 2013. Phylogenomic Analyses Elucidate the Evolutionary Relationships of Bats. *Current Biology*, 23(22):2262–67. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.014>.
86. Tyler KL. 2001. Mammalian reoviruses». In: Knipe, D. M., and Howley, P. M. (eds), *Fields Virology 4th edn*, pp. 1729–1745. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
87. Uhrin, Marcel, Ulrich Hüttmeir, Marina Kipson, Péter Estók, Konrad Sachanowicz, Szilárd Lehel Bücs, Branko Karapandža, *et al.* 2016. Status of Savi's pipistrelle *Hypsugo savii* (Chiroptera) and range expansion in Central and south-eastern Europe: A review. *Mammal Review*, 46:1–16. <https://doi.org/10.1111/mam.12050>.
88. Walker PJ, Blasdell KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, Longdon B, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Vasilakis N, Whitfield AE, Ictv Report Consortium. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *J Gen Virol*. 99(4):447-448. doi: 10.1099/jgv.0.001020.
89. Wang, Lin-Fa. 2009. Bats and viruses: a brief review. *Virologica Sinica*, 24(2):93–99. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3032-5>.
90. Weiner HL, Fields BN. 1977. Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 146(5):1305–10. doi: 10.1084/jem.146.5.1305.

91. Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T. 2001. Nipah Virus Infection in Bats (Order Chiroptera) in Peninsular Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3):439–41. <https://doi.org/10.3201/eid0703.010312>.
92. Young PL, Halpin K, Selleck PW, Field H, Gravel JL, Kelly MA, Mackenzie JS. 1996. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerging Infectious Diseases* 2(3): 39–40. doi: 10.3201/eid0203.960315.