

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET/05

TITOLO TESI

**Virus a RNA e a DNA: importanza dell'ampliamento
dello spettro d'ospite nell'evoluzione virale**

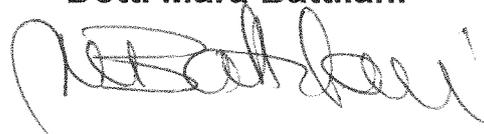
Presentata da: Dott. Andrea Balboni

Coordinatore Dottorato


Prof. Giovanni Poglayen

Relatore

Dott. Mara Battilani



Esame finale anno 2012

Indice

Prefazione	7
Lista delle Pubblicazioni	9
Lista delle Abbreviazioni	11
Abstract italiano	13
Abstract inglese	14
1. Introduzione	15
1.1. Evoluzione ed ampliamento dello spettro d'ospite	19
1.1.1. Evoluzione dei virus	19
1.1.2. Meccanismi molecolari della variazione genetica dei virus	20
1.1.3. Quasispecie	23
1.1.4. Selezione	24
1.1.5. Modificazioni del tropismo per la cellula ospite	24
1.1.6. Salto di specie ed emergenza delle malattie virali	25
1.2. Coronavirus	31
1.2.1. Pipistrelli: caratteristiche eco-biologiche e potenziali serbatoi di virus	32
1.2.2. Coronavirus della SARS e dei pipistrelli	35
1.2.3. Il genoma dei SARS-like coronavirus	37
1.2.4. La proteina Spike ed il tropismo d'ospite	39
1.2.5. Origine dei SARS-like CoV	40
1.2.6. La situazione europea	42
1.3. I Parvovirus dei Carnivori	48
1.3.1. La proteina VP2 ed il tropismo d'ospite	50
1.3.2. Origine ed evoluzione del parvovirus felino	50
1.3.3. Le coinfezioni virali in corso di parvovirosi e la ricombinazione genetica	54
1.3.4. Ruolo del gatto nell'epidemiologia del parvovirus canino	55

2. Obiettivi dello Studio	57
SEZIONE I - Virus a RNA	59
I.1. Introduzione	61
I.2. Materiali e Metodi	64
I.2.1. Campionamento	65
I.2.2. Estrazione dell'RNA virale	65
I.2.3. Ricerca di coronavirus nei campioni fecali di pipistrello mediante RT-PCR	66
I.2.3.1. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)	66
I.2.3.2. Purificazione dei prodotti di PCR e Sequenziamento	67
I.2.3.3. Analisi di sequenza	67
I.2.4. Messa a punto e validazione di una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per SARS-related coronavirus e sua applicazione nello screening di campioni fecali di pipistrello	67
I.2.4.1. Retrotrascrizione (RT) degli RNA estratti	67
I.2.4.2. Disegno dei primer per la reazione di real-time PCR	67
I.2.4.3. Allestimento della curva standard di reazione	69
I.2.4.4. SYBR Green real-time PCR	70
I.2.4.5. Curva standard e limite di detection (LOD)	70
I.2.4.6. Sensibilità e specificità della reazione	71
I.2.4.7. Variabilità intra- ed inter-reazione	71
I.2.4.8. Ricerca del coronavirus nei campioni fecali di pipistrello con SYBR Green real-time PCR	72
I.2.5. Sequenziamento ed analisi di un tratto del gene Pol (ORF1a,b) dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello	72
I.2.5.1. Amplificazione di un tratto del gene RdRp mediante eminested reverse transcription-PCR (RT-PCR) specifica per i SARS-related coronavirus	72
I.2.5.2. Amplificazione di un tratto del gene RdRp mediante nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) specifica per tutti i coronavirus dell'ex gruppo 2	74
I.2.5.3. Purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento	76
I.2.5.4. Prolungamento della sequenza del gene RdRp in direzione 5' mediante eminested reverse transcription-PCR (RT-PCR)	76
I.2.5.5. Analisi bioinformatica	78
I.2.6. Sequenziamento ed analisi della porzione 3' del genoma dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello	80

I.2.6.1. Amplificazione e sequenziamento di quattro brevi tratti della porzione 3' del genoma	81
I.2.6.2. Sequenziamento dei frammenti intermedi grandi A-B e C-D	83
I.2.6.3. Sequenziamento del frammento intermedio piccolo B-C	85
I.2.6.4. Sequenziamento del frammento D-estremità 3'	86
I.2.6.5. Analisi bioinformatica	86
I.3. Risultati	88
I.3.1. Ricerca di coronavirus nei campioni fecali di pipistrello mediante RT-PCR	88
I.3.2. Messa a punto e validazione di una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per SARS-related coronavirus e sua applicazione nello screening di campioni fecali di pipistrello	90
I.3.2.1. Messa a punto e validazione della metodica di SYBR Green real-time PCR	90
I.3.2.2. Screening di campioni fecali di pipistrello utilizzando la metodica SYBR Green real-time PCR	93
I.3.3. Sequenziamento ed analisi di un tratto del gene Pol (ORF1a,b) dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello	94
I.3.4. Sequenziamento ed analisi della porzione 3' del genoma dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello	98
I.4. Discussione	103
SEZIONE II - Virus a DNA	109
II.1. Introduzione	111
II.2. Materiali e Metodi	112
II.2.1. Campionamento	112
II.2.2. Estrazione del DNA virale	113
II.2.3. Diagnosi molecolare di parvovirus ed amplificazione dei geni VP2 e NS1/2 mediante PCR	113
II.2.4. Purificazione dei prodotti di PCR e Sequenziamento	115
II.2.5. Clonaggio dei geni VP2 e NS1/2	115
II.2.6. Analisi delle sequenze del gene VP2	115
II.2.7. Analisi delle sequenze del gene NS1/2	117
II.3. Risultati	118
II.3.1. Analisi delle sequenze del gene VP2	118

II.3.2. Analisi delle sequenze del gene NS1/2	124
II.4. Discussione	127
II.4.1. Infezione da FPV nei gatti	127
II.4.2. Infezione multipla da CPV nei gatti ed evidenza di confezione	128
3. Conclusioni Generali	131
Bibliografia	133
Pubblicazione 1	147
Pubblicazione 2	153
Pubblicazione 3	163
Pubblicazione 4	181
APPENDICE 1: Tabella dei campionamenti di <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> in Italia	193
APPENDICE 2: Primer utilizzati	199

Prefazione

Nelle prossime pagine sono riassunti tre anni di ricerca, svolti presso il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, riguardanti le malattie infettive degli animali da compagnia ed i possibili agenti di zoonosi. Non sarebbe stato pensabile per me portare a termine questa lunga esperienza senza il sostegno della mia famiglia, la pazienza e l'amore di Barbara, l'aiuto e la guida delle persone con cui ho condiviso questo percorso.

Un ringraziamento va al Prof. Santino Prosperi per l'autonomia concessami lungo il percorso ed il supporto nei momenti di necessità. Ma soprattutto, va alla Dott.ssa Mara Battilani che, guidandomi con fiducia dai primi passi nella ricerca fino ad oggi, mi ha aiutato a superare i miei limiti ed a valorizzare le mie qualità, trasmettendomi passione, conoscenze ed esperienza.

Un ricordo particolare va inoltre a tutti i colleghi ed amici che in questi tre anni hanno consumato con me le piastrelle del corridoio del terzo piano: Laura Gallina, Alessandra Scagliarini, Francesca Vaccari, Elena Gallitti, Francesca Martelli, Filippo Turrini, Andrea Bonato, Viola Galligioni, Paolo Vigo, Silvia Zacchini, Federica Savini, Giorgia Angeloni, Sara Ciulli, Milena Bassani, Sabrina Vairo, Caterina Lupini, Elena Catelli, Enrico Ricchizzi, Valeria Listorti, Mattia Cecchinato, Patrizia De Matteo.

Un caloroso ringraziamento va infine a tutti gli amici, che in laboratorio non hanno mai messo piede, ma fuori ci sono sempre stati.

A tutti voi, grazie!

Lista delle Pubblicazioni

Pubblicazione 1

Balboni A, Palladini A, Bogliani G, Battilani M. *Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. **Epidemiol Infect.** 2011;139(2):216-9.*

Pubblicazione 2

Balboni A, Gallina L, Palladini A, Prosperi S, Battilani M. *A real time-PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian greater horseshoe bat faecal sample surveys. **ScientificWorldJournal.** Accepted 16 November 2011.*

Pubblicazione 3

Balboni A, Battilani M, Prosperi S. *The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus. **New Microbiol.** 2012;35(1):1-16.*

Pubblicazione 4

Battilani M, **Balboni A**, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. *Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. **Vet Res.** 2011;42(1):43.*

Lista delle Abbreviazioni

aa :	aminoacidi
ACE2 :	angiotensin-converting enzyme 2 (enzima 2 di conversione dell'angiotensina)
Bat-CoV :	coronavirus dei pipistrelli
Bat-SARS-like CoV :	bat severe acute respiratory syndrome like coronavirus (coronavirus dei pipistrelli correlati al virus della SARS)
bp :	base pairs (paia di basi)
BSA :	bovine serum albumin (albumina sierica bovina)
°C :	gradi centigradi
CDV :	canine distemper virus (virus del cimurro)
CN :	copy number (numero di copie)
CoV :	coronavirus
CPV :	canine parvovirus (parvovirus del cane)
CPV-2 :	canine parvovirus type 2 (parvovirus del cane di tipo 2)
Ct :	threshold cycle (ciclo soglia)
CV :	coefficient of variation (coefficiente di variazione)
-dF/dT :	derivata in cui F = fluorescenza e T = tempo
dN :	tasso di mutazioni non-sinonime
dS :	tasso di mutazioni sinonime
EDTA :	acido etilendiamminotetraacetico
FCoV :	feline coronavirus (coronavirus felino)
FEL :	fixed effects likelihood
fg :	fentogrammo (10^{-15} grammi)
FPV :	feline panleukopenia virus (virus della panleucopenia felina)
g :	grammi
Hu-SARS CoV :	human severe acute respiratory syndrome coronavirus (coronavirus della SARS umani)
IBV :	infectious bronchitis virus (virus della bronchite infettiva)
KDa :	chilo-dalton
LOD :	limito of detection (limite di detection)
MEV :	mink enteritis virus (virus dell'enterite del visone)
ML :	maximum likelihood (massima probabilità)
µl :	microlitro (10^{-6} litri)
nm :	nanometro (10^{-9} metri)
nsp :	non structural protein (proteina non strutturale)
NSynDif :	total number of non-synonymous differences (numero totale di differenze (o sostituzioni) non-sinonime)
NSyn fraction :	fraction of non-synonymous differences (frazione delle differenze (o sostituzioni) non-sinonime)
nt :	nucleotidi

ORF :	open reading frame
ω (o dN/dS) :	rapporto tra dN e dS
PBS :	phosphate buffered saline
PCR :	polymerase chain reaction
π :	nucleotide diversity (diversità nucleotidica)
R_0 :	basic reproductive number
RACE :	rapid amplification of cDNA ends (amplificazione rapida delle estremità del cDNA)
RBD :	receptor-binding domain (dominio di legame al recettore)
RBM :	receptor-binding motif (motivo di legame al recettore)
RdRp :	RNA-dependent RNA polymerase (RNA polimerasi RNA-dipendente)
REL :	random effects likelihood
RPV :	raccoon parvovirus (parvovirus del procione)
RT :	reverse transcription (retrotrascrizione)
RT-PCR :	reverse transcription-PCR
S :	polymorphic sites (siti polimorfici)
SARS :	severe acute respiratory syndrome (sindrome respiratoria acuta severa)
SARS-CoV :	severe acute respiratory syndrome coronavirus (coronavirus della SARS)
SARS-like CoV :	severe acute respiratory syndrome like coronavirus (coronavirus correlati al virus della SARS)
SARS-related CoV :	severe acute respiratory syndrome related coronavirus (gruppo dei coronavirus correlati alla SARS)
SD :	standard deviation (deviazione standard)
SE :	standard error (errore standard)
SLAC :	single likelihood ancestor containing
SynDif :	total number of synonymous differences (numero totale di differenze (o sostituzioni) sinonime)
TAE :	tris-acetate-EDTA
TfR :	transferrin receptor (recettore per la transferrina)
TRS :	transcription regulatory sequence (sequenza di regolazione della trascrizione)

Abstract italiano

L'ampliamento dello spettro d'ospite è strettamente connesso al processo evolutivo a cui i virus sono assoggettati e rappresenta una notevole sfida alla loro capacità di adattarsi. L'attitudine a superare le barriere di specie è conseguente alla costante e relativamente rapida evoluzione che caratterizza i virus; allo stesso tempo, la forza selettiva esercitata dal nuovo ospite rappresenterà un ulteriore stimolo per le capacità adattative del virus.

Ad oggi, i meccanismi genetici ed evolutivi responsabili del salto di specie virale, cioè la trasmissione di un virus da un ospite tradizionale ad uno precedentemente resistente all'infezione, sono parzialmente sconosciuti.

Nel seguente lavoro verranno presentati gli studi effettuati sulle dinamiche evolutive caratterizzanti virus a RNA e a DNA in cui si sono osservate variazioni dello spettro d'ospite. Gli studi hanno riguardato i coronavirus, con particolare riferimento al ruolo svolto dai pipistrelli nell'evoluzione dei coronavirus SARS-correlati, e l'importanza del gatto nell'evoluzione dei parvovirus dei carnivori.

Nella prima sezione saranno mostrate le correlazioni genetiche dei coronavirus identificati in Italia nei pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* con i ceppi europei e del resto del mondo, allo scopo di chiarire l'origine evolutiva dei coronavirus dei pipistrelli correlati al virus della SARS (Bat-SARS-like CoV) europei, gli eventi migratori che hanno caratterizzato la loro diffusione nel continente e le potenziali ripercussioni sulla salute pubblica.

Nella seconda sezione saranno evidenziate le caratteristiche molecolari dei ceppi di parvovirus circolanti nella popolazione felina, valutandone la diversità di sequenza e la complessità genetica, allo scopo di ottenere importanti informazioni in merito all'evoluzione del virus e alle interazioni tra il parvovirus e l'ospite.

Abstract inglese

Title: **RNA and DNA viruses: role of cross-species transmission in the viral evolution**

The cross-species transmission is closely related to viral evolution and represents a challenge for viral adaptability. The capacity to overcome the species barriers is due to the constant and relatively rapid evolution that characterizes the viruses. At the same time, the selective force exerted by the new host will provide a further stimulus for the adaptive capacity of the virus.

To date, the genetic and evolutionary mechanisms responsible for the species jump, namely the transmission of a virus from the traditional host to a new host previously resistant to infection, are partially unknowns.

Aim of this work is to present studies conducted on the evolutionary dynamics characterizing RNA and DNA viruses subjected to cross-species transmission. Research has been done on coronavirus, focusing on the role played by bats in the evolution of SARS-related coronavirus, and on parvovirus, specifically on the role of the cat in carnivores parvoviruses evolution.

The first section will show the genetic correlations between coronaviruses identified in Italy in *Rhinolophus ferrumequinum* bats, with strains identified in Europe and in the rest of the world, in order to clarify the evolutionary origin of the bat coronaviruses related to SARS virus (Bat-SARS-like CoV) in our continent, the migratory events that have characterized their spread, and their potential impact on public health.

In the second section the molecular characteristics of the strains of parvovirus circulating in cats population will be highlighted, evaluating their sequence diversity and genetic complexity, in order to obtain important information on viral evolution and interactions between parvovirus and host.

1. Introduzione

L'evoluzione, cioè il processo che porta al cambiamento di tutte le forme di vita e che permette loro di adattarsi all'ambiente, è la conseguenza delle modificazioni genotipiche che avvengono negli organismi e si mostra con evidenza tanto maggiore quanto inferiore è la complessità genomica dell'organismo considerato. Per questo motivo, i virus, dato il ridotto numero di geni posseduti, hanno nella rapida evoluzione il principale fattore di successo che permette loro di adattarsi e sopravvivere [1].

Tra i virus, quelli a RNA mostrano una estrema variabilità che gli consente di evolvere ad una velocità decisamente maggiore rispetto a quelli a DNA; anche questi ultimi manifestano però una certa capacità di generare varianti diverse, subendo modificazioni limitate a siti specifici detti hot spot [2]. Fanno eccezione i virus con materiale genetico composto da un singolo filamento di DNA di piccole dimensioni che, come i virus ad RNA, possono evolvere con tassi di mutazione particolarmente elevati [3].

Le modificazioni che insorgono nel genoma virale durante il processo evolutivo, possono determinare l'acquisizione di caratteristiche tali da consentire un ampliamento dello spettro d'ospite del virus. Questa evenienza, conosciuta come "salto di specie", porta ad una modificazione del tropismo cellulare del virus considerato, con il coinvolgimento di una specie che precedentemente si mostrava resistente all'infezione. La nuova variante virale così originata potrà avere le caratteristiche di un patogeno emergente, cioè si diffonderà in modo epidemico nella nuova popolazione (spesso priva di copertura immunitaria) causando manifestazioni cliniche potenzialmente diverse [2]. L'emergenza di nuove malattie virali può quindi interessare il passaggio di un patogeno da un animale ad un altro, o il passaggio di un patogeno da un animale all'uomo. L'insorgenza di nuove zoonosi virali rappresenta la principale minaccia per la salute pubblica e sono eventi che negli ultimi decenni si sono ripetuti con una certa frequenza, basti ricordare il virus della SARS, il virus Ebola, i virus influenzali, il virus Hendra ed il virus Nipah [4].

La possibilità che un virus ampli il proprio spettro d'ospite è influenzata da numerosi fattori che comprendono, oltre alle caratteristiche proprie del patogeno considerato, diversi fattori ambientali, ecologici e comportamentali. Tra i fattori esterni al virus, l'uomo svolge un ruolo centrale in quanto, influenzando tutti gli altri, altera le dinamiche di popolazione e facilita l'incontro tra patogeni ed ospiti, esitando in scenari mai affrontati precedentemente che condizionano il processo evolutivo degli organismi viventi, compresi i virus [1].

L'evoluzione dei virus può quindi portare all'acquisizione di caratteristiche che permettono loro di ampliare lo spettro d'ospite e di infettare nuove specie. Ma a sua volta, l'infezione di una nuova specie d'ospite, può fornire ai virus un ambiente adatto a

stimolarne un ulteriore processo adattativo. Infatti, il nuovo ospite d'infezione, agirà selettivamente sulla popolazione virale guidandone l'evoluzione.

Quindi, l'ampliamento dello spettro d'ospite, rappresenta l'evento culminante di un processo evolutivo ma anche l'occasione per avviare un nuovo processo di adattamento e quindi di evoluzione del virus.

Per approfondire le conoscenze riguardanti le dinamiche evolutive caratterizzanti i virus soggetti a variazioni nello spettro d'ospite, verranno presentate in questo lavoro due indagini svolte su virus a RNA e virus a DNA; in particolare i coronavirus ed il ruolo svolto dai pipistrelli nell'evoluzione dei coronavirus SARS-correlati ed i parvovirus dei carnivori.

I coronavirus mostrano una notevole propensione nel trasmettersi a nuovi ospiti [6] e questa propensione è emersa in più occasioni nella storia evolutiva di questa famiglia virale; basti ricordare il coronavirus umano HCoV-OC43 che presenta strette correlazioni genetiche con il coronavirus bovino (BCoV) e che da questo sembra derivare [7], o il coronavirus umano HCoV-229E che dopo essere originato da un *Alphacoronavirus* dei pipistrelli è passato nuovamente ad un ospite animale generando il virus della diarrea epidemica del suino (PEDV) [8], o ancora il più importante coronavirus umano, il SARS-CoV, che sembra avere nei pipistrelli il suo reservoir [9, 10].

Questa propensione ad adattarsi rapidamente a nuovi ospiti o tessuti o nicchie ecologiche è dovuta all'elevata diversità genomica che caratterizza i coronavirus e consente l'originarsi di nuove specie [6].

In particolare, i pipistrelli sono il serbatoio naturale di numerosi *Alpha-* e *Betacoronavirus*, tra cui virus strettamente correlati geneticamente all'agente eziologico della sindrome respiratoria acuta severa (SARS), che emergendo in Cina nel 2002-2003 si è diffusa in tutto il mondo con i caratteri di una pandemia [11, 12]. Questi coronavirus dei pipistrelli correlati al virus della SARS, i SARS-like coronavirus (SARS-like CoV), sono stati riscontrati in Asia, Africa ed Europa [9, 13-25]. Sono state avanzate diverse teorie sulla loro origine, tra cui una possibile emergenza nei pipistrelli africani a cui sarebbe seguita la diffusione ad Europa ed Asia [19].

A causa delle peculiari condizioni climatiche e della posizione geografica, l'area del Mediterraneo è caratterizzata da una notevole biodiversità e rappresenta un potenziale ponte per la migrazione dei virus dalle aree medio-orientali ed africane verso l'Europa. Ciononostante, con l'eccezione di uno studio condotto in Spagna [26], l'area mediterranea è stata ignorata dagli altri studi epidemiologici.

Nella prima sezione di questo lavoro verrà presentata un'indagine riguardante la presenza di coronavirus nella popolazione italiana di *Rhinolophus ferrumequinum*, una delle specie di pipistrelli che è stata maggiormente indicata come serbatoio dei SARS-like CoV. Verranno analizzate le correlazioni genetiche con i coronavirus dei pipistrelli già identificati in Europa e nel resto del mondo, allo scopo di approfondire le conoscenze riguardanti i coronavirus presenti nella popolazione di pipistrelli dell'area mediterranea. Questo aiuterà a chiarire l'origine evolutiva dei Bat-SARS-like CoV europei, gli eventi migratori che hanno caratterizzato la loro diffusione nel continente e le potenziali

ripercussioni sulla salute pubblica, in conseguenza di un'eventuale salto di specie con coinvolgimento della popolazione umana, soprattutto delle persone che vivono o lavorano in stretto contatto con l'ambiente selvatico.

I parvovirus dei carnivori sono parvovirus autonomi strettamente correlati tra di loro che vengono riuniti nel sottogruppo del Parvovirus felino ed hanno la capacità di infettare un'ampia varietà di specie appartenenti all'ordine Carnivora, compresi felidi, canidi e mustelidi. I parvovirus dei carnivori sono rappresentati dagli FPV-like virus che comprendono il virus della panleucopenia felina (FPV), alcuni parvovirus delle volpi ed il parvovirus del procione (RPV). Da questo raggruppamento sono inoltre emersi, negli anni '40 e poi negli anni '70, il parvovirus del visone (MEV) e del cane (CPV-2) [27].

La panleucopenia felina è conosciuta dagli inizi del '900 [28] ed il suo agente eziologico, il virus della panleucopenia felina o parvovirus felino (FPV), è un virus conosciuto da molto tempo ed infetta diverse specie animali appartenenti all'ordine dei carnivori, tra cui felidi selvatici e domestici, volpi, visoni e procioni, ma non il cane [29, 30].

Il parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2) è emerso alla fine degli anni '70 diffondendosi rapidamente a livello mondiale ed è un esempio di virus emergente, in quanto, è comparso improvvisamente nella popolazione canina ed ha acquisito nel tempo, attraverso mutazioni genetiche che hanno determinato la comparsa delle nuove varianti antigeniche CPV-2a/2b/2c, la capacità di infettare un nuovo ospite, il gatto, precedentemente resistente [31]. Infatti, l'originale tipo antigenico 2 che infettava solo il cane, nel quale si è rapidamente diffuso per la totale mancanza di protezione immunitaria, ha subito un'altrettanto rapida evoluzione ed è stato soppiantato dalle nuove varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c che hanno acquisito la capacità di provocare malattia anche nel gatto [31].

La teoria più consolidata riguardante l'origine del parvovirus canino contempla l'evoluzione del CPV-2 a partire dal FPV, o da un virus FPV-like, infettante i carnivori selvatici, sottolineando il ruolo dell'ospite selvatico come reservoir nell'emergenza del nuovo virus. In questo reservoir selvatico il virus progenitore avrebbe acquisito le mutazioni necessarie per permettergli di ampliare lo spettro d'ospite, infettando efficacemente il cane, ed effettuare così il salto di specie.

L'origine del CPV-2 correlata al parvovirus felino, insieme alla capacità delle nuove varianti di CPV-2 di infettare l'ospite felino ed al recente riscontro di infezioni persistenti delle varianti CPV-2a e CPV-2b in gatti asintomatici [32], accrescono il ruolo epidemiologico del gatto come potenziale serbatoio per i parvovirus dei carnivori. Inoltre, il passaggio del CPV al gatto, può condurre ad una nuova fase evolutiva di questo virus che, adattandosi ed evolvendo nel nuovo ospite, potrebbe ripercuotersi a livello sanitario sul gatto stesso e soprattutto originare nuove varianti virali. Questo scenario è reso inoltre possibile dalla recettività del gatto ad entrambe le specie virali, FPV e CPV-2a/2b/2c, con possibili superinfezioni o coinfezioni da più varianti o diverse specie di parvovirus, che facilitano l'instaurarsi di popolazioni virali ad elevata complessità genetica e potenziali eventi di ricombinazione [33-36].

Nella seconda sezione di questo lavoro verrà presentata un'indagine riguardante le caratteristiche molecolari dei ceppi di parvovirus circolanti nella popolazione felina, valutando la diversità di sequenza e la complessità genetica. Lo studio permetterà di ottenere importanti informazioni in merito all'evoluzione del virus e alle interazioni tra il parvovirus e l'ospite.

1.1. Evoluzione ed ampliamento dello spettro d'ospite

1.1.1. Evoluzione dei virus

L'evoluzione viene definita come le modificazioni genomiche che una popolazione acquisisce nel tempo; nel caso dei virus, essa non dipende solo dalle caratteristiche proprie della popolazione virale ma anche dalle caratteristiche fisico-biologiche della cellula e dalla struttura della popolazione d'ospite [2]. Per esempio, l'uomo, alterando l'ecosistema e aumentando di numero e distribuzione, facilita l'incontro tra virus ed ospiti esitando in scenari mai affrontati precedentemente che condizionano il processo evolutivo degli organismi viventi, compresi i virus [1].

Il principale fattore di successo dei virus è, a dispetto del ridotto numero di geni posseduti, l'elevata variabilità genetica che gli fornisce la capacità di adattarsi e sopravvivere [1].

L'evoluzione virale segue i principi Darwiniani; le differenze genetiche che si creano attraverso diversi meccanismi molecolari in cicli successivi di replicazione e trasmissione del virus negli ospiti, porta alla creazione di diverse varianti dello stesso virus che competono tra di loro nell'ambiente, risultando nell'estinzione della maggior parte di esse e nella selezione di quelle più adatte [2]. Si ha cioè un costante cambiamento della popolazione virale in risposta alla pressione selettiva [1].

L'evoluzione dei virus nell'ospite (evoluzione intra-ospite) può portare alla diffusione di nuove varianti virali causa di manifestazioni cliniche differenti, epidemie o pandemie [2]. Tali eventi evolutivi intra-ospite hanno probabilmente un ruolo importante nella patogenesi e nella persistenza virale, in quanto possono essere caratterizzati ad esempio da mutazioni che revertano l'attenuazione di ceppi attenuati, mutazioni associate ad alterazioni nella specificità recettoriale e generazione di un ampio spettro di mutanti (quasispecie virale) che modula il processo patogenetico [2].

In generale, l'evoluzione virale può seguire due vie [1]:

- a) La popolazione virale coevolve con l'ospite seguendo un unico destino; se l'ospite prospera anche il virus prospera. Però, non essendoci alternative d'ospite per il virus, può insorgere un fattore che impedisce la replicazione del virus in quell'ospite (es. antivirale) e quindi la popolazione virale si estingue. Più frequente per i virus a DNA.
- b) La popolazione virale si espande in più nicchie biologiche infettando ospiti diversi. Se insorge un fattore che impedisce la replicazione del virus in un ospite il virus replica in un altro e la popolazione non si estingue. Più frequente per i virus a RNA.

Comunque, patogeni ed ospiti si influenzano reciprocamente e quindi un grado più o meno ampio di coevoluzione si instaura sempre tra i due [37]. Con coevoluzione si intende un processo in equilibrio dinamico (che varia nel tempo) di adattamento

reciproco, mediante modificazione genetica, tra due o più specie [37]. In questo processo, le modificazioni genetiche di una specie sono il risultato della selezione operata dall'altra specie e viceversa. Nel processo coevolutivo, un patogeno ed il suo ospite sono strettamente correlati e si adattano reciprocamente seguendo direzioni opposte, basti pensare ad alcune caratteristiche quali l'infettività del patogeno e la resistenza dell'ospite, o la risposta dell'ospite all'infezione e l'evasione immunitaria da parte del patogeno [37]. In questo ambito, la virulenza, cioè il danno manifestato dall'ospite in risposta all'infezione data dal patogeno, è una manifestazione ambigua dello stato di coevoluzione tra i due, poiché manifesta uno stato di scarsa fitness dell'ospite che non sempre è accompagnato da un efficiente completamento del ciclo replicativo del patogeno [37]; accade spesso infatti che l'adattamento di un virus in un ospite porti ad una attenuazione della sua virulenza.

Il più evidente caso di diversificazione è rappresentato dai virus a RNA e dalla loro struttura di popolazione estremamente eterogenea che in molti casi segue il concetto di quasispecie [2, 38]. I virus ad RNA manifestano una velocità evolutiva decisamente maggiore rispetto ai virus a DNA, in conseguenza dell'elevata predisposizione all'errore replicativo mediato dalla RNA-polimerasi o dalla trascrittasi inversa, dalle notevoli dimensioni della popolazione virale e dalla maggiore velocità replicativa [3]. Queste rapide modificazioni evolutive permettono ai virus a RNA di generare velocemente le mutazioni che gli possono permettere di adattarsi ad un nuovo ambiente, compresa una nuova specie d'ospite [3].

Se i virus a RNA mostrano una estrema variabilità, anche i virus più complessi a DNA manifestano comunque una certa capacità di generare varianti diverse; questi ultimi non esibiscono tassi di mutazione elevati come i virus ad RNA poiché questo ne inficerebbe la funzionalità, ma sono soggetti a variazione di siti specifici detti "hot spot" [2]. Fanno eccezione i virus con materiale genetico composto da un singolo filamento di DNA di piccole dimensioni che, probabilmente, a causa di un elevato tasso di errore replicativo, possono raggiungere una velocità evolutiva pari a quella dei virus ad RNA [3].

1.1.2. Meccanismi molecolari della variazione genetica dei virus

La variazione genetica è il processo, privo di scopi specifici e prefissati, che sta alla base della differenziazione e quindi dell'evoluzione dei virus [2]. L'insieme delle varianti virali che originano in conseguenza di diversi meccanismi molecolari permettono al virus di adattarsi all'ambiente che agirà selezionando la forma, o il tipo virale, con le caratteristiche vincenti [2].

I virus utilizzano gli stessi meccanismi molecolari di variazione genetica delle altre forme di vita:

A) Mutazione

La mutazione è una alterazione localizzata ed ereditabile della sequenza nucleotidica dell'acido nucleico che può provocare alterazioni nella sequenza aminoacidica (mutazione non-sinonima) o non provocare alterazioni nella sequenza aminoacidica (mutazione sinonima). Questa alterazione può avvenire in conseguenza di:

- a) un errore di copiatura dell'acido nucleico ad opera della RNA- o DNA-polimerasi;
- b) azione di enzimi della cellula ospite;
- c) danneggiamento chimico-fisico dell'acido nucleico.

Il legame di un nucleotide sbagliato durante la copiatura dell'acido nucleico può essere rimosso da una polimerasi che presenta attività esonucleasica 3'-5', detta anche proofreading-repair activity, e da meccanismi di correzione post-replicativi; queste attività sono i principali meccanismi di protezione dalle mutazioni e sono possedute dalle cellule e da molti virus a DNA mentre, la maggior parte dei virus a RNA, non li posseggono e per questo sono più soggetti a mutazione [2, 39].

Le mutazioni possono essere distinte in tre tipi principali:

- a) transizioni: sostituzione di una purina con una purina o di una pirimidina con una pirimidina;
- b) trasversioni: sostituzione di una purina con una pirimidina o viceversa;
- c) inserzioni o delezioni (indel): aggiunta o sottrazione di uno o più nucleotidi.

La mutazione, intesa come evento che si manifesta su una popolazione (insieme di organismi o di geni o tratti di essi), può essere espressa quantitativamente mediante due parametri, il tasso di mutazione e la frequenza di mutazione. Il tasso di mutazione quantifica il numero di mutazioni per singolo nucleotide copiato, indipendentemente dal destino dell'errore prodotto, quindi è una misura di un evento biochimico. Al contrario, la frequenza di mutazione, descrive la proporzione di un mutante (o più mutanti) in una popolazione, quindi dipende dal tasso con cui viene generato il mutante e dalla sua capacità replicativa in confronto a quella degli altri genomi che costituiscono la popolazione [2].

Il tasso di mutazione dei virus è influenzato da:

- a) se la DNA polimerasi virale possiede attività proofreading;
- b) se il virus codifica per proteine ad attività riparatrice;
- c) meccanismo replicativo del virus;
- d) sito intracellulare di replicazione del virus;
- e) lunghezza del genoma.

In media, il tasso di mutazione nel genoma dei virus a RNA è di $10^{-3} - 10^{-5}$ nt/sito, mentre quello dei virus a DNA è almeno 300 volte più bassa, $10^{-8}-10^{-9}$ nt/sito. In un virus a RNA con genoma di 10.000 basi si avrà quindi in media una mutazione per ogni genoma replicato quindi, in milioni di progenie, si avranno

milioni di mutazioni che creano una popolazione di mutanti, tutti molto simili ma comunque diversi [1]. Tra i virus a DNA, assumono un comportamento particolare quelli con genoma piccolo e a singolo filamento che mostrano tassi di mutazione più elevati prossimi a quelli dei virus a RNA [1].

Siccome la maggior parte delle modificazioni genomiche sono deleterie, la capacità di variazione dei genomi virali subisce due tipi di limitazioni: da un lato ci sono vincoli relativi alle posizioni nel genoma in cui le mutazioni possono insorgere poiché potrebbero causare alterazioni nella traduzione di proteine essenziali, dall'altro, ci sono limiti riguardanti il numero massimo di mutazioni tollerabili ("error threshold") oltre i quali il materiale genetico perderebbe la sua funzionalità. Quindi ci sono limiti, riguardanti la posizione e la numerosità, che sono in funzione delle dimensioni del genoma e riducono ovviamente la loro azione all'aumentare della lunghezza del genoma considerato [40]. In particolare, i virus a RNA replicano con un livello di fedeltà prossimo all'error threshold e in molti casi, anche se questi virus sono potenzialmente molto variabili, le piccole dimensioni del loro genoma limitano il numero di modificazioni e le posizioni del genoma in cui esse possono avvenire senza causare una perdita funzionale [39, 41].

B) Ricombinazione

La ricombinazione è la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico (legate covalentemente) appartenente a due diversi genomi parentali, o tra diversi siti dello stesso genoma. La ricombinazione è un meccanismo diffuso di variazione genetica che avviene sia per virus a RNA che DNA e spesso con la partecipazione del complesso replicativo del virus [2].

Per avere ricombinazione occorre che la stessa cellula ospite sia coinfectata da almeno due genomi virali diversi; la persistenza di un genoma virale nella cellula (infezione persistente) favorisce l'instaurazione di una coinfezione per la penetrazione successiva di un altro virus e quindi aumenta le probabilità di un evento di ricombinazione [2].

Si sospetta un evento di ricombinazione quando l'analisi filogenetica di uno stesso ceppo virale mostra posizioni discordanti per i diversi geni; in questi casi la conferma deve avvenire mediante valutazione statistica per differenziare una vera ricombinazione da possibili mutazioni convergenti insorte indipendentemente [2].

C) Riassortimento

Il riassortimento genico è lo scambio di frammenti di genoma tra due o più virus (RNA o DNA) a genoma segmentato che infettano la stessa cellula ospite. È un fenomeno evolutivo che permette grossi cambiamenti e che viene molto sfruttato da questi virus, basti pensare alla frequente generazione di nuove varianti che avviene in questo modo per il virus dell'influenza.

Questi diversi meccanismi molecolari di variazione genetica permettono di distinguere due tipi di evoluzione virale differenziabili appunto per i meccanismi molecolari coinvolti, i tempi con cui avvengono e gli effetti che hanno sul virus. Il “genetic drift”, letteralmente “deriva genetica”, è la modificazione progressiva e scalare nel tempo, per piccoli passi successivi, del genoma virale; è la diversità genetica derivante da singole mutazioni (per errori di duplicazione) che avvengono ogni volta che il genoma replica e dalla successiva selezione operata dall’ambiente. Il “geneic shift”, letteralmente “spostamento genetico”, è la modificazione massiva ed in unica fase del genoma virale in conseguenza di ricombinazione o riassortimento; è la diversità genetica derivante da un evento relativamente raro che avviene solo in certe circostanze [1].

1.1.3. Quasispecie

La quasispecie è definita come la popolazione virale all’interno di un ospite composta da una distribuzione di mutanti diversi ma strettamente correlati, soggetti a continui processi di variazione genetica, competizione e selezione, che agiscono come una unità di selezione [2, 42]. La popolazione di quasispecie è composta da una nuvola di mutanti in equilibrio dinamico che si sviluppa attorno ad una sequenza master o consenso; tale popolazione presenta diverse variazioni genomiche che permettono di distinguere i mutanti che la costituiscono dalla sequenza leader ma non a tal punto da essere considerati specie diverse [2]. La sequenza consenso non rappresenta altro che la sequenza più probabile tra tutte quelle dei diversi mutanti presenti nell’ospite e, dato l’equilibrio dinamico che contraddistingue questa distribuzione, sarà caratterizzata da una determinata sequenza in un determinato momento ma, dopo un certo periodo di tempo e quindi a seguito del continuo processo di mutazione e selezione, avrà un’altra sequenza; quindi anche la sequenza consenso non è stabile nel tempo. [1].

La teoria della quasispecie è adatta a spiegare la nuvola di varianti virali che si crea nell’ospite infettato da virus caratterizzati da elevati tassi di mutazione; quelli a RNA sono quindi i principali virus a seguire questa dinamica [38], insieme ad alcuni virus a DNA con genoma di piccole dimensioni [42]. Esistono invece altre teorie per spiegare gli eventi evolutivi di complessi virus a DNA con tassi di mutazione molto più bassi [2, 42].

La struttura di quasispecie non si adatta solo a virus che instaurano infezioni persistenti, così come non tutti i virus che producono una infezione persistente seguono una dinamica di quasispecie; la quasispecie non implica la persistenza e viceversa [42].

La popolazione di mutanti generata secondo la dinamica di quasispecie consente al virus di esercitare un alto potenziale adattativo e permette una modulazione dell’espressione fenotipica (es. la manifestazione clinica è modulata dalla popolazione di varianti e non da un solo tipo virale). I mutanti che costituiscono la quasispecie costituiscono una enorme riserva di varianti con proprietà biologiche potenzialmente diverse che possono fornire una risorsa fondamentale nel processo evolutivo del virus che porta alla selezione del mutante più adatto a sopravvivere nell’ambiente [38].

1.1.4. Selezione

La selezione è il processo attraverso il quale un genotipo viene fissato o meno nella popolazione mediante la valutazione operata dall'ambiente del fenotipo da esso codificato [2].

Vengono convenzionalmente riconosciuti due tipi di selezione, una positiva ed una negativa. Per selezione positiva si intende la fissazione di varianti genomiche che aumentano la capacità di completare il ciclo replicativo del virus, cioè la conservazione di varianti vincenti. La selezione positiva è molto frequente in virus poco adattati nell'ambiente, per cui le mutazioni solitamente causano un vantaggio al virus e per questo vengono conservate. Per selezione negativa si intende invece l'eliminazione di varianti genomiche che riducono la capacità di completare il ciclo replicativo del virus, cioè l'eliminazione di varianti non vincenti. La selezione negativa è molto frequente in virus altamente adattati nell'ambiente, per cui le mutazioni solitamente causano un danno al virus e per questo non vengono conservate [2].

Un parametro per valutare il grado di selezione positiva o negativa in una popolazione è dato dal rapporto tra il numero delle mutazioni non-sinonime ed il numero delle mutazioni sinonime nel tratto genomico interessato [37], più il valore ottenuto è elevato maggiore sarà il grado di selezione positiva agente sul tratto genomico analizzato.

La selezione positiva solitamente riduce la diversità nella popolazione virale perché mantiene uno o pochi tipi genomici; ma può anche generare un repertorio di varianti con differenti caratteristiche genetiche ad alta efficienza replicativa [2].

1.1.5. Modificazioni del tropismo per la cellula ospite

Sebbene ogni fase del ciclo replicativo virale possa influenzare la permissività di un tipo cellulare nel sostenere l'infezione virale, il riconoscimento da parte del virus del recettore cellulare è uno dei fattori principali nel determinare il tropismo d'ospite [2]. Quindi, anche se le proteine non-strutturali e le regioni regolatorie del genoma virale possono influenzare il tropismo per la cellula ospite [2], il ruolo principale è svolto dalle proteine di superficie che al recettore cellulare si legano direttamente.

Ai fini evolutivi, le principali caratteristiche dell'interazione virus-recettore sono [2]:

- a) Un virus può utilizzare diversi recettori e co-recettori;
- b) Lo stesso recettore può essere utilizzato da diversi virus ed altri microrganismi;
- c) Il tipo di recettore utilizzato da un virus non può essere predetto sulla base della sua posizione filogenetica o delle proprietà biologiche;
- d) Una o poche mutazioni del genoma virale ne possono modificare il recettore utilizzato, il tropismo cellulare e la patogenicità.

Quindi, una variazione genetica del virus che ne modifica il riconoscimento recettoriale (acquisizione o perdita della capacità di riconoscere un recettore) può determinare la selezione di una sottopopolazione in una distribuzione di mutanti [2].

Frequentemente, nel genoma virale, c'è una sovrapposizione tra i siti di legame anticorpale (epitopi) ed i siti di riconoscimento recettoriale. Questa sovrapposizione, insieme al fatto che i residui aminoacidici presenti sulla superficie del virus tendono ad avere meno vincoli di variazione rispetto a quelli interni, cioè hanno una tolleranza maggiore ad accettare sostituzioni aminoacidiche, determina una coevoluzione dell'antigenicità e del riconoscimento recettoriale, con implicazioni per la diversificazione fenotipica dei virus [2].

1.1.6. Salto di specie ed emergenza delle malattie virali

Quando si parla di virus emergente si intende l'agente eziologico di una infezione virale nuova o mai riscontrata precedentemente nella popolazione. L'emergenza del virus comporta un aumento dell'incidenza della malattia da esso causata in un nuovo ospite, o nell'ospite tradizionale in seguito ad eventi che ne alterano l'epidemiologia; in quest'ultimo caso sarebbe più corretto parlare di riemergenza [43]. È importante ricordare che i virus non hanno una strategia per emergere. Piuttosto, i virus, subiscono un processo di evoluzione casuale conseguente alle interazioni biologiche che instaurano con l'ospite e, in concomitanza con certi eventi o fattori, questa evoluzione può portare all'emergenza di una malattia [4].

L'emergenza di nuove malattie virali può quindi interessare il passaggio di un patogeno da un animale ad un altro, o il passaggio di un patogeno da un animale all'uomo. L'insorgenza di nuove zoonosi rappresenta la principale minaccia per la salute pubblica e sono eventi che nelle ultime decadi si sono ripetuti con una certa frequenza, basti ricordare il virus della SARS, il virus Ebola, i virus influenzali, il virus Hendra ed il virus Nipah [4, 5].

Per avere l'emergenza di una malattia occorrono due elementi: l'introduzione del patogeno nella popolazione e la sua conseguente diffusione e mantenimento nella popolazione stessa [44].

I fattori che possono portare all'emergenza delle malattie infettive sono diversi e tra questi ha un ruolo importante l'adattabilità genomica [45]. Per questo motivo, più un virus sarà in grado di mutare ed adattarsi, maggiore sarà la sua capacità di passare ad un nuovo ospite e di instaurarvi una infezione produttiva [40]. Gli altri fattori sono per lo più influenze ambientali, ecologiche e sociologiche che incidono sulla probabilità dei potenziali agenti patogeni di venire in contatto con nuovi ospiti; molti di questi fattori infatti alterano la diffusione dei patogeni e dei loro ospiti o vettori [2].

Nel caso dei virus, l'emergenza è più frequentemente associata ai virus a RNA che manifestano più degli altri virus, grazie probabilmente alla loro maggiore flessibilità genomica, fenomeni di mutazione, ricombinazione e riassortimento che gli permettono di superare barriere di specie, adattarsi ad ospiti diversi e dare origine a nuove varianti [2, 41].

Esistono due modelli, che probabilmente rappresentano due evenienze entrambe possibili, per descrivere l'emergenza di un virus in un nuovo ospite. Il salto di specie può avvenire per un virus che non possiede o possiede solo in parte le caratteristiche adatte ad instaurare un'infezione efficace e stabile (replicazione e trasmissione) nel nuovo ospite, per cui il virus subirà un processo evolutivo all'interno del nuovo ospite che rappresenterà una forza selettiva per l'adattamento del virus. In alternativa il virus è già in grado di instaurare un'infezione produttiva nel nuovo ospite, o acquisisce nell'ospite originario le caratteristiche adatte per farlo, per cui il virus sarà in un certo senso preadattato [3]. Nel primo caso quindi l'emergenza del virus nel nuovo ospite è legata alla frequenza d'esposizione al nuovo ospite e alla capacità del virus di evolvere rapidamente in esso, nel secondo invece è legata alla acquisizione fortuita nell'ospite originario di caratteristiche adatte alla replicazione del virus nel nuovo ospite.

Epidemiologicamente, l'emergenza e la stabilizzazione di una nuova malattia virale in una popolazione si sviluppa in tre fasi successive. Inizialmente, si hanno singoli passaggi del virus dall'ospite originale al nuovo senza trasmissione tra i soggetti di quest'ultimo (infezioni a fondo cieco), seguiti poi da un adattamento del patogeno nel nuovo ospite con trasmissione all'interno della popolazione che porta all'instaurarsi di un'epidemia e, infine, viene raggiunto un equilibrio, per proseguimento del fenomeno adattativo tra patogeno ed ospite, che porta all'endemizzazione della malattia [5].

L'emergenza di un virus non preadattato in un nuovo ospite segue quattro fasi consecutive [5, 46]:

- a) Esposizione: il contatto tra l'ospite donatore ed il ricevente, che può essere influenzato da fattori geografici, ecologici e comportamentali;
- b) Infezione: il passaggio del virus dall'ospite donatore al ricevente, che può essere influenzato dalla capacità del virus di superare le barriere di specie e dalla compatibilità con il nuovo ospite (legame al recettore cellulare, capacità di compiere il ciclo replicativo, evasione della risposta immunitaria, ecc.);
- c) Diffusione: trasmissione del virus tra soggetti appartenenti alla nuova popolazione, che può essere influenzato dalla capacità del virus di completare il proprio ciclo replicativo nel nuovo ospite e dal contatto tra i soggetti che costituiscono la nuova popolazione;
- d) Adattamento: evoluzione del virus nel nuovo ospite così da permanere in equilibrio all'interno della popolazione, che può essere influenzato dalla variabilità genetica del virus.

Solo le prime due fasi sono indispensabili per avere la trasmissione di un patogeno in un nuovo ospite, con le successive due si ha la diffusione e la stabilizzazione del patogeno nella nuova popolazione. Questa differenza permette di distinguere due tipi di trasmissione ad un nuovo ospite; si può avere la trasmissione a fondo cieco con infezione del nuovo ospite (con o meno malattia) che però non conduce al coinvolgimento di altri soggetti se non quelli direttamente infettati dall'ospite primario o, invece, la trasmissione con diffusione ed adattamento del patogeno nella popolazione, attraverso il contagio malato-sano tra soggetti appartenenti alla nuova specie d'ospite [46]. Nel primo caso si

avranno eventi isolati ed occorrerà sempre l'ospite primario per avere l'infezione di quello nuovo, mentre, nel secondo caso, il patogeno si stabilizzerà nella nuova popolazione senza necessitare dell'ospite primario e si svilupperà un evento epidemico che potrà diventare endemico.

In generale le interazioni tra virus ed ospite potranno essere quindi distinte in quattro tipi [1]:

- a) Stabile: mantiene il virus nell'ambiente (la popolazione d'ospite e quella virale sono in equilibrio e si mantengono nell'ambiente), comportamento caratteristico del virus nell'ospite primario o reservoir;
- b) In evoluzione: passaggio del virus dalla popolazione tradizionale ad una nuova, appartenenti alla stessa specie d'ospite o a specie diverse, con progressivo adattamento del patogeno;
- c) Dead-end o a fondo cieco: passaggio del virus dall'ospite tradizionale ad uno nuovo in cui il virus non riesce a trasmettersi efficacemente per cui non si adatta, può essere dovuto anche all'alta letalità del virus che causando la morte troppo rapida del nuovo ospite non ne consente la trasmissione;
- d) Resistente: l'ospite infettato blocca completamente il ciclo di replicazione del virus (ospite non recettivo).

Un virus, per infettare un nuovo ospite deve essere in grado di superare le barriere di specie e compiere il proprio ciclo replicativo nelle sue cellule; questo processo può subire delle limitazioni a diversi livelli, compresi il legame al recettore, l'entrata nella cellula, la replicazione, l'espressione genica e la diffusione di una progenie infettante [5, 46]. Anche l'utilizzo di una via di trasmissione efficace e l'elusione della risposta immunitaria sono fattori importanti.

Un ruolo di primo piano è sicuramente svolto dalla capacità di legare un recettore cellulare specifico; per avere il salto di specie di un virus occorre che il potenziale nuovo ospite abbia sulla superficie delle cellule un recettore riconosciuto dal virus perché questo vi si possa legare e quindi entrare nella cellula [1, 5].

In generale, i virus possono essere distinti in due gruppi, da un lato ci sono virus così detti "generalisti" cioè in grado di riconoscere e legarsi a vari recettori cellulari e quindi più predisposti a superare le barriere di specie ed infettare ospiti diversi, dall'altro ci sono invece virus "specializzati" cioè in grado di riconoscere e legarsi solo ad un tipo di recettore cellulare e che quindi incontrano più difficoltà nel superare le barriere di specie [3, 5, 41]. Allo stesso modo sono più facilitati nell'effettuare un salto di specie quei virus che si legano a recettori cellulari altamente conservati tra le diverse specie animali mentre trovano più difficoltà quelli che si legano a recettori molto specifici, perché devono subire un processo evolutivo ed adattativo maggiore [3, 41].

I diversi fattori che influenzano la capacità del virus di trasmettersi da una specie d'ospite ad un'altra, come la capacità di legarsi al recettore cellulare del nuovo ospite ma non solo, sono generalmente influenzati dai vincoli filogenetici esistenti tra le specie d'ospite in questione; nel senso che più l'ospite d'origine e quello nuovo sono correlati filogeneticamente, più è alta la probabilità che le barriere d'ospite vengano superate con

successo (è più facile che un patogeno si trasmetta da un mammifero ad un altro mammifero piuttosto che da una pianta o un insetto ad un mammifero) [3]. Questo perché il virus avrà maggiore probabilità di trovare nel nuovo ospite caratteristiche e condizioni d'infezione e replicazione simili a quelle dell'ospite d'origine se questi due sono filogeneticamente correlati, dovrà cioè subire un processo evolutivo meno complesso per potersi adattare al nuovo ospite [3].

Se da un lato la stretta correlazione filogenetica tra due ospiti può rappresentare un vantaggio per il superamento delle barriere di specie da parte del virus, dall'altro, due specie d'ospite strettamente correlate possederanno sistemi immunitari similmente sviluppati e quindi il nuovo ospite avrà più possibilità di reagire alla nuova infezione e quindi di limitare l'adattamento del virus [3].

La correlazione filogenetica tra i due ospiti non è però l'unico fattore che influenza il passaggio di un virus tra due ospiti; un'altra variabile molto importante è l'esposizione del nuovo ospite al virus [3], cioè il contatto o la separazione tra l'ospite donatore ed il ricevente, che possono essere influenzati da fattori geografici, ecologici e comportamentali [5]. Anche se potenzialmente un patogeno può trasmettersi con meno vincoli da un primate all'uomo, è molto più probabile che un uomo contragga una nuova infezione dai roditori (filogeneticamente meno correlati) perché il livello di esposizione a questi animali è notevolmente superiore.

Il fattore principale che influenza il contatto tra ospite donatore e ricevente è l'uomo, in quanto le dinamiche di popolazione, i trasporti commerciali e non, l'azione sull'ambiente ed i comportamenti sociali, modificano le dinamiche e le interazioni tra le altre specie animali creando situazioni di promiscuità potenzialmente pericolose.

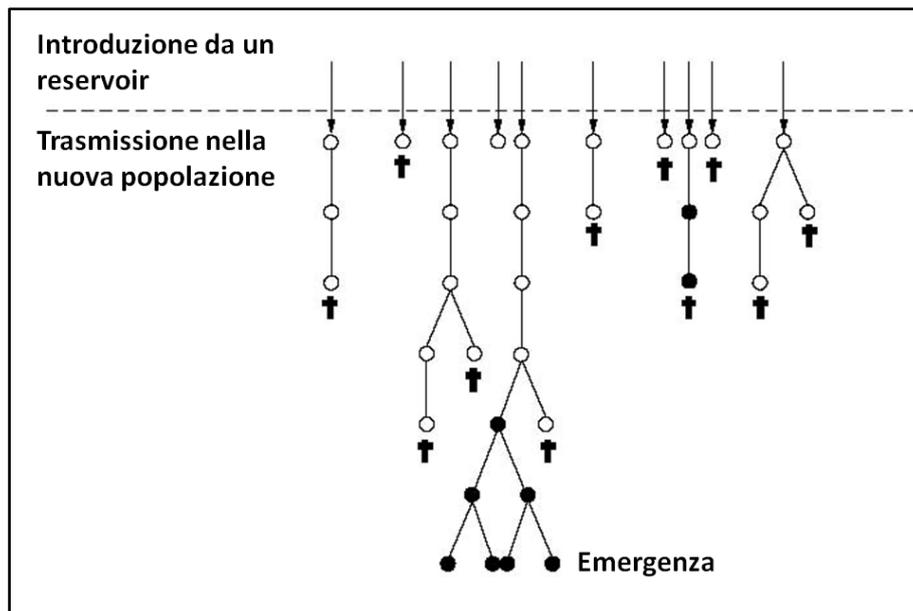
Una volta che il virus ha acquisito la capacità di infettare il nuovo ospite, possono essere necessari ulteriori adattamenti evolutivi per avere la disseminazione del patogeno; esistono infatti casi di patogeni che replicano e danno malattia in un nuovo ospite ma non sono in grado di trasmettersi da questo ad altri soggetti della stessa specie o di specie diversa [2].

L'ostacolo principale all'emergenza di un virus, successiva ad un salto di specie, è rappresentato pertanto dalla capacità di ottenere una trasmissione efficiente del virus stesso tra individui diversi, dall'infetto al sano, appartenenti alla nuova specie d'ospite [47]. Nella maggior parte dei casi infatti, i virus emergenti, non mostrano subito un buon adattamento al nuovo ospite e quindi riescono a trasmettersi solo per pochi cicli replicativi (3, 5, 48). Di conseguenza, il processo che porta all'emergenza virale richiede fasi successive di adattamento al nuovo ospite prima di mostrare un'adeguata trasmissibilità all'interno di esso.

Uno strumento per valutare le possibilità d'emergenza di un patogeno è il basic reproductive number (R_0), con cui si intende il numero di nuovi infetti generati da un individuo già infetto in una popolazione completamente sensibile [44]. Questo parametro dipende dal numero di contatti infetto-sano, dalla probabilità di trasmissione e dalla contagiosità del patogeno [47]. R_0 è in funzione dell'equilibrio che si crea tra il patogeno e l'ospite e, quindi, rappresenta una misura del grado di adattamento che il patogeno

manifesta nel dare un'infezione efficace in un determinato ospite. Per ogni patogeno, in un determinato ospite d'infezione ed in un preciso momento, può essere calcolato il suo R_0 che avrà valori più o meno alti a seconda dell'adattamento del virus in esso. Se R_0 mostra valori <1 la malattia si autolimiterà ed il patogeno andrà incontro alla completa eliminazione perché non sarà in grado di mantenersi nella popolazione, mentre se è >1 la malattia diffonderà nella popolazione ed il patogeno si stabilizzerà in essa. Inoltre, se il valore di R_0 sarà prossimo a 1 l'infezione avrà un carattere endemico, mentre se il valore sarà superiore a 1 l'infezione avrà un carattere epidemico [47].

Figura 1: Rappresentazione schematica dell'emergenza di un virus.



Cerchietto vuoto: virus non adattato con $R_0 < 1$. Cerchietto pieno: virus adattato con $R_0 > 1$.
Croce: il virus non si trasmette ulteriormente.

Tratto da: Antia R, Regoes RR, Koella JC, Bergstrom CT. *The role of evolution in the emergence of infectious diseases. Nature.* 2003;426(6967):658-61.

Un'efficiente trasmissione del virus all'interno del nuovo ospite richiede un valore di $R_0 > 1$ [44]. Difficilmente un virus, appena compiuto il salto di specie, mostrerà un valore di R_0 maggiore o uguale a 1, ma l'adattamento evolutivo che il patogeno può subire in seguito a questo evento, nonché fattori legati all'ospite ed all'ambiente, possono portare all'incremento del valore di R_0 e alla stabilizzazione dell'infezione nel nuovo ospite [43]. Quindi, la capacità di mutare del virus influenza enormemente la sua capacità di acquisire nel nuovo ospite un valore di $R_0 > 1$ e di diffondersi in esso. Inoltre, minore sarà il numero di mutazioni necessarie perché il virus possa raggiungere questo scopo, maggiori saranno le probabilità che questo possa avvenire (**Figura 1**) [44].

In definitiva, la probabilità che l'adattamento del virus al nuovo ospite avvenga con successo e che quindi il patogeno permanga in esso, dipende da quattro fattori [43]:

- a) Il numero di infezioni primarie, determinato dalla quantità di virus che viene trasmessa al nuovo ospite, dal numero di individui infettati e dal ripetersi di più trasmissioni tra ospite primario e nuovo;
- b) Il valore di R_0 nel nuovo ospite all'inizio della trasmissione, più sarà alto maggiore saranno le probabilità;
- c) Il numero di mutazioni o di cambiamenti genetici necessari affinché il virus si adatti a compiere il proprio ciclo replicativo nel nuovo ospite;
- d) Le caratteristiche proprie del patogeno, ossia la variabilità genetica del virus, la probabilità che le mutazioni necessarie avvengano e quanto R_0 cambierà ad ogni mutazione.

I meccanismi genetici ed evolutivi che determinano il salto di specie virale, cioè la trasmissione di un virus da un ospite tradizionale ad uno precedentemente resistente all'infezione, sono tuttora parzialmente sconosciuti [3, 49]. La prevenzione di futuri salti di specie e dell'emergenza di nuove patologie, soprattutto di quelle a carattere zoonotico, necessita da un lato di comprendere in modo più approfondito quali meccanismi permettono al virus di superare le barriere di specie e di adattarsi ad un nuovo ospite e, dall'altro, di individuare e valutare le relazioni esistenti tra gli ospiti che possiedono un elevato potenziale di trasmettere nuove infezioni ad altre popolazioni ed ospiti che manifestano un elevato rischio di acquisire nuovi patogeni.

1.2. Coronavirus

I coronavirus (CoV), ordine *Nidovirales* e famiglia *Coronaviridae*, sono un gruppo di virus dotati di genoma lineare a singolo filamento non segmentato di RNA a polarità positiva (ssRNA+) e provvisti di envelope, che possiedono un core a simmetria elicoidale ed una caratteristica morfologia a corona [50]. Fino a pochi anni fa, tutti i virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae* erano suddivisi in soli due generi: *Coronavirus* e *Torovirus*, e tutti i virus classificati nel genere *Coronavirus* erano suddivisi a loro volta in soli tre gruppi antigenici (gruppo I, gruppo II e gruppo III). La recente scoperta di una grande varietà di nuovi coronavirus in diverse specie d'ospite ha spinto il Coronavirus Study Group dell'International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) a proporre la riclassificazione della famiglia *Coronaviridae* in due sottofamiglie: *Coronavirinae* e *Torovirinae*. In particolare, la sottofamiglia *Coronavirinae* include ora tre generi: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, che hanno sostituito i tre tradizionali gruppi antigenici. Tutti i coronavirus dei mammiferi, compresi tutti i coronavirus identificati fino ad ora nei pipistrelli ed il virus della SARS, appartengono al primo ed al secondo genere, *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* (vecchi gruppi I e II), mentre tutti i coronavirus aviari appartengono al genere *Gammacoronavirus* (vecchio gruppo III). All'interno del genere *Gammacoronavirus* c'è una sola eccezione d'ospite rappresentata dal ceppo Beluga whale CoV SW1 che è stato identificato in un mammifero acquatico [12, 50, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>].

Il genoma dei coronavirus è il più grande genoma virale ad RNA non-segmentato conosciuto (circa 30 kbp) ed è suddiviso in un numero variabile di open reading frame (ORF), da 6 a 9. Gli ORF codificano un complesso di proteine non strutturali a funzione RNA polimerasica (Pol-1a,b) e quattro principali proteine strutturali: spike (S), di membrana (M), dell'envelope (E) e del nucleocapside (N). In aggiunta a queste vengono codificate alcune altre proteine non strutturali, in numero diverso tra i vari ceppi virali e con funzione ancora incerta, che hanno una posizione gruppo-specifica nel genoma [50].

Brevemente, le proteine costituenti il complesso Pol-1a,b, sono codificate da un ORF che occupa i 2/3 del genoma e presenta regioni altamente conservate tra i coronavirus. La glicoproteina dello spike è esposta sulla superficie del virione, è responsabile del riconoscimento e del legame con i recettori cellulari, induce una risposta anticorpale neutralizzante ed è codificata da un ORF con sequenza nucleotidica altamente variabile. La proteina del nucleocapside è legata all'RNA genomico ed induce la principale risposta immunitaria cellulo-mediata [50].

I coronavirus infettano numerosi ospiti animali, sia mammiferi (compreso l'uomo) che uccelli, e son caratterizzati da una notevole frequenza di ricombinazione che, insieme con l'alto tasso di mutazione, ne favoriscono l'adattamento a nuovi ospiti e nicchie ecologiche. Il target principale del virus è rappresentato da cellule epiteliali determinando

essenzialmente danni enterici e respiratori di diversa severità. La trasmissione avviene soprattutto attraverso secreti ed escreti oro-fecali.

1.2.1. Pipistrelli: caratteristiche eco-biologiche e potenziali serbatoi di virus

I pipistrelli, classificati nell'ordine dei Chiroteri, rappresentano tra i mammiferi uno degli ordini più antichi e, pur avendo origini molto antiche (tra i 50 e i 52 milioni di anni fa), le varie specie sono cambiate relativamente poco nel tempo in confronto agli altri mammiferi [51].

L'ordine dei Chiroteri, con circa 1000 specie, costituisce il secondo ordine dei mammiferi per grandezza, comprendendo il 20% di tutte le specie appartenenti alla classe dei Mammiferi e, probabilmente, è anche quello che comprende la maggior diversità di specie [52].

Tabella 1: Schema riassuntivo della classificazione dei pipistrelli.

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

I pipistrelli vengono suddivisi in due sotto-ordini, i *Mega-* e i *Microchiroptera*, comunemente conosciuti come macropipistrelli e micropipistrelli. I *Megachiroptera* sono

composti da una sola famiglia (*Pteropodidae* o volpi volanti) che include grandi pipistrelli (20-1500 g) frugivori confinati in Africa, Asia tropicale e Indo-Australia. Invece, i *Microchiroptera*, sono composti da 17 famiglie che comprendono piccoli pipistrelli (1,5-150 g) onnivori diffusi in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartico e di alcune isole oceaniche (**Tabella 1**) [10, 51, 52]. La distribuzione geografica dei pipistrelli segue un andamento decrescente nella ricchezza del numero di specie all'aumentare della latitudine, raggiungendo quindi la massima varietà in prossimità dell'equatore, dove si riscontrano le migliori condizioni per la produttività biologica: elevata esposizione solare, temperatura ottimale, stagione di crescita costante ed uniforme [53].

Data la notevole diversità di specie e le peculiari caratteristiche biologiche ed ecologiche (tutti i pipistrelli volano, alcune specie sono molto numerose e ampiamente distribuite, molti vivono strettamente in gruppo, sono allo stesso tempo sia predatori che prede), i pipistrelli possono diventare l'ospite ideale per un numero elevato di agenti infettivi importanti per la salute animale ed umana [10, 51, 54].

La trasmissione di virus dai pipistrelli all'uomo può avvenire per diverse vie: contatto diretto (morsi e graffi), inalazione di particelle infettanti (secrezioni e guano), artropodi vettori, consumo di carne di pipistrello in alcune parti del mondo (Cina, Guam ed alcune parti dell'Asia) ed attraverso ospiti secondari vertebrati che possono fungere da ospiti di amplificazione [10]. Con alcune eccezioni, il passaggio dei virus dai pipistrelli all'uomo è un evento raro; più frequentemente, la trasmissione di patogeni necessita di un secondo ospite intermedio animale in cui il virus acquisisce tropismo per l'uomo. Quindi, i pipistrelli, possono rappresentare un importante reservoir per molti virus zoonotici che nei Chiropteri causano solitamente infezioni persistenti [51].

Come già menzionato precedentemente, la capacità dei pipistrelli di ospitare diverse specie virali e di trasmettere patogeni ad altri animali, incluso l'uomo, è favorita da diverse caratteristiche biologiche ed ecologiche di questi animali; le principali sono:

- A) L'alta densità di popolazione e le abitudini di nidificazione permettono ai patogeni di diffondersi rapidamente in quanto la trasmissione di virus tra i pipistrelli può avvenire sia intra- che inter-specie, attraverso contatto diretto, o aerosol, o vettori artropodi [10, 23, 51, 55].

Il numero di pipistrelli in ogni colonia varia notevolmente da meno di 10 fino a più di 200.000 individui [10] e diverse specie possono convivere nello stesso habitat. Le varie specie di pipistrelli manifestano diversi gradi di fedeltà ai loro nidi; questo diverso comportamento è spesso correlato al tipo di nido, alla fase della vita ed alla forma di organizzazione sociale. Molte specie di pipistrelli che nidificano nelle cavità degli alberi o tra il fogliame manifestano una limitata fedeltà al sito di nidificazione rispetto alle specie nidificanti nelle caverne o nelle costruzioni umane che invece esibiscono una notevole fedeltà [56].

L'ambiente di nidificazione può essere costituito da strutture temporanee o permanenti, di origine naturale (grotte, spaccature nella roccia, nidi di uccelli o termiti o formiche, cavità nei tronchi degli alberi, o esposti sui rami degli alberi) o

costruite dall'uomo (miniere, tombe, case o palazzi, ponti) [10, 56]. L'occupazione da parte dei pipistrelli di strutture artificiali può comportare la condivisione dello stesso ambiente con l'uomo ed eventuali animali domestici o d'allevamento, con la possibile trasmissione di patogeni tra pipistrelli sinantropici e uomo od altri animali [10].

- B) Le abitudini alimentari dei pipistrelli permettono di distinguerli in: insettivori, frugivori, carnivori, onnivori e sanguivori [10]. I pipistrelli possono comportarsi da predatori, acquisendo agenti infettivi da altre specie animali predate, quali uccelli o insetti [10], ma essere anche preda di altri animali, trasmettendo a loro volta agenti infettivi ad altre specie.
- C) L'abilità nel volo ha permesso ai Chiroterri di diffondersi praticamente in tutte le terre emerse, evitando gli ostacoli che hanno invece influenzato la distribuzione degli altri mammiferi terrestri [10].

Alcuni generi sono migratori e si spostano tra due aree per evitare condizioni climatiche non favorevoli o per ricercare altre condizioni di crescita favorevoli, coprendo distanze che variano da 200-300 km fino a circa 2.000 km [10, 51]. Esistono due tipi di migrazioni: a) lunghe migrazioni stagionali, generalmente in direzione nord-sud, e b) brevi migrazioni stagionali, non necessariamente in direzione nord-sud. Le migrazioni sono particolarmente comuni per i pipistrelli che nidificano sugli alberi poiché le cavità dei tronchi o i rami non sono strutture adatte per raggiungere il letargo invernale. Inoltre, il fenomeno della migrazione è più frequente per le femmine che per i maschi [57, 58].

L'evoluzione del comportamento migratorio varia con la latitudine in cui sono stanziati i pipistrelli; in fatti, la propensione a migrare è maggiore alle alte latitudini rispetto alle basse ed un maggior numero di pipistrelli risiedente nelle aree temperate manifesta un più spiccato comportamento migratorio rispetto a quelli che vivono nelle aree tropicali [58].

Pertanto i pipistrelli hanno una notevole capacità di raggiungere nuove aree, come le isole, rispetto agli altri mammiferi non-volanti, ad eccezione dell'uomo. Il comportamento migratorio fornisce una ulteriore possibilità ai patogeni di diffondere a grandi distanze e di trasmettersi tra specie animali che normalmente non verrebbero in contatto [55].

- D) Le specie appartenenti alle famiglie *Vespertilionidae* e *Rhinolophidae* posseggono la capacità di entrare in una condizione di torpore giornaliero e di letargo stagionale per conservare l'energia durante le notti più fredde ed i mesi invernali [51]. Con il termine torpore si indica uno stato in cui l'animale permette alla sua temperatura corporea di abbassarsi al di sotto del normale livello omeotermico. L'abbassamento della temperatura corporea è lento e controllato e permette la conservazione dell'energia durante i momenti di inattività notturna. L'ibernazione

invece è una forma prolungata del torpore che avviene su base stagionale e può durare per giorni, settimane o mesi, in risposta a periodi prolungati di abbassamento delle temperature ambientali o a riduzione della disponibilità alimentare [59].

La capacità di questi pipistrelli di entrare in uno stato di letargo stagionale può facilitare la diffusione dei patogeni permettendo ai virus di superare l'inverno all'interno dell'ospite, facilitandone la persistenza nell'ambiente [51].

1.2.2. Coronavirus della SARS e dei pipistrelli

Il coronavirus associato alla sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV o Hu-SARS-CoV) è l'agente eziologico della SARS [60, 61, 62, 63] che causò negli uomini una epidemia mondiale nel 2002-2003, infettando più di 8.000 soggetti e causando la morte di circa 700 persone [64, 65, 66].

Le indagini condotte inizialmente in Cina dopo l'epidemia di SARS nell'uomo hanno identificato l'agente causale della SARS negli animali venduti nei wet-market presenti nell'area epidemica [11, 67]. L'infezione da SARS-CoV è stata riscontrata nel Masked palm civet o Civetta delle palme mascherata (*Paguma larvata*), nel Chinese ferret badger o Tasso furetto della Cina (*Melogale moschata*) e nel Raccoon dog o Cane procione (*Nyctereutes procyonoides*).

In particolare, è stato riportato che i virus identificati nei Masked palm civet nel 2003 differivano da quelli umani del 2004, indicando l'avvento di due trasmissioni indipendenti tra animale e uomo: un primo evento epidemico principale nel 2002-2003 ed una seconda serie di infezioni sporadiche nell'inverno 2003-2004 [11, 68, 69].

Successivi studi epidemiologici hanno dimostrato che i palm civet e gli altri animali dei wet-market non sono i reservoir principali del SARS-CoV in natura, ma solo degli ospiti di amplificazione secondari che incrementano l'eliminazione virale facilitando, attraverso uno stretto contatto con l'uomo, la trasmissione da animale a uomo e da uomo a uomo. Questa ipotesi è supportata dalle seguenti osservazioni:

- A) Il SARS-CoV era presente solo negli animali dei wet-market ma non nelle stesse specie presenti in ambiente selvatico;
- B) Il genoma del SARS-CoV evolveva rapidamente negli animali dei wet-market, suggerendo che questo virus stesse attraversando una fase di adattamento in queste specie invece di trovarsi in una fase di persistenza in equilibrio con l'ospite, come ci si aspetterebbe da un reservoir [10, 69].

Ciò nonostante, il ritrovamento del SARS-CoV negli animali dei wet-market in Cina ha comunque fornito l'evidenza che il salto di specie del virus sia alla base della genesi dell'epidemia di SARS [16].

La ricerca del reservoir di SARS-CoV negli animali selvatici ha successivamente portato alla scoperta di una grande varietà di coronavirus appartenenti ai primi due generi, *Alpha-* e *Betacoronavirus*, in numerose specie di pipistrelli, prima in Asia [9, 16, 21, 23,

24, 71, 70] e poi in tutti i continenti in cui vivono pipistrelli [13, 14, 18-20, 22, 26, 54, 72-81]; ma nessuno dei coronavirus identificati nei pipistrelli apparteneva ai *Gammacoronavirus*. Questi ritrovamenti, in associazione con la natura ancestrale dei coronavirus identificati nei pipistrelli in comparazione con i coronavirus delle altre specie animali, ha portato ad ipotizzare che tutti i coronavirus dei mammiferi appartenenti ai primi due generi derivino da virus ancestrali comuni presenti nei pipistrelli [12, 82].

Attualmente, non ci sono evidenze dirette della trasmissione del SARS-CoV dai pipistrelli all'uomo [83] e non è ancora stata identificata la specie che rappresenta il serbatoio naturale del vero progenitore del SARS-CoV; ma, un gruppo di coronavirus strettamente correlato geneticamente al SARS-CoV, è stato riscontrato in varie specie di pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus* (comunemente detti “ferro di cavallo” per la caratteristica anatomia delle narici) e ad alcuni altri generi [9, 13-25]. Questi virus sono stati chiamati SARS-like CoV. I SARS-like CoV, insieme ai SARS-CoV umani e degli animali dei wet-market, sono stati inclusi nel genere *Betacoronavirus*, in un raggruppamento tassonomico creato appositamente per loro, i severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-related CoV) (<http://www.ictvonline.org/>).

Sono state formulate almeno tre ipotesi per spiegare l'origine del SARS-CoV:

- a) Alcuni ospiti intermedi ancora sconosciuti sono stati responsabili dell'adattamento e trasmissione del SARS-CoV dai pipistrelli agli animali dei wet-market o all'uomo;
- b) C'è un ceppo di SARS-CoV strettamente correlato al ceppo che ha causato l'epidemia umana del 2002-2003 in un ospite animale diverso dai pipistrelli, che è in grado di passare direttamente dal reservoir animale (probabilmente un pipistrello) agli animali dei wet-market o all'uomo;
- c) Una specie di pipistrello non ancora identificata, o anche un gruppo di essi, potrebbe essere il reservoir diretto del SARS-CoV degli animali dei wet-market o dell'uomo, in quanto possiede il recettore cellulare adatto per la replicazione del virus (ACE2, vedi in seguito) [84].

In merito alla presenza dei coronavirus nei pipistrelli, è stata osservato in più occasioni un legame evolutivo tra alcuni Bat-CoV ed i loro ospiti. Infatti, in diversi studi, è stato riportato che molti coronavirus dei pipistrelli sembrano essere specie-specifici, riscontrando lo stesso tipo virale solo in una specie di pipistrello mentre, la stessa specie o genere di pipistrello, può albergare più di un tipo di coronavirus [10, 23, 85]. In molti casi i Bat-CoV sembrano essere associati più strettamente alla specie d'ospite che all'area di campionamento; infatti, la stessa specie può albergare lo stesso tipo virale anche in aree geografiche molto distanti e, allo stesso tempo, diverse specie di pipistrello che condividono lo stesso ambiente possono trasportare coronavirus differenti [21, 76, 79]. Questa associazione virus-ospite può perciò essere utilizzata per una predizione della distribuzione geografica dei coronavirus infettanti i pipistrelli [13].

Tale assunto non è però costante, in quanto, sono stati riportati anche casi di infezione da CoV strettamente correlati geneticamente in diverse specie di pipistrello che condividono lo stesso ambiente formando un'unica colonia [26]; quindi anche le abitudini

di nidificazione dei pipistrelli, in colonie formate da un'unica specie o da più specie insieme, possono influenzare il salto di specie del virus [14].

Inoltre, l'infezione da coronavirus, sembra essere in relazione sia con l'età dei pipistrelli che con il periodo dell'anno, o meglio con la fase stagionale attraversata dalla colonia. Si è osservata una maggiore efficienza di replicazione virale nei giovani rispetto agli adulti, con gli individui più giovani della colonia (ancora lattanti) che rappresentano una popolazione più sensibile all'amplificazione del virus e lo trasmettono alle femmine adulte in lattazione [20, 76]. La relazione con le fasi stagionali, anch'essa strettamente connessa all'età degli animali, si manifesta con due picchi di replicazione virale nelle colonie materne (composte soprattutto da femmine in lattazione e dai loro piccoli): il primo picco si ha alla ricostituzione della colonia prima delle nascite, con la formazione di una popolazione sensibile ad elevata densità e stretto contatto che favorisce alti tassi di infezione; il secondo picco si ha dopo il parto e dopo il calo dell'immunità materna, con l'instaurarsi di una sotto-popolazione di nuovi nati ancora privi di immunità adattativa e quindi sensibili all'infezione [75].

Ad oggi, i SARS-like CoV sono stati identificati in Asia, Africa ed Europa. La maggior parte dei ceppi di SARS-like CoV appartengono ad alcune specie di *Rhinolophus*, in cui sono causa di infezioni acute ed auto-limitanti del tratto gastrointestinale [15]. Il ritrovamento di vari ceppi di SARS-like CoV in diverse specie di *Rhinolophus* suggerisce che questo gruppo di coronavirus sia in rapida evoluzione e che possa superare la barriera di specie [15]. Parallelamente, alcuni ceppi di SARS-like CoV sono stati identificati in ospiti diversi dai *Rhinolophus* spp.; è il caso di tutti i ceppi africani [18, 19, 22] e di alcuni ceppi sud-est asiatici [14], in cui possono causare infezioni persistenti [14].

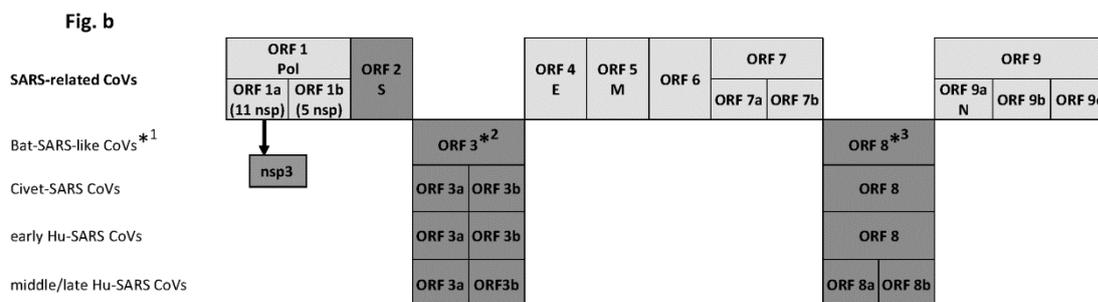
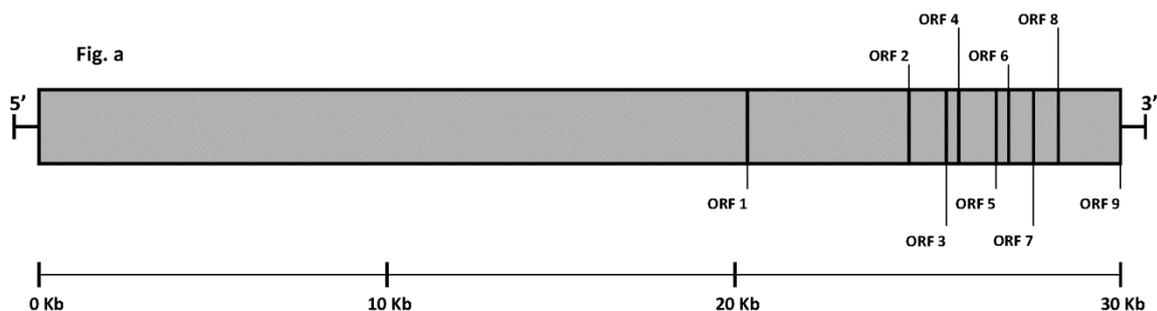
Tra i pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus*, il Ferro di cavallo cinese (*Rhinolophus sinicus*) potrebbe giocare un ruolo importante nell'epidemiologia dei SARS-like CoV. Innanzitutto, è la specie in cui è stata riscontrata fino ad ora la più alta prevalenza d'infezione [11] e, in secondo luogo, due ceppi virali identificati in questa specie, Rs672 e Rp3 [9, 25], sono geneticamente molto simili e mostrano un potenziale sito di ricombinazione subito dopo il codone di inizio del gene S, con la regione parentale maggiore filogeneticamente più correlata ai SARS-CoV umani che ai SARS-like CoV dei pipistrelli e la regione parentale minore filogeneticamente più correlata ai SARS-like CoV dei pipistrelli che ai SARS-CoV umani [25]. E' possibile che l'acquisizione mediante ricombinazione di diversi RBD (receptor binding domain) possa aver avviato l'iniziale salto di specie dai pipistrelli ad altri mammiferi [69].

1.2.3. Il genoma dei SARS-like coronavirus

Tutti i ceppi di SARS-like CoV dei pipistrelli sequenziati fino ad ora per l'intero genoma mostrano un'organizzazione simile a quella dei SARS-CoV umani e degli animali dei wet-market. Il genoma è composto, scorrendo in direzione 5'-3', da: una sequenza leader

non codificante all'estremità 5', complesso della polimerasi ORF1a,b, ORF2 o gene S, ORF3 (composto da ORF3a,b,c nel ceppo Rf1), ORF4 o gene E, ORF5 o gene M, ORF6, ORF7a,b, ORF8, ORF9a(o gene N),b,c, e dalla regione terminale non codificante all'estremità 3' composta da un motivo a stem loop II-like (s2m) e da una coda di poli-A (**Figura 2a**). Un'altra caratteristica genomica comune ai SARS-CoV ed ai SARS-like CoV è la presenza di una sequenza nucleotidica conservata (5'-ACGAAC-3'), con funzione di regolazione della trascrizione (TRS) a livello della terminazione 3' della sequenza leader presente all'estremità iniziale 5' di tutti gli ORF [63, 86]. Questa sequenza ripetuta è indispensabile per la produzione degli mRNA sub-genomici ed è identica in tutti gli ORF dei SARS-CoV e nella maggior parte di quelli dei Bat-SARS-like CoV [9, 24].

Figura 2: Rappresentazione schematica del genoma dei SARS-CoV umani, dei palm civet e dei pipistrelli.



La Fig.2a rappresenta schematicamente l'organizzazione genomica dei SARS-related CoV. La Fig.2b rappresenta schematicamente le diversità presenti nell'organizzazione genomica dei SARS-related CoV.

Grigio chiaro: tratti del genoma poco variabili. Grigio scuro: tratti del genoma molto variabili.

*1: non include i Bat-SARS-like CoV africani ed europei.

*2: il ceppo Rf1 presenta ORF3a,b,c.

*3: il ceppo HKU3-8 presenta ORF8a,b,c.

Ciononostante, esistono comunque numerose differenze nell'organizzazione genomica dei SARS-like coronavirus e tra questi e i SARS-CoV umani e degli animali

dei wet-market (**Figura 2-b**) [11, 19]. Le differenze maggiori sono state osservate nell'nsp3 (la terza proteina non-strutturale codificata dall'ORF1a,b), nel gene S e negli ORF 3 e 8; queste regioni posseggono la minor identità nucleotidica ed aminoacidica in confronto con la restante parte del genoma [11, 15, 16]. Le differenze genomiche principali tra i virus della SARS e i SARS-like CoV sono localizzate nell'ORF8 che è frequentemente soggetto a delezioni. Tutti i Bat-SARS-like CoV (eccetto il ceppo HKU3-8, GQ153543), i civet-SARS-CoV (eccetto un ceppo) e i ceppi di Human-SARS-CoV identificati nella fase precoce dell'epidemia, presentano una sequenza di 29 nt che unisce l'ORF8a all'ORF8b formando un unico ORF8; al contrario, gli Human-SARS-CoV identificati nelle fasi successive dell'epidemia, non hanno questa sequenza di 29 nt per cui i due ORF8a e 8b sono divisi ed il tradotto proteico perde la sua funzionalità [11, 15, 16, 69, 87]. Il ceppo HKU3-8 di Bat-SARS-like CoV rappresenta una eccezione in quanto presenta una breve delezione di 26 nt che suddivide questo ORF in tre brevi parti (ORF8a,b,c) [15].

Il gene S dei Bat-SARS-like CoV è caratterizzato da una bassa percentuale di identità di sequenza, soprattutto a livello del dominio S1, in confronto con i rispettivi geni dei SARS-CoV umani e degli animali dei wet-market. Nel dominio S1 dei Bat-SARS-like CoV sono presenti diverse inserzioni e delezioni, soprattutto nella regione RBD, che svolge una funzione critica per il legame del virus con il recettore cellulare dell'ospite e per la risposta immunitaria [9, 16].

La regione nsp3 dell'ORF1a rappresenta una porzione relativamente variabile del genoma dei Bat-SARS-like CoV. In particolare, a livello dell'nsp3 del genoma del ceppo Rs672 di Bat-SARS-like CoV, è stata rilevata una delezione di 579 nt che è stata riscontrata anche in un solo ceppo di Human-SARS-CoV (AY463060) identificato nella fase tardiva dell'epidemia del 2003. Yuan et al. [25] hanno ipotizzato che questa delezione sia insorta indipendentemente nei due ceppi virali, Rs672 e Human-SARS-CoV, e che non si sia trasmessa mediante un fenomeno di ricombinazione omologa [88].

Oltre queste principali differenze, occorre inoltre aggiungere altre peculiarità genomiche che distinguono alcuni ceppi identificati in Africa ed Europa [13, 19], che saranno trattate più ampiamente in seguito.

1.2.4. La proteina Spike ed il tropismo d'ospite

La S è la più grande proteina strutturale codificata dai coronavirus, media il legame e la fusione del virus con il recettore di membrana della cellula ospite ed è il principale determinante antigenico. Il tropismo d'ospite dei coronavirus è determinato principalmente da questa proteina che è composta da due porzioni: l'estremità N-terminale (S1) che svolge una funzione di legame al recettore e l'estremità C-terminale (S2) che svolge le funzioni di fusione ed entrata tra virus e cellula [67].

Il dominio di legame al recettore (RBD) è un tratto di circa 200 aminoacidi, posto all'estremità S1; ha la funzione di legarsi al recettore specifico sulla superficie della

cellula ospite e rappresenta il principale epitopo immunostimolante e neutralizzante della proteina S. L'RBD è composto da due sotto-domini: un core ed un loop. Nel loop è presente il motivo di legame al recettore (RBM) che prende contatto direttamente con il recettore cellulare dell'ospite.

Nei Bat-SARS-like CoV, l'estremità S1 presenta un grado di similarità basso con il corrispettivo dei SARS-CoV, soprattutto nel RBD, mentre la similitudine è elevata a livello dell'estremità S2. Queste differenze implicano che i Bat-SARS-like CoV e i SARS-CoV riconoscono come recettore molecole diverse sulla superficie della cellula ospite ma sfruttano lo stesso meccanismo di entrata [11, 89].

L'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2) dell'uomo e dei palm civet, espresso sulla superficie delle cellule polmonari e del tratto gastrointestinale, è stato identificato come il recettore cellulare per il SARS-CoV mentre, i Bat-SARS-like CoV, sono incapaci di utilizzare l'ACE2 di uomini, palm civet e pipistrelli e sfruttano un'altra molecola non ancora identificata [67, 69, 84, 89, 90]. La capacità dei SARS-CoV, rispetto ai Bat-SARS-like CoV, di legarsi all'ACE2 umano è dovuta a minime variazioni nella sequenza dell'RBD di questi virus ed è perciò possibile che i Bat-SARS-like CoV ottengano questa capacità di infettare le cellule umane attraverso modificazioni nella sequenza del gene S. Tale evento potrebbe avvenire per ricombinazione genetica tra un Bat-SARS-like CoV ed un altro CoV in grado di legarsi all'ACE2 umano, infettanti contemporaneamente un pipistrello le cui cellule presentino recettori specifici per entrambi i virus [89]. L'acquisizione mediante ricombinazione della capacità di legame con l'ACE2 umano da parte dei Bat-SARS-like CoV, è favorita dalla elevata variabilità genetica caratterizzante gli ACE2 dei pipistrelli, in confronto a quella degli altri animali fino ad ora riconosciuti sensibili al SARS-CoV [84]. L'elevata diversità dei recettori cellulari dei pipistrelli avvalorata la possibilità che ci sia una specie di pipistrello non ancora caratterizzata che possa agire da reservoir per il SARS-CoV o per un suo progenitore. A tal proposito, è già stato segnalato che l'ACE2 di *Rhinolophus sinicus* e *Myotis daubentonii* supportano l'entrata del SARS-CoV nelle cellule, anche se con una efficienza diversa rispetto a quella manifestata dall'ACE2 umano [84].

1.2.5. Origine dei SARS-like CoV

Ad oggi, i SARS-like CoV sono stati identificati in pipistrelli asiatici, europei ed africani. Tutti i Bat-SARS-like CoV identificati in Europa e la maggior parte di quelli identificati in Asia, sono strettamente correlati ad alcune specie del genere *Rhinolophus* [9, 13, 15-17, 20, 23-25].

In Africa, invece, i SARS-like CoV sono stati identificati in diverse specie di pipistrelli appartenenti ai generi *Hipposideros* e *Chaerophon*, indicando la mancanza di una stretta specie-specificità d'ospite in quest'area geografica [18, 19, 22]. L'assenza di una stretta specie-specificità d'ospite mostrata dai Bat-SARS-like CoV in Africa, è supportata anche da indagini sierologiche volte a cercare anticorpi reattivi contro SARS-

CoV in sieri appartenenti a sette diversi generi di pipistrelli (*Hypsignathus*, *Lyssonycteris*, *Miniopterus*, *Mops*, *Myonycteris*, *Rhinolophus* and *Rousettus*) [91].

Di notevole interesse è il ceppo di SARS-like CoV ZBCoV (HQ166910), identificato da Quan et al. [19] in un pipistrello appartenente al genere *Hipposideros* in Nigeria, che presenta diverse peculiarità genomiche in confronto con gli altri Bat-SARS-like CoV; le principali sono:

- A) Nell'ORF6 non è presente il motivo TRS;
- B) La sequenza del gene S presenta numerose differenze in confronto con gli altri SARS-CoV ed i SARS-like CoV, soprattutto nel dominio S1 che è coinvolto nel legame con il recettore cellulare;
- C) L'ORF3 è più breve;
- D) La regione tra i geni M e N è particolarmente breve, a causa di una delezione, con conseguente sovrapposizione dell'ORF6 (non suddiviso in a e b) con il gene M e l'ORF7, e la sovrapposizione dell'ORF8 con l'ORF7 ed il gene N;
- E) La presenza di due motivi s2m, anziché uno, dopo il gene N.

Il ceppo ZBCoV è strettamente correlato geneticamente con i ceppi GhanaBt-CoV identificati da Pfefferle et al. [18] in Ghana. Filogeneticamente, i ceppi africani clusterizzano in un unico gruppo e potrebbero essere considerati un sottogruppo separato all'interno dei *Betacoronavirus*, in posizione ancestrale rispetto al gruppo dei SARS-related CoV, che include i SARS-CoV e gli altri *Rhinolophus*-SARS-like CoV asiatici ed europei [18, 19].

Questi risultati, in associazione con l'apparente assenza di Bat-SARS-like CoV in pipistrelli del genere *Hipposideros* in Asia, potrebbero supportare un'origine africana, piuttosto che asiatica, dei SARS-like CoV, ipotizzando la successiva migrazione del virus dall'Africa all'Asia, con adattamento del virus nei rinolofi e formazione dell'attuale sottogruppo dei SARS-related coronavirus [19].

Recentemente, uno studio condotto in Thailandia [14], ha identificato alcuni ceppi di SARS-like CoV in pipistrelli appartenenti ad un genere diverso dai rinolofi, l'*Hipposideros*. Gli autori, osservando in letteratura una sovrarappresentazione delle famiglie *Rhinolophidae* e *Vespertilionidae* (dovuta ad una alta pressione di campionamento) ed una scarsa rappresentazione di altre famiglie di pipistrelli, hanno ampliato nelle loro ricerche la numerosità dei campioni prelevati da famiglie meno studiate, identificando ceppi virali sia di *Alphacoronavirus* (Ha ACoV R, HQ898913) che di SARS-like CoV (HiBCoV T, HM017067) in diverse specie di *Hipposideridae*. La famiglia *Hipposideridae* è strettamente imparentata con la *Rhinolophidae* e, come questa, presenta una notevole diversità di specie; quindi anche negli *Hipposideridae* potrebbe esserci una notevole prevalenza d'infezione da coronavirus, compresi i SARS-like CoV, che fino ad ora è stata sottostimata a causa di una distorsione di campionamento.

Questo ritrovamento confuta la stretta specie-specificità d'ospite ipotizzata tra i Bat-SARS-like CoV ed i rinolofi e genera nuovi quesiti sull'origine di questi virus. Infatti, la sequenza del ceppo di SARS-like CoV HiBCoV T, seppur breve, risulta strettamente correlata a quella dei Bat-SARS-like CoV identificati in Africa. Inoltre, tutti i Bat-SARS-

like CoV sequenziati fino ad ora possono essere distinti filogeneticamente in due gruppi principali, uno contenente i virus identificati nei pipistrelli della famiglia *Rhinolophidae* ed uno contenente i virus identificati nei pipistrelli della famiglia *Hipposideridae*, indipendentemente dall'area geografica di appartenenza.

In conseguenza di questo, la teoria di Quan et al. [19], che ipotizza l'origine africana dei SARS-like CoV in pipistrelli diversi dai rinolofi, non è più l'unica spiegazione possibile dell'evoluzione di questi virus. Infatti, il raggruppamento su base filogenetica dei Bat-SARS-like CoV in due cluster che si distinguono per la famiglia d'ospite di appartenenza (*Rhinolophidae* o *Hipposideridae*), può essere spiegata da un'evoluzione indipendente del virus nelle due famiglie di Chiroteri a cui sarebbe stato trasmesso anticamente da un ospite ancestrale comune [14]. A supporto di questa ipotesi vi è inoltre la posizione intermedia della sequenza di un ceppo di *Betacoronavirus* non ancora classificato (R.aur/Australia/CoV000/2006, ID GenBank: EU834950) riscontrato in Australia nel *Rhinonictoris aurantia*; una specie di pipistrello che pur essendo classificata tra gli *Hipposideridae*, viene considerata intermedia tra *Rhinolophidae* o *Hipposideridae*.

1.2.6. La situazione europea

Nonostante le vaste dimensioni ed il clima mite dell'area mediterranea, la popolazione di pipistrelli europea è composta da un numero relativamente basso di specie (**Tabella 2**), in contrasto con l'elevata diversità di specie caratterizzante l'ordine dei Chiroteri. I pipistrelli sono comunque presenti in tutti i paesi europei, con maggior diversità nell'area mediterranea. Al momento sono ancora poche le informazioni riguardanti la presenza di infezioni da coronavirus nella popolazione europea di pipistrelli; pochi studi sono stati condotti fino ad ora ed inoltre, la maggior parte di essi, è stata svolta nell'Europa centro-orientale, investigando solo alcune delle specie presenti.

A causa delle peculiari condizioni climatiche e della posizione geografica, l'area del Mediterraneo è caratterizzata da una notevole biodiversità e rappresenta un potenziale ponte per la migrazione dei virus dalle aree medio-orientali ed africane verso l'Europa. Ciononostante, con l'eccezione di uno studio condotto in Spagna [26], l'area mediterranea è stata ignorata dagli altri studi.

Il primo studio svolto in Europa per rilevare la presenza di coronavirus nei pipistrelli è stato eseguito nel 2008 da Gloza-Rausch et al. [76] nel nord della Germania. Gloza-Rausch et al. testarono campioni fecali di più di 300 pipistrelli mediante reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), amplificando un tratto dell'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp, la 12° proteina non strutturale codificata dall'ORF1a,b), altamente conservato per tutti i coronavirus e frequentemente utilizzato per l'analisi filogenetica di questi virus. Gli autori rilevarono una prevalenza di infezione del 9,8% da Bat-CoV appartenenti agli *Alphacoronavirus* e tutti i pipistrelli risultanti positivi appartenevano ai generi *Myotis* e *Pipistrellus*, ma nessun rinolofa fu incluso nel

Tabella 2: Elenco delle specie di pipistrelli presenti in Europa

Specie di Chiroteri in Europa (www.faunaeur.org)			IT	ES	FR	GE	GB	NL	BG	SL
Sotto-ordine	Famiglia	Genere e specie								
Macrochiroptera	Pteropodidae	<i>Rousettus aegyptiacus</i>								
Microchiroptera	Molossidae	<i>Tadarida teniotis</i>	X	X	X				X	
	Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Rhinolophus hipposideros</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Rhinolophus euryale</i>	X	X	X				X	X
		<i>Rhinolophus blasii</i>	X	X	X				X	
		<i>Rhinolophus mehelyi</i>	X	X	X				X	
	Vespertilionidae	<i>Barbastella barbastellus</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Eptesicus botae</i>								
		<i>Eptesicus nilssonii</i>	X		X	X			X	X
		<i>Eptesicus serotinus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Hypsugo savii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Miniopterus schreibersii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis alcaethoe</i>		X	X					
		<i>Myotis aurascens</i>	X						X	
		<i>Myotis bechsteinii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis blythii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis brandtii</i>	X		X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis capaccinii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis dasycneme</i>	X		X	X		X	X	
		<i>Myotis daubentonii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis emarginatus</i>	X	X	X	X		X	X	X
		<i>Myotis myotis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis mystacinus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis nattereri</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis punicus</i>	X		X					
		<i>Nyctalus azoreum</i>								
		<i>Nyctalus lasiopterus</i>	X	X	X				X	
		<i>Nyctalus leisleri</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Nyctalus noctula</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus kuhlii</i>	X	X	X	X			X	X
		<i>Pipistrellus maderensis</i>		X						
		<i>Pipistrellus nathusii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Plecotus auritus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Plecotus austriacus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Plecotus kolombatovici</i>								
		<i>Plecotus macrobullaris</i>	X	X	X					X
		<i>Plecotus sardus</i>	X							
		<i>Plecotus teneriffae</i>		X						
		<i>Vespertilio murinus</i>	X		X	X	X	X	X	X

IT=Italia; FR=Francia; GB=Regno Unito; ES=Spagna; GE=Germania; NL=Olanda; BG=Bulgaria; SL=Slovenia.

campionamento. Questo studio non identificò coronavirus correlati al SARS-CoV ma ipotizzo sia una stretta associazione dei Bat-CoV con l'ospite d'infezione piuttosto che con l'area di campionamento, che un ruolo centrale dei pipistrelli di giovane età nell'amplificazione virale e nella trasmissione alle femmine adulte in lattazione.

Nel 2010, Reusken et al. [79] svolsero un'indagine sulla presenza di coronavirus nella popolazione olandese di pipistrelli. Più di 200 pipistrelli, appartenenti a 13 diverse specie, furono testate usando una metodica di RT-PCR rilevando una prevalenza di infezione del 16,9 %. In questo studio non furono rilevati SARS-related CoV ma coronavirus correlati sia agli *Alphacoronavirus* che ai *Betacoronavirus* in alcune specie appartenenti ai generi *Myotis*, *Nyctalus* e *Pipistrellus*. Anche in questo studio fu osservata una stretta associazione tra ceppo virale e specie d'ospite piuttosto che con l'area di campionamento. La prevalenza d'infezione da coronavirus del 16,9 % rilevata in Olanda era quasi doppia di quella rilevata nel nord della Germania (9,8 %), anche se le specie testate erano le stesse, suggerendo una variazione nella distribuzione geografica dei Bat-CoV. Tale distribuzione potrebbe essere influenzata da diversi fattori quali la latitudine e le condizioni climatiche nell'area di campionamento, la composizione e la densità della popolazione campionata, il comportamento e l'ecologia delle diverse colonie di pipistrelli.

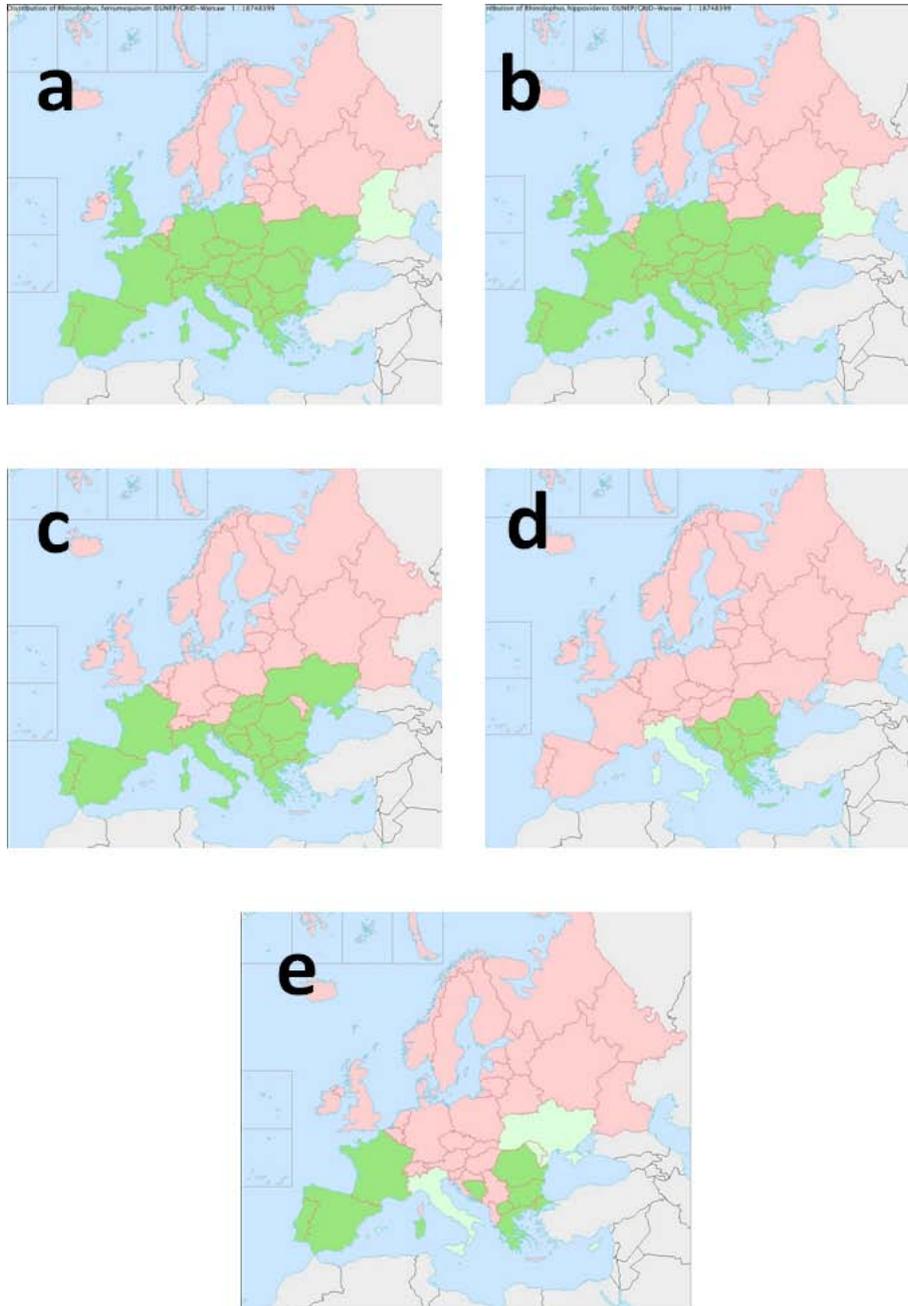
In entrambi i lavori, furono maggiormente campionate due specie di pipistrelli appartenenti al genere *Myotis* (*Myotis daubentonii* e *M. dasycneme*) e, mentre *M. dasycneme* mostrava nei due studi approssimativamente la stessa prevalenza di infezione, *M. daubentonii* presentava una prevalenza nettamente superiore in Olanda rispetto al nord della Germania. Questa divergenza nella prevalenza d'infezione tra diverse aree europee potrebbe quindi essere dovuta a fattori specifici legati alle singole specie piuttosto che a fattori generali correlati all'ambiente e all'area geografica.

Tra il 2010 ed il 2011, sono stati pubblicati altri quattro studi riguardanti i coronavirus nei pipistrelli di diverse aree europee [13, 20, 26, 75]. In tre di questi studi [13, 20, 26], sono stati testati anche campioni fecali appartenenti ad alcune specie del genere *Rhinolophus* che, in Europa, è rappresentato da cinque diverse specie con differente distribuzione territoriale (**Tabella 1** e **Figura 3**) (www.faunaeur.org). I lavori di Drexler et al. (2010) e Rhitaric et al. (2010) hanno dimostrato l'esistenza di una stretta correlazione tra SARS-like CoV e *Rhinolophus* spp. in Europa, come già era stato evidenziato per l'Asia.

Rhitaric et al. [20] hanno svolto un'indagine sulla presenza di coronavirus nei pipistrelli in Slovenia, amplificando mediante RT-PCR un frammento altamente conservato del gene RdRp. Quattordici dei 104 pipistrelli testati sono risultati positivi e tutti appartenevano ai 36 *Rhinolophus hipposideros* inclusi nel campionamento. Solo questa specie di rinolofi è risultata positiva per coronavirus ed analisi bioinformatiche condotte sulle sequenze ottenute mostrarono che i ceppi identificati in Slovenia appartenevano ai *Betacoronavirus* e che, tra le sequenze depositate nel database di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), il ceppo con cui mostravano maggior

correlazione era il Bat-SARS-like CoV Rp3 (DQ071615), identificato in Cina da un esemplare di *Rhinolophus sinicus* nel 2004 [9, 20, 25].

Figura 3: Distribuzione delle specie di *Rhinolophus* in Europa.



a: *R. ferrumequinum*. b: *R. hipposideros*. c: *R. euryale*. d: *R. blasii*. e: *R. mehelyi*.
Verde scuro: presente. Verde chiaro: in dubbio. Rosso: assente.
Tratto da www.faunaeur.org

Come nel primo studio compiuto in Germania, anche in Slovenia i pipistrelli risultanti positivi erano giovani o femmine in lattazione, corroborando l'ipotesi che il virus replichi

con maggior efficacia nei pipistrelli giovani piuttosto che negli adulti e che i giovani possano trasmettere il virus alle femmine adulte in lattazione.

Nello studio di Rihtaric et al., furono testati anche 26 *Myotis daubentonii* ma tutti risultarono negativi; considerando quanto già visto in Olanda ed in Germania per questa specie, si avvalorava l'ipotesi di un possibile decremento nella prevalenza d'infezione da CoV in Europa, procedendo da nord-ovest verso sud-est.

Drexler et al. [13], hanno condotto uno studio sulla presenza di coronavirus in diverse specie appartenenti alle famiglie *Rhinolophidae* e *Vespertilionidae* in Bulgaria, in un'area in cui coesistono le cinque specie europee del genere *Rhinolophus*. Duecentodue dei 499 pipistrelli testati sono risultati positivi per coronavirus mediante metodiche di RT-PCR o nested RT-PCR che amplificavano un frammento altamente conservato del gene RdRp. I virus identificati appartenevano sia agli *Alpha-* che *Betacoronavirus*, ma tutti i SARS-like CoV furono riscontrati nei rinolofi (101 positivi su 389 rinolofi testati). Un ceppo di SARS-like CoV identificato in Bulgaria è stato completamente sequenziato (BM48-31/BGR/2008, GU190215) ed il suo genoma mostrava caratteristiche particolari in confronto con gli altri SARS-like CoV conosciuti:

- A) Notevoli divergenze nelle proteine 3b e 6;
- B) Assenza dell'ORF8;
- C) Maggiore similarità del dominio RBD della proteina S con il corrispettivo dei SARS-CoV, rispetto all'RBD degli altri Bat-SARS-like CoV.

Nell'indagine svolta da Falcón et al. [26] nella penisola iberica, sono stati identificati, utilizzando una metodica di RT-PCR che amplificava un frammento altamente conservato del gene RdRp, 14 coronavirus in 9 specie di pipistrelli appartenenti alla famiglia *Vespertilionidae*, su 26 specie di pipistrelli testate. I virus identificati appartenevano sia agli *Alpha-* che *Betacoronavirus* ma nessuno di essi era correlato al virus della SARS. Inoltre, nessun esemplare di *Rhinolophus* testato è risultato positivo, ma la dimensione campionaria piuttosto ridotta di questi pipistrelli potrebbe aver influito sul risultato.

In tre anni consecutivi, tra il 2008 ed il 2010, Drexler et al. [75] hanno inoltre testato la stessa colonia di *Myotis myotis*, stabilitasi nell'attico di una casa privata in Germania, per cercare e valutare l'andamento nel tempo di diversi virus ad RNA e DNA. In questa indagine è stato riscontrato un ceppo di *Alphacoronavirus* ed è stata notata una variazione nel tempo della concentrazione del virus nelle feci; in particolare sono stati rilevati due picchi corrispondenti ad una più intensa trasmissione e replicazione del virus, il primo al momento della ricostituzione della colonia prima delle nascite (con la formazione di una popolazione sensibile ad elevata densità e stretto contatto che favorisce alti tassi di infezione) ed il secondo dopo il parto e dopo il calo dell'immunità materna (con la formazione di una sotto-popolazione di nuovi nati ancora privi di immunità adattativa e quindi sensibili all'infezione).

Dagli studi svolti sino ad ora, si può ipotizzare che i coronavirus siano ampiamente diffusi nei pipistrelli europei e che i Bat-SARS-like CoV siano in stretta relazione con i pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus*, come già evidenziato in Asia [11, 17, 21, 85].

La sequenza completa del genoma del Bat-SARS-like CoV identificato in Bulgaria presenta alcune caratteristiche peculiari che permettono di distinguerlo dai ceppi asiatici ed africani; la totale assenza dell'ORF8 è una delezione inaspettata per un Bat-SARS-like CoV perché praticamente tutti i ceppi di SARS-related coronavirus identificati nei rinolofi sono caratterizzati da un singolo ORF8, con l'inserzione di una breve sequenza di 29 nucleotidi che unisce gli ORF8a e 8b presenti nei SARS-CoV umani. È stato ipotizzato che la delezione di 29 nt nell'ORF8 dell'Hu-SARS-CoV rappresenti una caratteristica funzionale dell'adattamento del SARS-CoV all'uomo [16, 87], l'assenza totale di questo ORF nei SARS-like CoV europei suggerisce però che l'intera proteina 8 potrebbe non essere essenziale al mantenimento del virus nei pipistrelli [13].

Questa peculiare delezione nel Bat-SARS-like CoV identificato in Bulgaria, insieme con l'elevata variabilità nucleotidica di alcuni geni e la similarità del dominio RBD con i SARS-CoV piuttosto che con i Bat-SARS-like CoV, suggerisce una possibile divergenza evolutiva tra i ceppi asiatici e quelli europei.

Considerando una possibile origine africana di questi virus [19], in pipistrelli diversi da quelli appartenenti al genere *Rhinolophus*, il loro arrivo in Europa potrebbe essere la conseguenza di un antecedente adattamento nei pipistrelli asiatici oppure, allo stesso tempo, la migrazione dei Bat-SARS-like CoV, potrebbe aver interessato prima l'Europa, attraversando l'area mediterranea, e poi l'Asia. Inoltre, un'altra ipotesi plausibile, potrebbe essere la diffusione in Asia ed Europa con due eventi indipendenti, anziché consecutivi, che avrebbero originato popolazioni virali distinte.

1.3. I Parvovirus dei Carnivori

Il virus della panleucopenia felina o parvovirus felino (FPV) ed il parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2), sono parvovirus autonomi appartenenti alla famiglia *Parvoviridae*, sottofamiglia *Parvovirinae* e genere *Parvovirus*. Nell'ambito del genere *Parvovirus* sono contemplati, nel cosiddetto sottogruppo del Parvovirus felino, tutti i parvovirus dei carnivori compresi, oltre ai già citati FPV (che ne è il capostipite) e CPV, anche il parvovirus del visone (MEV) ed il parvovirus del procione (RPV). Sono virus dotati di genoma lineare non segmentato a singolo filamento di DNA a polarità negativa (ssDNA-), con simmetria icosaedrica e privi di envelope [27, 92].

Il virus della panleucopenia felina (FPV) è un virus conosciuto da molto tempo ed infetta diverse specie animali appartenenti all'ordine dei carnivori, tra cui felidi selvatici e domestici, volpi, visoni e procioni, ma non il cane [29, 30]. Nel cane, l'infezione da FPV è limitata al timo ed al midollo osseo, senza avere diffusione sistemica e trasmissione da cane a cane [31].

Il parvovirus del cane di tipo 2 (CPV-2) è emerso alla fine degli anni '70 diffondendosi rapidamente in tutto il mondo. L'originale tipo 2, caratterizzato dalla capacità di infettare il cane ma non il gatto, è stato successivamente soppiantato dalle nuove varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c che hanno acquisito la capacità di dare malattia anche nel gatto. A livello mondiale, la distribuzione del CPV è attualmente caratterizzata da una stretta suddivisione geografica della popolazione virale con scarsi movimenti del virus tra i paesi; questo scenario corrisponde ad un comportamento endemico dell'infezione e contrasta con la rapida diffusione mondiale che si ebbe alla fine degli anni '70 nelle fasi iniziali dell'epidemia [48, 93].

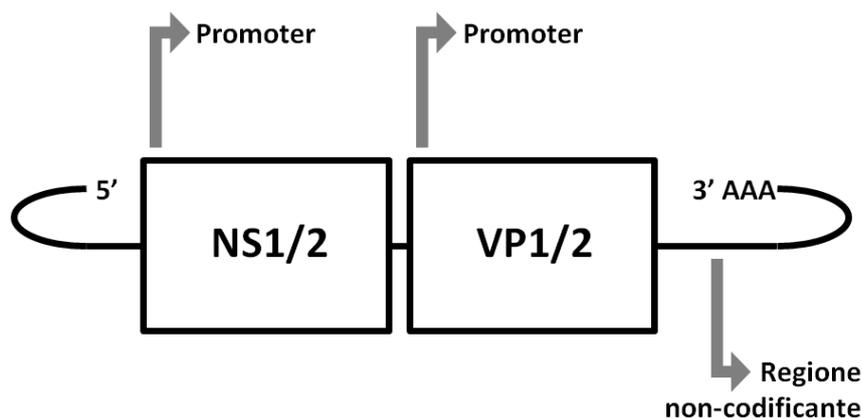
Il genoma dei parvovirus, di circa 5000 bp, ha una struttura molto semplice formata da due soli geni composti da alcuni ORF sovrapposti che codificano mediante splicing alternativo poche proteine strutturali e non [92].

Scorrendo il genoma in direzione 5'-3' si ritrovano: l'ORF REP o NS che codifica mediante splicing alternativo 2 proteine non-strutturali (NS1 e NS2), l'ORF CAP o S che codifica mediante splicing alternativo 2 proteine strutturali (VP1 e VP2), una regione non-codificante composta da sequenze ripetute e una coda di poli-A. Inoltre, sono presenti due promotori, rispettivamente all'inizio di ognuno dei due ORF, che innescano la trascrizione e traduzione delle proteine e, alle due estremità del genoma 5' e 3', sono presenti sequenze palindromiche ripiegate a formare delle tipiche strutture a forcina o Y, fondamentali per la replicazione e l'impacchettamento del genoma nel virione (**Figura 4**) [92].

Il capsido, del diametro di circa 25 nm, è composto in massima parte dalla proteina VP2 ed in minima parte dalla proteina VP1; nei virioni maturi (detti particelle "full" perché comprendenti il genoma, al contrario delle particelle "empty" prive del materiale genetico) è presente anche una proteina VP3 che si forma per clivaggio della VP2. In

particolare, la proteina strutturale VP2, codificata da un tratto del genoma con sequenza nucleotidica altamente variabile, è esposta sulla superficie del virione e svolge numerose funzioni fondamentali: permette il riconoscimento ed il legame con i recettori cellulari determinando il tropismo cellulare ed il range d'ospite, induce una risposta anticorpale neutralizzante ed è responsabile dell'attività emoagglutinante.

Figura 4: Rappresentazione schematica del genoma del FPV e del CPV



Le proteine non-strutturali, invece, svolgono diverse funzioni correlate all'espressione genetica e alla replicazione genomica. In particolare, la proteina NS1, si localizza nel nucleo delle cellule infette ed è fondamentale per: la replicazione del DNA, l'attivazione dei promotori ed il danneggiamento del DNA cellulare.

Il parvovirus replica sfruttando diversi componenti del complesso replicativo delle cellule infettate e, poiché non induce mitosi cellulare, l'infezione può avvenire solo in cellule in intensa attività replicativa (soprattutto intestino e midollo osseo, più raramente miocardio, cervello ed utero) ed in animali giovani dopo il calo dell'immunità materna, generalmente tra i 2 e i 4 mesi d'età [27].

L'infezione causa malattia ad elevata mortalità caratterizzata tipicamente per entrambi i virus da enterite emorragica con vomito e diarrea, leucopenia e danni neurologici; nei cani giovani si può inoltre avere miocardite e nelle gatte in gravidanza l'infezione all'utero può causare infertilità, aborto o nascita di gattini con danni neurologici o oculari [27, 94, 95].

L'infezione da parvovirus induce una risposta immunitaria protettiva prevalentemente umorale con anticorpi che neutralizzano efficacemente molti parvovirus [27]; sono presenti in commercio numerosi vaccini sia per la panleucopenia felina che per la parvovirosi del cane ma, soprattutto per quest'ultimo, la rapida evoluzione del virus pone dubbi sull'efficacia dei vaccini allestiti con le varianti più vecchie.

L'eliminazione avviene per circa 10 giorni post infezione, dopo i quali il virus risulta quasi completamente eliminato dall'ospite, e si dimostra estremamente stabile

nell'ambiente; la trasmissione avviene per via oro-fecale mediante contatto diretto e indiretto.

1.3.1. La proteina VP2 ed il tropismo d'ospite

Come detto in precedenza, la proteina VP2 (composta da 584 aminoacidi per un peso di circa 65 KDa) è il principale costituente del capside virale, infatti, delle 60 proteine che lo costituiscono, 54-55 sono VP2 e 5-6 sono VP1 [31]. Questa proteina, essendo esposta sulla superficie esterna del virus, svolge numerose funzioni fondamentali:

- a) riconoscimento e legame con i recettori cellulari;
- b) risposta immunitaria;
- c) attività emoagglutinante.

In particolare, le principali funzioni sono svolte da alcuni siti antigenici prominenti sulla struttura della proteina e, per questo motivo, sono soggetti a pressione selettiva nell'evoluzione del virus [31, 96]. Con l'utilizzo di anticorpi monoclonali, è stato possibile identificare sulla superficie della proteina VP2, a livello della struttura three-fold spike, i due principali siti antigenici neutralizzanti [97, 98]: il primo denominato A è formato dagli aminoacidi 93, 222, 224 e 426, mentre il secondo denominato B è formato dagli aminoacidi 299, 300, 301 e 302.

Il recettore cellulare utilizzato da FPV e CPV è il recettore per la transferrina (TfR) [96]. La proteina VP2 dell'FPV è in grado di legarsi al TfR del gatto ma non a quello del cane mentre la proteina VP2 dell'originale CPV-2 è in grado di legarsi al TfR del cane ma non a quello del gatto, permettendo così al primo di infettare il gatto ed al secondo di emergere come nuovo patogeno del cane [96].

Il range d'ospite del FPV è dovuto ai residui 80, 564 e 568 [99], mentre la capacità del CPV di infettare originariamente il cane ed in seguito anche il gatto è riconducibile soprattutto ai residui 93, 300 e 323[96]. La capacità dell'originale CPV-2 di legarsi al TfR canino è dovuta a due residui aminoacidici oggetto di mutazione rispetto al FPV: 93 (Lys-Asn) e 323 (Asp-Asn) [100, 101], mentre le nuove varianti del CPV-2 hanno acquisito la capacità di infettare l'ospite felino mediante la mutazione di due regioni della VP2 che sovrintendono al legame con il TfR del gatto e, in particolare, di tre residui aminoacidici: 87, 300 e 305 [31].

Altre regioni della proteina VP2 che manifestano una notevole importanza antigenica sono il residuo 426, poiché è l'unico aminoacido che differenzia le nuove varianti CPV-2b e CPV-2c, ed i due tratti altamente immunogeni compresi tra i residui 1-23 e 147-163.

1.3.2. Origine ed evoluzione del parvovirus felino

La panleucopenia felina è conosciuta dagli inizi del '900 [28] ed il suo agente eziologico (FPV), isolato già nel 1965 [102], dalla sua scoperta ad oggi non ha subito modificazioni

particolari all'interno di questo ospite. Lo stesso non si può dire per tutto il sottogruppo del parvovirus felino, di cui il FPV è il prototipo; infatti negli anni '40 e poi negli anni '70 si è avuta l'emergenza di nuovi virus, rispettivamente il parvovirus del visone (MEV) e del cane (CPV-2) [27], che con molta probabilità vedono nel virus del gatto il loro progenitore, da cui sarebbero originati come varianti d'ospite.

In particolare, il parvovirus canino di tipo 2, è un esempio di virus emergente che ha acquisito attraverso modificazioni genetiche la capacità di infettare un nuovo ospite, il cane [31]. Nel cane, il virus si è diffuso rapidamente per la totale mancanza di protezione immunitaria ed ha subito un'altrettanto rapida evoluzione che gli ha permesso di adattarsi al nuovo ospite [31].

Il CPV-2 è stato isolato dal cane per la prima volta nel 1978, associato ad una malattia ad elevata mortalità caratterizzata da enterite emorragica e leucopenia nei cani di età superiore ai sei mesi e miocardite nei neonati. Successive indagini sierologiche compiute in Europa hanno rilevato la presenza del CPV nei cani già dal 1976 [31, 103], ed analisi filogenetiche hanno datato l'origine del virus nei primi anni '70 [48], permettendo di collocare l'emergenza di questo nuovo virus agli inizi degli anni '70.

Diverse teorie sono state formulate per spiegare l'origine del parvovirus canino di tipo 2 e, tra queste, tre sono le più plausibili [104]:

- a) il CPV-2 è emerso direttamente dal FPV circolante nella popolazione di gatti o cani, come un mutante con diverso range d'ospite;
- b) il CPV-2 è emerso da un vaccino per FPV dopo propagazione in coltura tissutale ed inizialmente diffuso in tutto il mondo attraverso il vaccino stesso;
- c) il CPV-2 è emerso da un ospite animale diverso dal gatto e dal cane, probabilmente un carnivoro selvatico, che fungendo da serbatoio per il virus ancestrale ne ha permesso la progressiva acquisizione del tropismo per il cane.

La teoria più consolidata contempla l'origine del CPV-2 dal FPV, o da un virus FPV-like, infettante i carnivori selvatici, sottolineando il ruolo dell'ospite selvatico come reservoir nell'emergenza del nuovo virus. In questo reservoir selvatico il virus progenitore avrebbe acquisito le mutazioni necessarie per permettergli di ampliare il range d'ospite, infettando efficacemente il cane, ed effettuare così il salto di specie.

Questa teoria è avvalorata dall'identificazione di un ceppo di FPV con sequenza nucleotidica strettamente correlata al CPV in una volpe artica (*Alopex lagopus*) in Finlandia [30, 105] e dal parziale sequenziamento di un ceppo di parvovirus con caratteristiche intermedie tra il FPV ed il CPV identificato in una volpe rossa (*Vulpes vulpes*) in Germania [106].

Il percorso evolutivo del CPV-2 avrebbe richiesto un processo di mutazione consecutiva mediante la sostituzione parallela di almeno 2 o 3 residui aminoacidici chiave nella sequenza della proteina VP2 che gli hanno permesso di riconoscere e legare il recettore cellulare TfR canino [30, 107]. Un'ulteriore prova di questo percorso evolutivo è fornita dall'analisi filogenetica eseguita sulle sequenze ottenute da diversi ceppi appartenenti al sotto-gruppo del parvovirus felino che ha mostrato come tutti i ceppi di

CPV-2 derivino da un antenato comune e che i ceppi di parvovirus non-CPV aventi maggiore similitudine con essi siano stati isolati da volpi e gatti [30].

Il nuovo virus, una volta emerso nella popolazione canina, si è inizialmente diffuso rapidamente (circa un anno) in tutto il mondo seguendo una dinamica epidemica; mentre, la continua evoluzione che si è avuta successivamente, ha portato ad una progressiva localizzazione geografica delle nuove varianti e all'endemizzazione della malattia [48, 93, 108].

In seguito alla sua emergenza, il virus, ha proseguito il processo di adattamento all'ospite canino originando in tempi diversi tre nuove varianti che hanno inoltre ampliato il range d'ospite acquisendo, a differenza dell'originale CPV-2, la capacità di infettare e dare malattia anche al gatto.

Tra il 1979 ed il 1980 è apparsa la nuova variante CPV-2a che, pur differendo dall'originale CPV-2 per soli 5-6 aminoacidi, presenta due diversi siti antigenici neutralizzanti sulla superficie del capsido che gli hanno consentito di dare malattia anche nell'ospite felino [109]. Successivamente, nel 1984 e poi nel 2000, sono apparse ulteriori due nuove varianti, rispettivamente la CPV-2b e la CPV-2c, che si differenziano per una sola sostituzione aminoacidica a livello del residuo 426 della proteina del capsido VP2 [109, 110]; in particolare la variante CPV-2b presenta la mutazione Asp-426 e la variante CPV-2c presenta la mutazione Glu-426.

Nonostante l'elevata diversità fenotipica esistente tra il parvovirus del gatto e quello del cane, la sequenza genomica dei CPV è simile per più del 99 % a quella dei FPV [96]. Infatti, dal confronto tra tutte le sequenze genomiche complete ottenute fino ad ora, è possibile evidenziare come le sequenze di FPV si differenzino da quelle di CPV-2 per un totale di 16 mutazioni, di cui 11 localizzate nella regione del genoma che codifica per le proteine del capsido. Inoltre, anche le nuove varianti del parvovirus canino si differenziano poco dal CPV-2, con le sequenze di CPV-2a che mostrano un totale di solo 7 mutazioni rispetto al tipo originale e, di queste, 5 sono localizzate nella regione del genoma che codifica per le proteine del capsido [27, 48]. La maggior parte delle sostituzioni che permettono di distinguere il CPV dal FPV sono quindi localizzate nel gene che codifica per le proteine VP1 e VP2.

Diversi studi riportano che il rapporto tra il numero di differenze non-sinonime e le differenze sinonime rilevate per l'ORF CAP presenta valori notevolmente alti indicando che numerosi residui aminoacidici di questa regione sono soggetti a selezione positiva, determinando un elevato tasso di evoluzione molecolare [30, 48]. Inoltre, questi residui aminoacidici soggetti a selezione positiva non sono distribuiti casualmente lungo la sequenza del gene, ma sono concentrati sulla superficie interna o esterna della proteina VP2. Probabilmente, questa distribuzione non casuale, si ha perché le regioni soggette a selezione positiva sono meno vincolate strutturalmente nel subire cambiamenti o perché sono regioni che svolgono importanti funzioni virali (meccanismo d'infezione, legame al recettore, funzione antigenica) e per questo subiscono una selezione funzionale, cioè vengono selezionate quelle mutazioni vantaggiose, che determinano un miglior adattamento del virus nell'ospite [30, 48].

Il parvovirus è quindi soggetto a frequenti mutazioni che non si distribuiscono lungo tutto il genoma ma che si concentrano particolarmente in regioni, soprattutto del gene che codifica per le proteine del capsido, che influenzano il tropismo cellulare e la risposta immunitaria

In generale, i virus a DNA tendono ad avere un tasso di errore di replicazione e quindi di mutazione simile a quello del DNA cellulare e cioè tra 10^{-8} e 10^{-9} , però il tasso di mutazione tende ad aumentare in funzione della diminuzione della dimensione del genoma e quindi i virus che hanno un genoma molto breve mostrano tassi di mutazione maggiori [30]. I parvovirus, tendono ad avere un comportamento particolare che li porta ad avere un tasso di mutazione più elevato in quanto la replicazione del virus è caratterizzata da una bassa fedeltà di duplicazione del genoma, dovuta probabilmente a diversi fattori [27]:

- a) Assente o scarso coinvolgimento di alcune componenti del complesso della DNA polimerasi della cellula ospite;
- b) Rapida replicazione;
- c) Genoma composto da un singolo filamento di piccole dimensioni.

Tra i parvovirus felini inoltre, CPV evolve più rapidamente di FPV. I tassi di mutazione del primo si presentano infatti più elevati del secondo, rispettivamente con una media di sostituzioni per sito per anno di 2×10^{-4} e di 8×10^{-5} , circa 10 volte inferiore al tasso di mutazione dei virus a RNA (10^{-3} - 10^{-5}) ma molte volte superiore alla maggior parte degli altri virus a DNA (10^{-8} - 10^{-9}) [27, 30, 48]. In particolare, per la regione del genoma che codifica le proteine del capsido, è stato stimato un tasso di mutazione prossimo a quelli osservati per virus ad RNA in rapida evoluzione [111].

L'elevata variabilità manifestata da questi virus ha consolidato l'ipotesi che i parvovirus replicano all'interno dell'ospite seguendo una dinamica di quasispecie [42], con la generazione di una popolazione di mutanti diversi che ne incrementa le capacità evolutive.

Le sequenze di FPV ottenute negli ultimi decenni presentano un elevato grado di similarità, a differenza di quanto mostrato dalle sequenze di CPV; in particolare, i tassi di mutazione calcolati per il gene NS1 di FPV e CPV, nonché per il gene VP2 di FPV, sono relativamente bassi e comparabili mentre, il tasso di mutazione, è elevato per il gene VP2 di CPV [48].

Studi recenti hanno inoltre formulato l'ipotesi che altri ospiti animali possano aver influenzato l'evoluzione del CPV e quindi la sua emergenza. A tal proposito è stato identificata una variante d'ospite del CPV che, circolando nel procione (*Procyon lotor*) da più di venti anni, si sarebbe trasmessa più volte dal e al cane [49]. Molti dei ceppi di parvovirus identificati nel procione possiedono caratteristiche intermedie tra il CPV-2 e la variante CPV-2a ed una struttura peculiare delle proteine capsidiche (come il profilo antigenico e le ridotte capacità di legarsi al TfR) che suggeriscono un possibile ruolo di quest'ospite nell'emergenza della nuova variante. [49].

1.3.3. Le coinfezioni virali in corso di parvovirosi e la ricombinazione genetica

Fenomeni di coinfezione tra parvovirus geneticamente diversi, tra specie o varianti o ceppi diversi, sono possibili sia nel gatto che nel cane. Diversi studi hanno dimostrato l'instaurarsi di coinfezioni e, tra questi, il primo ritrovamento è stato effettuato da Url et al. [112] che, analizzando sequenze virali di DNA amplificato da cervelli di gatto, scoprirono la contemporanea presenza di CPV-2 e FPV in alcuni animali. Sono state avanzate due ipotesi per spiegare il ritrovamento del genoma di entrambi i virus nello stesso ospite. La prima possibilità prevedeva che alla base della coinfezione ci fosse l'instaurarsi di un'infezione persistente da FPV (anche se al tempo dello studio non c'erano evidenze di infezioni persistenti da parvovirus) su cui si sarebbe verificata una superinfezione da CPV-2. La seconda possibilità, invece, prevedeva che il ritrovamento fosse il risultato di una contaminazione incorsa durante le prove di laboratorio, in considerazione del fatto che l'originario tipo antigenico CPV-2, oltre a non aver mai infettato il gatto, attualmente non è presente in natura e non circola più nella popolazione canina, bensì è utilizzato per l'allestimento di vaccini vivi attenuati.

Coinfezioni da più specie o varianti di parvovirus sono state segnalate sia nel cane che nel gatto. Nel 2007 Battilani et al. [113] analizzarono il genoma di due ceppi di parvovirus isolati da un cane e da un gatto che mostravano sintomi riferibili a parvovirosi, dimostrando per la prima volta che entrambi gli animali erano infettati contemporaneamente con due diverse varianti di parvovirus, CPV-2a e 2c. Tali coinfezioni erano caratterizzate da un'elevata variabilità genetica e in particolare, nel campione felino, furono identificate 10 popolazioni virali che differivano per numerose sostituzioni sinonime e non-sinonime, situate soprattutto nei primi 750 nucleotidi del gene VP2 [33].

Gli autori hanno ipotizzato che l'ospite fosse stato infettato contemporaneamente da più varianti e che l'infezione mista avrebbe favorito l'alto tasso di mutazioni e l'elevata crescita della popolazione virale. Anche in questo caso, come già suggerito da Url et al. [112], potrebbe essersi instaurata un'infezione persistente favorente la variabilità genetica dei virus. Inoltre, è stata avanzata l'ipotesi che la nuova variante CPV-2c possa favorire l'insorgenza di infezioni multiple.

Anche Hoelzer et al. nel 2008 [34] hanno segnalato due casi di coinfezione, una nel gatto ed una nel cane, con presenza di più varianti di FPV e CPV-2b.

La presenza di due virus diversi nello stesso ospite predispone ad eventi di ricombinazione ed il parvovirus, originando frequentemente coinfezioni, manifesta una certa propensione a subire ricombinazione [114]. Fino a pochi anni fa, però, si pensava che i parvovirus dei carnivori non fossero soggetti a ricombinazione in quanto non erano mai state rilevate evidenze che tali fenomeni fossero avvenuti [48].

Al contrario, Ohshima e Mochizuki [35, 36], hanno recentemente riscontrato eventi di ricombinazione sia nel cane, tra ceppo vaccinale CPV-2 e ceppi selvaggi CPV-2a/2b, che nel gatto, tra ceppi selvaggi di FPV e CPV-2b. La rarità di questi eventi potrebbe essere legata alla rapidità con cui il virus compie il suo ciclo nell'ospite, riducendo il tempo

disponibile all'instaurarsi di sovrainfezioni; fenomeni di persistenza potrebbero quindi favorire l'insorgenza di coinfezioni e conseguentemente anche di ricombinazioni.

1.3.4. Ruolo del gatto nell'epidemiologia del parvovirus canino

Diversi studi hanno dimostrato che le nuove varianti del parvovirus canino di tipo 2 sono in grado di causare nel gatto una sintomatologia simile alla panleucopenia felina determinata da FPV [33, 115-118], rendendo quindi impossibile distinguere sulla base delle manifestazioni cliniche i gatti affetti da FPV da quelli affetti da CPV-2a/2b/2c.

Recentemente, un'indagine svolta nel Regno Unito [32], ha inoltre riscontrato l'eliminazione protratta nel tempo delle varianti CPV-2a e CPV-2b in gatti asintomatici, dimostrando che questi virus possono instaurare una condizione di persistenza senza provocare malattia nell'ospite felino. L'instaurarsi nei gatti infetti da CPV di una sintomatologia clinica più lieve era già stata riscontrata anche in un precedente studio sperimentale [119], suggerendo quindi che in certe condizioni questo virus potrebbe non manifestare tutto il suo potenziale patogenetico.

Questi ritrovamenti accrescono l'importanza del gatto come possibile serbatoio per i parvovirus dei carnivori. Inoltre, poiché il gatto rappresenta un nuovo ospite per il CPV, questo salto di specie potrebbe portare ad una nuova fase evolutiva del virus che, adattandosi e mutando nel nuovo ospite, potrebbe esitare nell'origine di nuove varianti virali potenzialmente trasmissibili al cane, o ad altre specie animali, con effetti imprevedibili.

2. Obiettivi dello Studio

Allo scopo di approfondire le conoscenze riguardanti le dinamiche evolutive correlate all'ampliamento dello spettro d'ospite caratterizzanti i virus a RNA e a DNA, sono state eseguite due indagini, rispettivamente sui coronavirus infettanti i pipistrelli e sui parvovirus infettanti i gatti.

Lo studio eseguito sull'infezione da coronavirus nei pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* in Italia aveva gli obiettivi di:

- 1) Rilevare la presenza di infezione da coronavirus nei pipistrelli in Italia;
- 2) Sviluppare una metodica di real-time PCR ad elevata sensibilità per rilevare l'infezione da SARS-related CoV, da applicare come strumento di screening e per stimare la prevalenza dell'infezione nei pipistrelli italiani;
- 3) Valutare il grado di correlazione genetica esistente tra i ceppi identificati ed i coronavirus dei pipistrelli europei e del mondo, nonché con l'agente eziologico della SARS, per approfondire l'origine evolutiva dei Bat-SARS-like CoV europei, gli eventi migratori che hanno caratterizzato la loro diffusione nel continente e le potenziali ripercussioni sulla salute pubblica.

Lo studio eseguito sulle infezioni da parvovirus nel gatto aveva gli obiettivi di approfondire le dinamiche evolutive dei parvovirus valutando la complessità genetica dei virus identificati.

SEZIONE I - Virus a RNA

Indagine sull'infezione da coronavirus nei pipistrelli appartenenti
alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* in Italia

I.1. Introduzione

I Chiroteri sono tra tutti i mammiferi uno degli ordini che riveste maggiore importanza nell'emergenza e diffusione dei virus. A causa della diffusione geografica mondiale e della notevole diversità di specie, i pipistrelli ospitano virus ad elevata variabilità che possono avere maggiori potenzialità di acquisire la capacità di infettare altri animali, compreso l'uomo. Infatti, negli anni passati, diversi virus infettanti gli uomini sono stati identificati anche nei pipistrelli: *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae* ed altri [51]. Con alcune eccezioni, la trasmissione diretta di virus dai pipistrelli all'uomo è un evento raro; più frequentemente i pipistrelli svolgono un ruolo di serbatoio di virus ancestrali che attraverso un salto di specie passano ad un secondo ospite animale, nel quale acquisiscono tropismo per l'uomo.

Recentemente, diversi cambiamenti antropogenetici e naturali avvenuti nell'ambiente, causati dalla deforestazione, dall'alterazione degli habitat naturali, dagli eventi climatici e dall'alterazione della diversità animale, hanno modificato l'ecologia dei pipistrelli esponendo l'uomo a nuovi patogeni [10]. A dimostrazione di questo, negli ultimi venti anni, è aumentato il numero di epidemie causate da patogeni che presentano i pipistrelli come reservoir di infezione [51].

Tra le epidemie virali emerse negli ultimi dieci anni che hanno interessato l'uomo, una delle più importanti è stata causata dalla sindrome respiratoria acuta severa, meglio conosciuta con l'acronimo SARS, che emergendo in Cina nel 2002-2003 ha coinvolto rapidamente diverse aree mondiali. In due eventi consecutivi, il principale evento epidemico del 2002-2003 ed una serie di infezioni sporadiche insorte nell'inverno del 2003-2004, la SARS ha causato più di 8.000 infezioni umane con circa 700 decessi (64-66).

Diversi studi hanno dimostrato che l'agente eziologico della SARS è un coronavirus, il SARS-CoV [60-63]. Successivamente, è stato riportato che i pipistrelli sono i serbatoi naturali di diversi virus strettamente correlati geneticamente al SARS-CoV, i SARS-like coronaviruses (SARS-like CoV), ed è stato ipotizzato che tutti i coronavirus dei mammiferi originarono da virus ancestrali infettanti i pipistrelli [11, 12].

L'associazione tra pipistrelli e coronavirus è un fenomeno diffuso a livello mondiale, in fatti, dopo l'iniziale ritrovamento in Cina di questi virus nei pipistrelli [9, 16], studi successivi hanno confermato la loro presenza in altri paesi asiatici, in Nord e Sud America, in Europa, in Africa e in Australia [13, 14, 18-20, 22, 26, 54, 72-81, 120].

Poche indagini sono state condotte fino ad ora sull'infezione da coronavirus nei pipistrelli dell'area europea ed inoltre, la maggior parte di esse, è stata svolta nell'Europa centro-orientale tralasciando, ad eccezione di uno studio condotto in Spagna [26], gran parte dell'area mediterranea. Alla luce di una possibile origine africana dei SARS-like CoV [19], l'area mediterranea potrebbe svolgere un ruolo importante nella diffusione di

questi virus all'Europa e studi più approfonditi sarebbero necessari per approfondire le conoscenze al riguardo.

In questa sezione viene presentata un'indagine sulla presenza di coronavirus nella popolazione italiana di *Rhinolophus ferrumequinum*, una delle specie di pipistrelli che è stata maggiormente indicata come serbatoio dei SARS-like CoV, con l'obiettivo di indagare l'eventuale presenza del virus in Italia, di quantificarne la prevalenza e di valutare le correlazioni genetiche esistenti tra i virus italiani ed i coronavirus dei pipistrelli già identificati in Europa e nel resto del mondo. A tale scopo ci si è avvalsi della collaborazione della Dott.ssa Alessandra Palladini della facoltà di Scienze Biologiche dell'Università di Pavia che, nell'ambito di un progetto di dottorato sulla conservazione di questa specie di Chiroterri, ha raccolto campioni fecali di pipistrello in diverse aree distribuite nel territorio italiano nel periodo compreso tra Luglio e Novembre 2009.

Nella prima parte dello studio è stata svolta una indagine preliminare atta a rilevare la presenza di coronavirus su campioni fecali appartenenti a cinquantadue *R. ferrumequinum*. L'utilizzo di una metodica di reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), amplificante un tratto altamente conservato del genoma dei coronavirus, ha permesso di individuare 2 positività ed il sequenziamento di un tratto del genoma ha permesso di correlare filogeneticamente uno dei due campioni ai SARS-related CoV (**PUBBLICAZIONE 1**).

La tecnica di RT-PCR utilizzata in questa indagine, amplificante un frammento altamente conservato del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp, la 12° proteina non-strutturale codificata dall'ORF1a,b), è la metodica più utilizzata in letteratura per la diagnosi molecolare dei coronavirus nei pipistrelli, soprattutto nella fase iniziale di screening della popolazione campionata [15-17, 20, 23-25, 70, 71, 74, 78, 80, 81, 121, 122]. Questa metodica può però non avere una sensibilità ottimale, causando una sottostima della reale prevalenza d'infezione, dovuta ad una bassa quantità di virus eliminata con le feci che, in una certa percentuale di campioni, potrebbe essere troppo bassa da rilevare con tradizionali metodiche di PCR.

Per questo motivo, nella seconda parte dello studio, è stata messa a punto una metodica di real-time PCR per rilevare l'infezione da SARS-related CoV da applicare come strumento di screening per la ricerca del virus nelle feci di pipistrello in studi di sorveglianza epidemiologica.

La real-time PCR è una metodica quantitativa caratterizzata dall'aver un limite di detection significativamente basso in comparazione con la PCR convenzionale, permettendo di incrementare la sensibilità del test diagnostico. Ad oggi però, nonostante l'elevata sensibilità, solo pochi autori hanno utilizzato la real-time PCR per studi di sorveglianza epidemiologica [13, 16, 75, 81]. Inoltre, questi autori, hanno utilizzato primer molto specifici disegnati sulle sequenze virali identificate mediante PCR tradizionale nella stessa colonia o area geografica oggetto dello studio. Così facendo, le metodiche di real-time PCR utilizzate fino ad ora sono altamente specifiche per i ceppi virali per cui i primer sono stati disegnati ma, in considerazione della notevole variabilità

genetica dei coronavirus, non è certo che siano in grado di rilevare tutti i coronavirus presenti nelle aree già indagate e, a maggior ragione, in aree distanti.

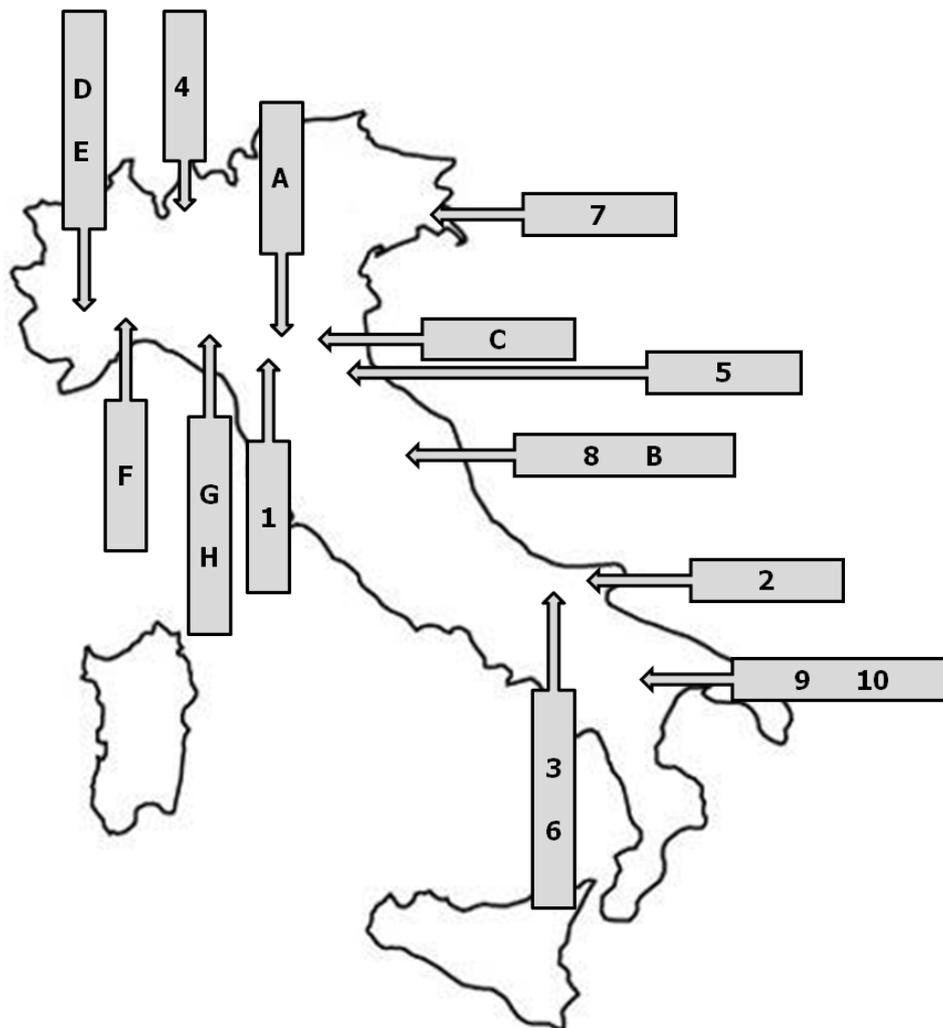
A questo scopo, una metodica di SYBR Green real-time PCR amplificante un frammento altamente conservato del gene RdRp per la diagnosi generica di coronavirus è stata modificata per aumentarne la specificità nei confronti dei SARS-related CoV. La metodica sviluppata è stata successivamente applicata alla ricerca di SARS-like CoV da materiale fecale di 45 *R. ferrumequinum*, ottenendo una prevalenza d'infezione da coronavirus del 42% (**PUBBLICAZIONE 2**).

Infine, nella terza parte dello studio, è stato intrapreso il sequenziamento di ampie porzioni del genoma di alcuni dei ceppi identificati nelle indagini precedenti e, sulle sequenze ottenute, è stata eseguita un'accurata analisi bioinformatica allo scopo di valutare le correlazioni con gli altri ceppi di SARS-like CoV già identificati in Europa e nel resto del mondo. Dall'indagine eseguita è emersa la presenza di diversi ceppi di SARS-like coronavirus geneticamente distinti nella popolazione italiana di *R. ferrumequinum* e la presenza di una coinfezione caratterizzata dalla contemporanea presenza di un *Alphacoronavirus* ed un SARS-like CoV nello stesso soggetto. Le caratteristiche molecolari distintive dei Bat-SARS-like coronavirus identificati, suggeriscono una possibile origine comune di tutti i ceppi europei ed una divergenza evolutiva con i ceppi presenti nel resto del mondo.

I.2. Materiali e Metodi

Le indagini svolte sui coronavirus infettanti i pipistrelli comprendono: 1) la ricerca di coronavirus in pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* nel territorio italiano mediante metodica di RT-PCR (**PUBBLICAZIONE 1**); 2) la messa a punto di una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per i SARS-related coronavirus e sua applicazione nello screening di infezione in pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* nel territorio italiano (**PUBBLICAZIONE 2**); 3) il sequenziamento di ampie porzioni del genoma dei coronavirus identificati con le precedenti metodiche di laboratorio e la successiva analisi bioinformatica.

Figura 5: Siti di campionamento dei *Rhinolophus ferrumequinum* in Italia.



Per le corrispondenze di lettere e numeri con le posizioni geografiche vedere l'Appendice 1.

I.2.1. Campionamento

Novantasette pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum* (nome comune Rinolofo maggiore o Ferro di cavallo maggiore) sono stati catturati e campionati singolarmente in diversi ricoveri (grotte, miniere e case abbandonate) distribuiti nel territorio italiano, in un periodo di 5 mesi compreso tra Luglio e Novembre 2009 (**Appendice 1 e Figura 5**).

Tutte le catture sono state autorizzate dal Ministero Italiano dell'Ambiente e facevano parte di un progetto di dottorato sulla conservazione del *Rhinolophus ferrumequinum*.

I pipistrelli sono stati catturati mediante l'utilizzo di reti di cattura posizionate all'ingresso dei ricoveri e prima dell'inizio delle manipolazioni sono stati posti singolarmente in borse di cotone per tranquillizzarli e ridurre lo stress. Durante il successivo campionamento sono stati anche presi dati che ne permettessero una corretta identificazione quali: riconoscimento morfologico della specie, sesso, categoria d'età (giovane, adulto), lunghezza dell'avambraccio e peso. Al termine della manipolazione i pipistrelli sono stati rilasciati nel sito di cattura.

Da ogni animale è stato prelevato un bolo fecale o un tampone rettale, quest'ultimo è stato effettuato solo nel caso in cui il pipistrello non defecasse spontaneamente all'interno della borsa di cotone. Per favorire la conservazione dell'RNA durante il trasporto, il campione è stato immerso in 2 ml di RNA later stabilization reagent (QIAGEN, Hilden, Germany). In seguito i campioni sono stati conservati a -80 °C.

Nella prima parte dello studio, per effettuare una indagine preliminare sulla presenza di coronavirus mediante RT-PCR, sono stati testati 52 campioni (41 boli fecali e 11 tamponi rettali) mentre, nella seconda parte, sono stati testati i restanti 45 campioni (tutti boli fecali) mediante real-time PCR.

I.2.2. Estrazione dell'RNA virale

I 97 campioni, feci o tamponi rettali, sono stati stemperati in 200 µl di phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ± 0.2 .

L'RNA virale è stato estratto da 52 campioni, 41 boli fecali e 11 tamponi rettali, utilizzando l'RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. Il protocollo di estrazione è iniziato utilizzando 50 µl della sospensione in PBS (**Appendice 1**).

L'RNA virale è stato estratto da 45 campioni di feci utilizzando il QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. Il protocollo di estrazione è iniziato utilizzando 140 µl della sospensione in PBS (**Appendice 1**).

L'RNA estratto è stato conservato a -80 °C.

I.2.3. Ricerca di coronavirus nei campioni fecali di pipistrello mediante RT-PCR

I.2.3.1. *Reverse transcription-PCR (RT-PCR)*. Lo screening di 52 campioni (**Appendice 1**) è stato eseguito mediante reverse transcription-PCR (RT-PCR) utilizzando una coppia di primer, IN-6 - IN-7 (**Appendice 2**), specifici per un frammento altamente conservato del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp, la 12° proteina non-strutturale codificata dall'ORF1a,b), un tratto altamente conservato del genoma dei coronavirus, frequentemente utilizzato per la ricerca dei coronavirus nei pipistrelli e per le successive analisi filogenetiche [15-17, 20, 23-25, 70, 71, 74, 78, 80, 81, 121, 122].

La RT-PCR è stata messa a punto utilizzando la TITANIUM One-Step RT-PCR Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA), usando un ceppo di coronavirus felino FCoV presente nella ceppoteca del Laboratorio di Virologia (*Alphacoronavirus*, ceppo 420/02, cDNA ottenuto da RNA estratto da linfonodo, [123]) come controllo positivo di reazione. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 3**. Durante l'esecuzione della reazione sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitare la contaminazione della RT-PCR ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Tabella 3: Mix e ciclo di reazione, primer IN-6 – IN-7.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in µl	Concentrazione finale
10X One-Step Buffer	10X	5	1X
50X dNTP Mix	50X (10 mM ognuno)	1	1X (0,2 mM ognuno)
Recombinant RNase Inhibitor	40 unit/µl	0,5	0,4 unit/µl
Thermostabilizing Reagent	2X	25	1X
GC-Melt	5X	10	1X
Primer IN-6	50 µM	1	1 µM
Primer IN-7	50 µM	1	1 µM
50X TITANIUM <i>Taq</i> RT Enzyme Mix	50X	1	1X
RNase-free H ₂ O		0,5	
Campione (RNA estratto)		5	
Totale		50	
Ciclo di reazione			
Fasi del ciclo	Temperature e tempi		
Retrotrascrizione	50 °C x 60 min		
Inattivazione Retrotrascrittasi	94 °C x 5 min		
Denaturazione	94 °C x 1 min		
Annealing	48 °C x 1 min		
Estensione	68 °C x 1 min		
Estensione finale	68 °C x 10 min		

Per verificare la presenza del frammento delle dimensioni attese, i prodotti della reazione (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA).

I.2.3.2. Purificazione dei prodotti di PCR e Sequenziamento. I prodotti di amplificazione dei campioni risultati positivi sono stati purificati utilizzando l'High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) seguendo le istruzioni del produttore.

La sequenza nucleotidica dei prodotti di PCR purificati è stata ottenuta, sia con il primer forward che reverse, utilizzando il sequenziatore ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

I.2.3.3. Analisi di sequenza. Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando l'interfaccia web di BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed allineate con 48 sequenze di referenza di coronavirus umani ed animali disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) utilizzando il software ClustalW implementato in BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.5.

Le relazioni filogenetiche delle sequenze nucleotidiche ottenute, insieme con 48 sequenze di referenza di coronavirus, sono state elaborate utilizzando il software MEGA versione 4.0; la distanza genetica è stata calcolata mediante il modello Tamura 3-parameter e l'albero filogenetico costruito utilizzando il metodo neighbour-joining. I valori di bootstrap sono stati determinati mediante 1.000 ripetizioni dell'analisi per valutare il livello di confidenza di ogni ramo del modello ottenuto.

I.2.4. Messa a punto e validazione di una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per SARS-related coronavirus e sua applicazione nello screening di campioni fecali di pipistrello

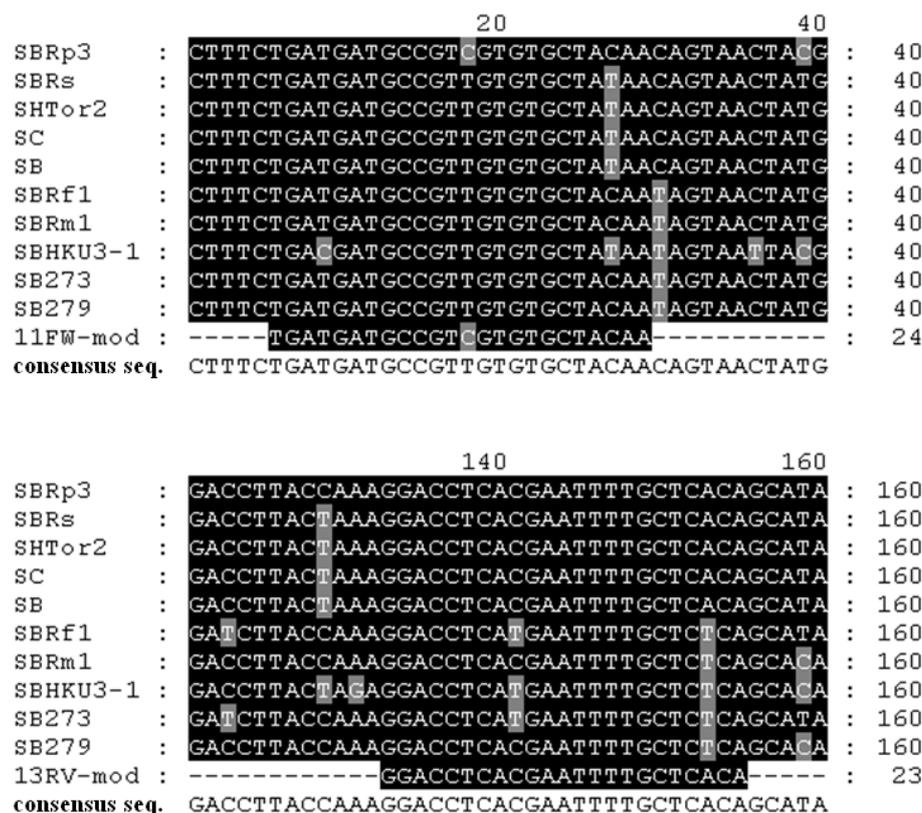
I.2.4.1. Retrotrascrizione (RT) degli RNA estratti. La sintesi del cDNA dagli estratti di 45 campioni fecali (**Appendice 1**) è stata ottenuta mediante random hexamers utilizzando l'ImProm-II reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) seguendo le istruzioni del produttore. Il cDNA è stato conservato a -20 °C.

I.2.4.2. Disegno dei primer per la reazione di real-time PCR. I primer forward e reverse sono stati disegnati modificando la sequenza di una coppia di primer degenerati, 11-FW e 13-RV, già pubblicati da Escutenaire et al. [124] e che amplificano un frammento del gene RdRp.

La sequenza dei due primer è stata modificata sulla base di un allineamento di 10 sequenze di referenza di SARS-related coronavirus disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) allo scopo di aumentare la specificità dei primer nei confronti dei Bat-SARS-like CoV (**Figura 6**). Le sequenze di referenza sono state allineate usando il software ClustalW implementato in BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.5.

La coppia di primer modificati, 11-FW modified e 13-RV modified, amplificavano un frammento di 168 bp (**Appendice 2**).

Figura 6: Allineamento multiplo di sequenze di SARS-related CoV per il disegno dei primer da utilizzare in real-time PCR.



Allineamento di 10 ceppi di referenza appartenenti ai SARS-related coronavirus: SBRp3 (Bat SARS CoV Rp3/2004, DQ071615, identificato in *Rhinolophus pearsoni*), SBRs (SARS coronavirus Rs 672/2006, FJ588686, identificato in *Rhinolophus sinicus*), SHTor2 (SARS coronavirus Tor2, AY274119, identificato nell'uomo), SC (Civet SARS CoV SZ16/2003, AY304488, identificato in *Paguma larvata*), SB (SARS coronavirus CFB/SZ/94/03, AY545919, identificato in *Melogale moschata*), SBRf1 (Bat SARS CoV Rf1/2004, DQ412042, identificato in *Rhinolophus ferrumequinum*), SBRm1 (Bat SARS CoV Rm1/2004, DQ412043, identificato in *Rhinolophus macrotis*), SBHKU3-1 (Bat coronavirus HKU3, DQ022305, identificato in *Rhinolophus sinicus*), SB273 (Bat CoV 273/2005, DQ648856, identificato in *Rhinolophus ferrumequinum*), SB279 (Bat CoV 279/2005, DQ648857, identificato in *Rhinolophus macrotis*).

I.2.4.3. Allestimento della curva standard di reazione. Per costruire la curva standard della reazione di real-time PCR è stato prodotto un vettore plasmidico pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenente una copia della sequenza target del gene RdRp.

Il frammento di DNA da inserire come sequenza target nel vettore plasmidico è stato ottenuto amplificando il cDNA ottenuto dal campione 893/09-11 già risultato positivo in RT-PCR. A tale scopo, il cDNA è stato amplificato mediante PCR convenzionale utilizzando la *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) ed i primer 11-FW modified e 13-RV modified. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 4**.

Tabella 4: Mix e ciclo di reazione, primer 11-FWmodified - 13-RVmodified, per standard di reazione.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in µl	Concentrazione finale
QIAGEN PCR Buffer	10X	5	1X
Q-Solution	5X	10	1X
dNTP	10 mM ognuno	1	0,2 mM
Primer 11-FW modified	20 µM	1	0,4 µM
Primer 13-RV modified	20 µM	1	0,4 µM
Taq DNA Polymerase	5 unit/µl	0,25	0,025 unit/µl
H ₂ O distillata autoclavata		26,75	
Campione (cDNA)		5	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 5 min
Denaturazione	94 °C x 40 sec
Annealing	50 °C x 40 sec
Estensione	72 °C x 40 sec
Estensione finale per ottenere una coda di poli-A finale	72 °C x 30 min

Il prodotto della reazione è stato purificato utilizzando l'High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), seguendo le istruzioni del produttore, ed è stato clonato utilizzando il vettore plasmidico pCR4 mediante il TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il plasmide ricombinante ottenuto è stato purificato mediante il PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo le istruzioni del produttore e la purezza del prodotto è stata valutata mediante spettrofotometro sulla base del rapporto 260/280 nm.

Allo scopo di simulare l'efficienza di amplificazione dell'RNA virale retroscritto e per evitare la presenza di DNA plasmidico superavvolto, il plasmide è stato linearizzato al di sopra dell'inserito usando l'endonucleasi di restrizione Spe I (Fermentas, Burlington,

Ontario, Canada). Il plasmide linearizzato è stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% in standard TAE buffer e quantificato con l'utilizzo del Quick-Load 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Il numero di copie (CN) dello standard plasmidico è stato calcolato usando l'equazione descritta dall'US Environmental Protection Agency protocol [125].

I.2.4.4. SYBR Green real-time PCR. La real-time PCR è stata eseguita usando il SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA Bio inc., Shiga, Japan) ed il Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). Il segnale fluorescente è stato acquisito sul canale FAM con la lettura della fluorescenza alla fine di ogni fase di estensione. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 5**.

I campioni sono stati considerati positivi se la curva di fluorescenza registrata durante la reazione mostrava un incremento esponenziale e se la curva di melting era caratterizzata da un picco specifico.

Tabella 5: Mix e ciclo di reazione, primer 11-FWmodified - 13-RVmodified, SYBR Green real-time PCR.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in µl	Concentrazione finale
SYBR Premix Ex Taq II	2X	12,5	1X
Primer 11-FW modified	10 µM	1	0,4 µM
Primer 13-RV modified	10 µM	1	0,4 µM
H ₂ O distillata autoclavata		8,5	
Campione (cDNA)		2	
Totale		25	
Ciclo di reazione			
Fasi del ciclo	Temperature e tempi		
Attivazione hot-start DNA polimerasi	95 °C x 30 sec		
Denaturazione	95 °C x 10 sec		
Annealing	55 °C x 20 sec		
Estensione	72 °C x 20 sec		
nel Ciclo di Melting la temperatura è incrementata di 1 °C da 72 °C a 95 °C			

I.2.4.5. Curva standard e limite di detection (LOD). La curva standard della reazione di real-time PCR è stata generata utilizzando diluizioni seriali in base 10 del plasmide ricombinante a concentrazione nota ottenuto precedentemente. Tali diluizioni (da 1×10^8 a 1×10^{-1} copie/µl) sono state testate in triplicato ed utilizzate come standard di quantificazione per costruire la curva che graficamente origina tra il numero di copie del plasmide ed il valore del ciclo soglia (Ct) corrispondente. La soglia di fluorescenza è stata

determinata usando la funzione Autofind Threshold del Rotor-Gene 3000 che scansiona il range dei livelli soglia ottenendo la curva standard più attendibile per i campioni che sono stati definiti come “standard”. Il limite di detection (LOD) della reazione è stato determinato basandosi sulla più alta diluizione del plasmide che era possibile amplificare (originando un segnale fluorescente) con una buona riproducibilità.

Per verificare la specificità della reazione, sono state fatte sia l’analisi della curva di melting che l’elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti della reazione di SYBR Green real-time PCR. Cinque microlitri di ogni amplicone sono stati caricati su gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio in TAE all’1% e visualizzati con luce ultravioletta (UV). Il marker MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) è stato usato per verificare le dimensioni degli amplificati.

1.2.4.6. Sensibilità e specificità della reazione. La sensibilità e l’efficienza della real-time PCR sono rispecchiate dal LOD, la cui determinazione è stata precedentemente descritta.

La specificità della reazione è stata valutata usando diverse diluizioni del plasmide ricombinante a concentrazione nota insieme con i altri ceppi virali, testandoli in triplicato. Per testare la capacità della metodica di amplificazione dei campioni di Bat-SARS-like CoV è stato utilizzato il cDNA ottenuto dall’RNA estratto dal campione fecale del ceppo 893/09-11. Come coronavirus non appartenenti ai Bat-SARS-like CoV sono stati testati il coronavirus felino FCoV (*Alphacoronavirus*, ceppo 420/02, cDNA ottenuto da RNA estratto da linfonodo, [123]) e il virus della bronchite infettiva IBV (*Gammacoronavirus*, ceppo M41, DQ834384, cDNA ottenuto da RNA estratto da cellule infettate, gentilmente concesso dalla Prof. Elena Catelli del DSMVet). Inoltre sono stati testati un virus a RNA non appartenente alla famiglia *Coronaviridae*, il virus del cimurro CDV (*Morbillivirus*, ceppo Onderstepoort, NOBIVAC PUPPY CP, Nobivac, Boxmeer, The Netherland, cDNA ottenuto da RNA estratto da sospensione vaccinale), ed un virus a DNA, il virus della panleucopenia felina FPV (*Parvovirus*, ceppo 1033/09, DNA estratto da lingua, [126]). Per tutte le prove è stata eseguita l’analisi della curva di melting dei prodotti delle reazione.

1.2.4.7. Variabilità intra- ed inter-reazione. Allo scopo di determinare la variabilità all’interno della singola reazione sia per gli standard di reazione (diluizioni plasmidiche) che per i campioni, sette diluizioni successive in base 10 (da 2×10^6 a 2×10^0 copie/ μ l) del plasmide ricombinante sono stati testati in triplicato e lo stesso è stato fatto per tre campioni con concentrazioni virali differenti (il campione di feci di pipistrello con la concentrazione virale più alta [B1]: 10^2 copie/ μ l, e due campioni con concentrazione molto bassa e prossima al limite di detection [B2 e B3]: 10^0 copie/ μ l).

La variabilità tra reazioni diverse è stata invece valutata per i campioni testando i tre campioni fecali di pipistrello a concentrazione virale differente (B1, B2 e B3) in triplicato nella stessa reazione per tre giorni diversi.

Per tutte le prove sono state calcolate la media, la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV) dei valori ottenuti. In particolare, il CV è stato calcolato come la percentuale del rapporto tra la deviazione standard e la media delle copie ottenute, in accordo con quanto descritto dall'US Environmental Protection Agency protocol [125].

I.2.4.8. Ricerca del coronavirus nei campioni fecali di pipistrello con SYBR Green real-time PCR. Dopo la messa a punto della metodica di SYBR Green real-time PCR, in ogni reazione sono stati analizzati: 6 diluizioni in base 10 dello standard plasmidico in duplicato, il cDNA retrotrascritto da campioni fecali di pipistrello in triplicato e un bianco di reazione (mix di reazione più acqua).

I campioni di pipistrello sono stati considerati positivi se la media delle quantità ottenute per i tre replicati di ciascun campione era superiore al LOD.

Per confermare che i prodotti di reazione avessero le dimensioni attese, 5 µl di ogni amplicone sono stati sottoposti ad elettroforesi in un gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio in TAE standard all'1% e visualizzato mediante luce ultravioletta (UV). Il MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) è stato usato per valutare le dimensioni dei frammenti di DNA.

I.2.5. Sequenziamento ed analisi di un tratto del gene Pol (ORF1a,b) dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello

Il disegno progettuale prevedeva il sequenziamento di un tratto del gene Pol (ORF1a,b), l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), seguendo la metodica messa a punto da Drexler et al. [13]:

- a) Amplificazione mediante eminested RT-PCR e sequenziamento di un frammento di circa 400 bp del gene Pol, utilizzando primer degenerati specifici per i SARS-related coronavirus o i coronavirus dell'ex gruppo 2 (*Betacoronavirus*), di tutti i campioni risultati positivi precedentemente mediante RT-PCR o real-time PCR;
- b) Disegno di primer specifici e prolungamento in direzione 5' della sequenze ottenute, fino ad una lunghezza di circa 900 bp;
- c) Analisi bioinformatica delle sequenze ottenute.

I.2.5.1. Amplificazione di un tratto del gene RdRp mediante eminested reverse transcription-PCR (RT-PCR) specifica per i SARS-related coronavirus. I campioni fecali risultati positivi per coronavirus con la coppia di primer IN-6 e IN-7 utilizzando la metodica tradizionale di RT-PCR e con la coppia di primer 11-FW modified e 13-RV modified utilizzando la metodica di SYBR Green real-time PCR, sono stati amplificati mediante eminested RT-PCR utilizzando primer specifici per un tratto altamente

conservato del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) dei SARS-related coronavirus.

La prima reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer CoV2a-F e CoV2a-R (**Appendice 2**). L'RNA estratto da un campione positivo è stato utilizzato come controllo positivo di reazione. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 6**.

Tabella 6: Mix e ciclo di reazione, primer CoV2a-F – CoV2a-R.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μl	Concentrazione finale
2X Reaction Mix	2X	12,5	1X
MgSO ₄	50 mM	0,4	0,8 mM
BSA (Bovine Serum Albumin)	1 mg/ μl	1	0,04 ng/ μl
Primer CoV2a-F	10 μM	1,5	0,6 μM
Primer CoV2a-R	10 μM	1,5	0,6 μM
SuperScript III RT/ Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix		1	
H ₂ O distillata autoclavata		2,1	
Campione (RNA estratto)		5	
Totale		25	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Retrotrascrizione	50 °C x 20 min
Inattivazione Retrotrascrittasi	95 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	60 °C x 15 sec *
Estensione	72 °C x 40 sec
Denaturazione	95 °C x 15 sec
Annealing	54 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 40 sec
Estensione finale	72 °C x 1 min

* Touch down: decremento di 0,5 °C per ogni ciclo

La seconda reazione di eminested-PCR è stata eseguita utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer CoV2a-F e CoV2a-Rnest a+b (mix di due primer reverse in eguale concentrazione 1:1, CoV2a-Rnest a e CoV2a-Rnest b) (**Appendice 2**). La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 7**.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Tabella 7: Mix e ciclo di reazione, primer CoV2a-F - CoV2a-Rnest a+b.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in µl	Concentrazione finale
10X PCR Buffer	10X	5	1X
MgCl ₂	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP mix	10 mM	1	0,2 mM
Primer CoV2a-F	10 µM	2	0,4 µM
Primer CoV2a-Rnest a+b	10 µM	3	0,6 µM
Platinum Taq DNA Polymerase	5 unit/µl	0,2	0,02 unit/µl
H ₂ O distillata autoclavata		35,3	
Campione (RNA estratto)		1	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	60 °C x 15 sec *
Estensione	72 °C x 40 sec
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	54 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 40 sec
Estensione finale	72 °C x 2 min

* Touch down: decremento di 0,5 °C per ogni ciclo

I.2.5.2. Amplificazione di un tratto del gene RdRp mediante nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) specifica per tutti i coronavirus dell'ex gruppo 2. Per ottenere un prodotto sequenziabile da un maggior numero di campioni, gli stessi campioni fecali sono stati amplificati mediante nested RT-PCR utilizzando primer specifici per un tratto altamente conservato del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) dei coronavirus di tutto l'ex gruppo 2.

La prima reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer PanCoV GrII F e PanCoV GrII R (**Appendice 2**). L'RNA estratto da un

campione positivo è stato utilizzato come controllo positivo di reazione. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 8**.

Tabella 8: Mix e ciclo di reazione, primer PanCoV GrII F – PanCoV GrII R.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μ l	Concentrazione finale
2X Reaction Mix	2X	12,5	1X
BSA (Bovine Serum Albumin)	1 mg/ μ l	1	0,04 ng/ μ l
Primer PanCoV GrII F	10 μ M	1	0,4 μ M
Primer PanCoV GrII R	10 μ M	1	0,4 μ M
SuperScript III RT/ Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix		1	
H ₂ O distillata autoclavata		3,5	
Campione (RNA estratto)		5	
Totale		25	
Ciclo di reazione			
Fasi del ciclo	Temperature e tempi		
Retrotrascrizione	54 °C x 15 min		
Inattivazione Retrotrascrittasi	94 °C x 3 min		
Denaturazione	94 °C x 15 sec		
Annealing	66 °C x 15 sec *		
Estensione	68 °C x 35 sec		
Denaturazione	94 °C x 15 sec		
Annealing	56 °C x 15 sec		
Estensione	68 °C x 35 sec		
Estensione finale	68 °C x 1 min		

} 10 X
 } 40 X

* Touch down: decremento di 1,0 °C per ogni ciclo

La seconda reazione di eminested-PCR è stata eseguita utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer PanCoV GrII Fnest e PanCoV GrII Rnest (**Appendice 2**). La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 9**.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 μ l ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Tabella 9: Mix e ciclo di reazione, primer PanCoV GrII Fnest - PanCoV GrII Rnest.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μl	Concentrazione finale
10X PCR Buffer	10X	5	1X
MgCl ₂	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP mix	10 mM	1	0,2 mM
Primer PanCoV GrII Fnest	10 μM	1,25	0,25 μM
Primer PanCoV GrII Rnest	10 μM	1,25	0,25 μM
Platinum Taq DNA Polymerase	5 unit/ μl	0,2	0,02 unit/ μl
H ₂ O distillata autoclavata		37,8	
Campione (RNA estratto)		1	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	66 °C x 15 sec *
Estensione	68 °C x 35 sec
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	56 °C x 15 sec
Estensione	68 °C x 35 sec
Estensione finale	68 °C x 1 min

* Touch down: decremento di 1,0 °C per ogni ciclo

I.2.5.3. Purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati purificati utilizzando il PCR-Purifying-Kit (2-step-process) fornito dal servizio di sequenziamento SeqLab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Germany, <http://www.seqlab.de>) seguendo le istruzioni del produttore e sequenziati sia con il primer forward che con il primer reverse.

I.2.5.4. Prolungamento della sequenza del gene RdRp in direzione 5' mediante eminested reverse transcription-PCR (RT-PCR). I campioni risultati positivi nelle due reazioni precedenti sono stati amplificati mediante eminested RT-PCR, utilizzando un primer forward aspecifico e due primer reverse disegnati sulle sequenze ottenute, allo scopo di prolungare in direzione 5' le sequenze del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp).

La prima reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer CoV GrII F3080 e CoV-RhiFerPol IT-R (**Appendice 2**). L'RNA estratto da un campione positivo è stato utilizzato come controllo positivo di reazione. La

composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 10**.

Tabella 10: Mix e ciclo di reazione, primer CoV GrII F3080 - CoV-RhiFerPol T-R.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μ l	Concentrazione finale
2X Reaction Mix	2X	12,5	1X
BSA (Bovine Serum Albumin)	1 mg/ μ l	1	0,04 ng/ μ l
Primer CoV GrII F3080	10 μ M	1	0,4 μ M
Primer CoV-RhiFerPol T-R	10 μ M	1	0,4 μ M
SuperScript III RT/ Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix*		1	
H ₂ O distillata autoclavata		3,5	
Campione (RNA estratto)		5	
Totale		25	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Retrotrascrizione	54 °C x 15 min
Inattivazione Retrotrascrittasi	94 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	64 °C x 15 sec *
Estensione	72 °C x 45 sec
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	54 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 45 sec
Estensione finale	72 °C x 1 min

* Touch down: decremento di 1,0 °C per ogni ciclo

La seconda reazione di eminested-PCR è stata eseguita utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la coppia di primer CoV GrII F3080 e CoV-RhiFerPol IT-Rnest (**Appendice 2**). La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 11**.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 μ l ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati e sequenziati.

Tabella 11: Mix e ciclo di reazione, primer CoV GrII F3080 - CoV-RhiFerPol T-Rnest.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μ l	Concentrazione finale
10X PCR Buffer	10X	5	1X
MgCl ₂	50 mM	2	2 mM
dNTP mix	10 mM	1	0,2 mM
Primer CoV GrII F3080	10 μ M	1,5	0,3 μ M
Primer CoV-RhiFerPol T-Rnest	10 μ M	1,5	0,3 μ M
Platinum Taq DNA Polymerase	5 unit/ μ l	0,2	0,02 unit/ μ l
H ₂ O distillata autoclavata		37,8	
Campione (RNA estratto)		1	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 3 min
Denaturazione	95 °C x 15 sec
Annealing	56 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 45 sec
Estensione finale	72 °C x 2 min

I.2.5.5. Analisi bioinformatica. Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando l'interfaccia web di BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per valutare quali sequenze di referenza presenti nel database di GenBank presentassero il maggior grado di similitudine con i ceppi amplificati e successivamente assemblate mediante il software SeqMan del programma DNASTAR Lasergene 7 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

Le sequenze assemblate sono state utilizzate per creare due allineamenti utilizzando l'interfaccia web di ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Il primo allineamento era composto da sequenze della lunghezza di 816 bp e comprendeva 128 ceppi di referenza della famiglia *Coronaviridae*, disponibili nel database di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>); mentre il secondo era composto da sequenze di 331 bp e permetteva di includere nell'analisi, oltre ai 128 ceppi precedenti, altre 122 brevi sequenze di coronavirus identificati in pipistrelli presenti sul database di sequenze nucleotidiche di GenBank.

Le sequenze incluse nel primo allineamento erano:

Alphacoronavirus: Bat-CoV asiatici (DQ648858, EF203064, EF203065, EF203066, EF203067, EU420137, EU420138, EU420139, AY864196, DQ249224, DQ249226, DQ249228, DQ249235). Bat-CoV europei (GU190216, GU190232, GU190233, GU190234, GU190235, GU190236, GU190237, GU190238, GU190239, GU190240, GU190241, GU190242, GU190243, GU190244, GU190245, GU190246, GU190247, GU190248). Bat-CoV africani (HQ728480, HQ728481, HQ728484, HQ728485,

HQ728486). Bat-CoV sud americani (EU769557). HCoV-229E (AF304460). HCoV-NL63 (AY567487, AY518894). PEDV (AF353511). FIPV (AY994055, DQ010921). PRCV (DQ811787). TGEV (DQ811789).

Betacoronavirus: SARS-CoV umani (AY463060, AY278741, AY274119, AY278489, AY559089). SARS-CoV animali (AY304486, AY304488, AY545919). Bat-SARS-like CoV asiatici (DQ071615, DQ022305, DQ084199, DQ084200, GQ153539, GQ153540, GQ153541, GQ153542, GQ153543, GQ153544, GQ153545, GQ153546, GQ153547, GQ153548, DQ412042, DQ412043, DQ648856, DQ648857, FJ588686). Bat-SARS-like CoV europei (GU190215, GU190217, GU190218, GU190219, GU190220, GU190221, GU190222, GU190223, GU190224, GU190225, GU190226, GU190227, GU190228, GU190229, GU190230, GU190231). Bat-CoV asiatici (DQ648794, EF065505, EF065506, EF065507, EF065508, EF065509, EF065510, EF065511, EF065512, EF065513, EF065514, EF065515, EF065516, HM211098, HM211099, HM211100, HM211101). Bat-CoV africani (HQ166910, HQ728482, HQ728483). BCoV (AF391541). HCoV-OC43 (AY391777, AY585229). PHEV (DQ011855). ECoV (EF446615). SaCoV (EF424621). GiCoV (EF424622).

Gammacoronavirus: IBV (M95169, AJ311317). TCoV (EU095850). Beluga Whale coronavirus SW1 (EU111742). BuCoV (FJ376620). ThCoV (FJ376621). MuCoV (FJ376622).

Non classificati: Asian leopard cat coronavirus Guangxi/F230/2006 (EF584908). Bat-CoV africani (FJ710043, FJ710044, FJ710045, FJ710046, FJ710047).

Le sequenze di coronavirus identificati in pipistrelli aggiunte nel secondo allineamento erano, sulla base della provenienza geografica:

- Asia: DQ648795, AB539080, AB539081.
- Europa: EU375853, EU375854, EU375855, EU375856, EU375857, EU375858, EU375859, EU375860, EU375861, EU375862, EU375863, EU375864, EU375865, EU375866, EU375867, EU375868, EU375869, EU375870, EU375871, EU375872, EU375873, EU375874, EU375875, HM368166, HQ184049, HQ184050, HQ184051, HQ184052, HQ184053, HQ184054, HQ184055, HQ184056, HQ184057, HQ184058, HQ184059, HQ184060, HQ184061, HQ184062.
- Nord America: EF544563, EF544564, EF544565.
- Sud America: EU769558.
- Africa: FJ710053, FJ710054, GU065374, GU065375, GU065376, GU065377, GU065378, GU065379, GU065381, GU065382, GU065383, GU065384, GU065385, GU065386, GU065387, GU065388, GU065389, GU065390, GU065391, GU065392, GU065393, GU065395, GU065396, GU065397, GU065398, GU065399, GU065400, GU065401, GU065402, GU065403, GU065404, GU065405, GU065406, GU065407, GU065408, GU065409, GU065410, GU065411, GU065412, GU065413, GU065414, GU065415, GU065416, GU065417, GU065418, GU065419, GU065420, GU065421, GU065422, GU065423, GU065425, GU065426, GU065427, GU065428, GU065429, GU065430, GU065431, GU065432, GU065433, GU065434, GU065435, GU065436,

GU065437, GU065439, GU065440, GU065441, GU065442, GQ404795, GQ404796, GQ404797.

- Australia: EU834950, EU834951, EU834952, EU834953, EU834954, EU834955, EU834956.

La traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacidiche ed il calcolo del grado di similarità tra le sequenze sono stati effettuati mediante il programma BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.9.

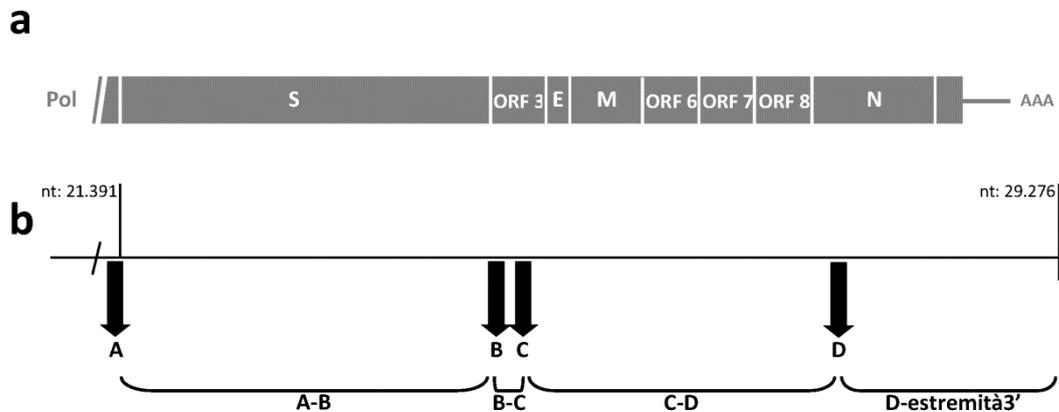
L'analisi filogenetica eseguita con il software Phylip versione 3.68, utilizzando il metodo di massima probabilità (maximum likelihood, ML) implementato in ProML, ha permesso di elaborare un albero filogenetico basato su tutte le sequenze aminoacidiche ottenute, insieme a 128 sequenze di ceppi di riferimento della famiglia *Coronaviridae*. I valori di bootstrap, che permettono di valutare il livello di confidenza di ogni ramo dell'albero ottenuto, sono stati ottenuti ripetendo per 1.000 volte l'elaborazione dei dati. Per l'elaborazione dell'albero filogenetico è stato utilizzato l'allineamento aminoacidico di sequenze del gene RdRp della lunghezza di 816 bp in quanto permette di ottenere una stima affidabile dei rapporti filogenetici e della classificazione tassonomica dei coronavirus analizzati, come proposto da Drexler et al. [13]. Nell'analisi sono stati inclusi anche i ceppi (893/09-68, 893/09-75 e 1103/09-5A) di cui era disponibile una sequenza incompleta del gene RdRp.

I.2.6. Sequenziamento ed analisi della porzione 3' del genoma dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello

Il sequenziamento della porzione 3' del genoma è stato tentato solo per i campioni di cui è stato precedentemente sequenziato il gene RdRp; il disegno progettuale prevedeva:

- a) Amplificazione mediante emested RT-PCR e sequenziamento di quattro brevi tratti di circa 200-400 bp situati nella porzione 3' del genoma (**Figura 7: A, B, C, D**);
- b) Amplificazione dei frammenti intermedi compresi tra i tratti brevi (**Figura 7 A-B, B-C, C-D**), utilizzando primer specifici disegnati sulle sequenze ottenute;
- c) Amplificazione mediante metodica 3'-RACE dell'estremità 3' del genoma (**Figura 7: D-estremità3'**);
- d) Sequenziamento dei frammenti intermedi e dell'estremità 3' mediante primer-walking;
- e) Analisi bioinformatica delle sequenze ottenute.

Figura 7: Rappresentazione schematica del protocollo di sequenziamento della porzione 3' del genoma dei ceppi italiani.



In a è rappresentata schematicamente l'organizzazione genomica dei SARS-related CoV. In b è rappresentato il protocollo di sequenziamento basato sulla sequenza genomica del Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 (GU190215), 29276 bp.

A, B, C, D: brevi tratti di circa 200-400 bp.

A-B, B-C, C-D: frammenti intermedi.

D-estremità 3': estremità 3' del genoma.

1.2.6.1. Amplificazione e sequenziamento di quattro brevi tratti della porzione 3' del genoma. I campioni che avevano dato un prodotto sequenziabile per il gene RdRp sono stati amplificati, mediante eminested RT-PCR, utilizzando primer aspecifici per quattro brevi tratti (dai 200 ai 400 bp ciascuno) dell'estremità 3' del genoma virale (**Figura 7: A, B, C, D**).

A tale scopo sono state utilizzate quattro terzine di primer che, procedendo lungo il genoma virale in direzione 5'-3', erano (**Appendice 2**):

- A: CoVSARS-RhiSpike-F2315
CoVSARS-RhiSpike-F2342
CoVSARS-RhiSpike-R2643
- B: CoVSARS-RhiSpike-F6287
CoVSARS-RhiSpike-R6635
CoVSARS-RhiSpike-R6658
- C: CoVSARS-RhiSpike-F6608
CoVSARS-RhiSpike-F6634
CoVSARS-RhiSpike-R6883
- D: CoVSARS-RhiSpike-F27815
CoVSARS-RhiSpike-R27955
CoVSARS-RhiSpike-R28008

I quattro tratti brevi suddividevano la porzione 3' del genoma virale in quattro parti: tre frammenti intermedi che distanziavano i tratti brevi ed una estremità finale (**Figura 7** A-B, B-C, C-D, D-estremità3'). I tre frammenti intermedi erano composti da alcune migliaia di basi per A-B (circa 4000 bp) e C-D (circa 3000 bp) e da poche decine di basi per B-C; mentre il frammento che andava da D all'estremità finale 3' era composto da circa 2000 bp.

I primer utilizzati presentavano temperatura di melting molto simili tra loro in modo tale da permettere l'utilizzo della stessa mix e dello stesso ciclo di reazione per tutte quattro le reazioni.

La prima reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la seconda reazione di emested-PCR è stata eseguita utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione delle due reazioni sono riportati rispettivamente nelle **Tabelle 12 e 13**.

Tabella 12: Mix e ciclo di reazione, RT-PCR per brevi tratti della porzione 3' del genoma.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in µl	Concentrazione finale
2X Reaction Mix	2X	12,5	1X
BSA (Bovine Serum Albumin)	1 mg/µl	1	0,04 ng/µl
MgSO ₄	50 mM	0,4	0,8 mM
Primer F	10 µM	1,5	0,6 µM
Primer R	10 µM	1,5	0,6 µM
SuperScript III RT/ Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix		1	
H ₂ O distillata autoclavata		2,1	
Campione (RNA estratto)		5	
Totale		25	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Retrotrascrizione	50 °C x 20 min
Inattivazione Retrotrascrittasi	95 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	60 °C x 15 sec *
Estensione	72 °C x 25 sec
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	50 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 25 sec
Estensione finale	72 °C x 1 min

* Touch down: decremento di 1,0 °C per ogni ciclo

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Tabella 13: Mix e ciclo di reazione, eminged-PCR per brevi tratti della porzione 3' del genoma.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μ l	Concentrazione finale
10X PCR Buffer	10X	5	1X
MgCl ₂	50 mM	2,5	2,5 mM
dNTP mix	10 mM	1	0,2 mM
Primer F	10 μ M	2	0,4 μ M
Primer R	10 μ M	2	0,4 μ M
Platinum Taq DNA Polymerase	5 unit/ μ l	0,2	0,02 unit/ μ l
H ₂ O distillata autoclavata		36,3	
Campione (RNA estratto)		1	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 3 min
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	60 °C x 15 sec *
Estensione	72 °C x 25 sec
Denaturazione	94 °C x 15 sec
Annealing	48 °C x 15 sec
Estensione	72 °C x 25 sec
Estensione finale	72 °C x 1 min

* Touch down: decremento di 1,0 °C per ogni ciclo

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 μ l ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Il sequenziamento dei prodotti ottenuti ha permesso di disegnare primer specifici per la retrotrascrizione e l'amplificazione dei frammenti compresi tra i tratti brevi (A-B, B-C, C-D) ed il frammento terminale D-estremità3'.

I.2.6.2. Sequenziamento dei frammenti intermedi grandi A-B e C-D. La sintesi dei cDNA dei frammenti intermedi grandi (A-B, C-D) è stata ottenuta mediante primer specifici utilizzando la SuperScript™ III Reverse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo le istruzioni del produttore. Per il frammento A-B è stato utilizzato il primer CoV-RhiFerIT-

25140 R e per il frammento B-C è stato utilizzato il primer CoV-RhiFerIT-27530 R (**Appendice 2**). I cDNA ottenuti sono stati conservati a -20 °C e successivamente amplificati mediante nested o eminedsted PCR, utilizzando primer specifici disegnati sulle sequenze dei tratti brevi (**Appendice 2**):

Primer per l'amplificazione del frammento A-B (circa 4000bp) dei campioni 771/09-5, 893/09-11, 1103/09-4 e 1103/09-5:

1° PCR: CoV-RF21000IT 1-2-17-18 F
CoV-RhiFer IT-25140 R
2° PCR: CoV-RhiFer21000IT-Fnest
CoV-RF25100IT 1-2-17-18 Rnest

Primer per l'amplificazione del frammento A-B (circa 4000bp) dei campioni 893/09-75, 1028/09-13 e 1028/09-21:

1° PCR: CoV-RF21000IT 15-9-13 F
CoV-RhiFer IT-25140 R
2° PCR: CoV-RhiFer21000IT-Fnest
CoV-RF25100IT 15-9-13 Rnest

Primer per l'amplificazione del frammento C-D (circa 3000bp) dei campioni 771/09-5, 893/09-11 e 1103/09-4:

1° PCR: CoV-RF25350IT-1-2-17 F
CoV-RhiFer IT-27530 R
2° PCR: CoV-RhiFer IT-25500 Fnest
CoV-RhiFerIT-27500 Rnest

Primer per l'amplificazione del frammento C-D (circa 3000bp) dei campioni 893/09-75, 1028/09-13, 1028/09-21 e 1103/09-5:

1° PCR: CoV-RF25350IT 13-15-18 F
CoV-RhiFer IT-27530 R
2° PCR: CoV-RhiFer IT-25500 Fnest
CoV-RhiFerIT-27500 Rnest

La prima reazione di PCR è stata eseguita utilizzando la Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e la seconda reazione di PCR è stata eseguita utilizzando la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific Finnzymes, Vantaa, Finland), seguendo le istruzioni del produttore.

I campioni per i quali non è stato ottenuto l'amplificato atteso del frammento A-B (campioni 771/09-5 e 893/09-11) sono stati retrotrascritti per questo frammento intermedio in due cDNA più corti, utilizzando primer aspecifici e la SuperScript™ III Reverse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Per le due porzioni del frammento A-B sono stati utilizzati rispettivamente i primer CoVSARS-RhiSpike-R3780 e CoVSARS-RhiSpike-R4236 (**Appendice 2**); i due cDNA ottenuti sono stati successivamente amplificati mediante eminedsted PCR, utilizzando la

Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e primer specifici disegnati sulle sequenze dei tratti brevi A e B (**Appendice 2**):

Primer per l'amplificazione della prima porzione del frammento A-B dei campioni 771/09-5 e 893/09-11:

1° PCR: CoV-RF21000IT 1-2-17-18 F
CoVSARS-RhiSpike-R3780
2° PCR: CoV-RhiFer21000IT-Fnest
CoVSARS-RhiSpike-R3780

Primer per l'amplificazione della seconda porzione del frammento A-B dei campioni 771/09-5 e 893/09-11:

1° PCR: CoV-RF21000IT 1-2-17-18 F
CoVSARS-RhiSpike-R4236
2° PCR: CoV-RhiFer21000IT-Fnest
CoVSARS-RhiSpike-R4236

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

I prodotti di PCR dei frammenti intermedi A-B e C-D ottenuti sono stati purificati e sequenziati mediante primer-walking disegnando di volta in volta primer specifici per i singoli campioni.

1.2.6.3. Sequenziamento del frammento intermedio piccolo B-C. Il frammento intermedio piccolo B-C è stato amplificato mediante eminested RT-PCR, utilizzando due coppie di primer specifici disegnati sulle sequenze dei tratti brevi B e C (**Appendice 2**):

RT-PCR: CoV-RhiFerIT-25100 F
CoV-RhiFerIT-25400 R
emin. PCR: CoV-RhiFerIT-25200 Fnest
CoV-RhiFerIT-25400 R

La prima reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la seconda reazione di eminested-PCR è stata eseguita utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo le istruzioni del produttore.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati e sequenziati.

I.2.6.4. Sequenziamento del frammento D-estremità 3'. La sintesi del cDNA dell'estremità 3' è stata ottenuta mediante il primer 3'-RACE oligo dT (**Appendice 2**) ed utilizzando la SuperScript™ III Reverse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20 °C ed amplificato mediante nested PCR utilizzando due coppie di primer, di cui i forward erano stati disegnati sulle sequenze del tratto breve D ed i reverse erano aspecifici per il tratto terminale poli-A (**Appendice 2**):

1° PCR: CoV-RhiFerIT-27530 F

3'-RACE primer

2° PCR: CoV-RhiFerIT-27530 Fnest

3'-RACE nest primer

Le due reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo le istruzioni del produttore.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati e sequenziati mediante primer-walking disegnando primer specifici per i singoli campioni.

I.2.6.5. Analisi bioinformatica. Tutte le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando l'interfaccia web di BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per confermarne l'appartenenza alla famiglia *Coronaviridae* ed assemblate mediante l'applicazione SeqMan del programma DNASTAR Lasergene 7 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

Le sequenze assemblate della porzione 3' del genoma sono state allineate con 27 sequenze di riferimento disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) appartenenti al gruppo dei SARS-related coronavirus, comprendente i coronavirus della SARS umani ed animali ed i SARS-like coronavirus dei pipistrelli, utilizzando l'interfaccia web di ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

L'analisi è stata eseguita utilizzando le seguenti sequenze di referenza:

SARS-CoV umani ed animali: SARS-CoV ShanghaiQXC2 (AY463060), SARS-CoV Urbani (AY278741), SARS-CoV Tor2 (AY274119), SARS-CoV GD01 (AY278489), Civet SARS-CoV SZ3/2003 (AY304486), Civet SARS-CoV SZ16/2003 (AY304488), SARS-CoV ferret badger: SARS-CoV CFB/SZ/94/03 (AY545919).

Bat-SARS-like CoV asiatici: Bat-SARS CoV Rp3/2004 (DQ071615) Bat-SARS CoV HKU3-1 (DQ022305), Bat-SARS CoV HKU3-2 (DQ084199), Bat-SARS CoV HKU3-3 (DQ084200), Bat-SARS CoV HKU3-4 (GQ153539), Bat-SARS CoV HKU3-5 (GQ153540), Bat-SARS CoV HKU3-6 (GQ153541), Bat-SARS CoV HKU3-7 (GQ153542), Bat-SARS CoV HKU3-8 (GQ153543), Bat-SARS CoV HKU3-9 (GQ153544), Bat-SARS CoV HKU3-10 (GQ153545), Bat-SARS CoV HKU3-11 (GQ153546), Bat-SARS CoV HKU3-12 (GQ153547), Bat-SARS CoV HKU3-13 (GQ153548), Bat-SARS CoV Rf1/2004 (DQ412042), Bat-SARS CoV Rm1/2004 (DQ412043), Bat-CoV 273/2005 (DQ648856), Bat-CoV 279/2005 (DQ648857), Bat-SARS CoV Rs672/2006 (FJ588686).

Bat-SARS-like CoV europei: Bat-CoV BM48-31/BGR/2008 (GU190215).

La traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacidiche ed il calcolo del grado di similarità tra le sequenze sono stati effettuati per tutti i geni compresi in questa regione del genoma (ORF2 o gene S, ORF3, ORF4 o gene E, ORF5 o gene M, ORF6, ORF7a,b, ORF8 ed ORF9 o gene N) mediante il programma BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.9.

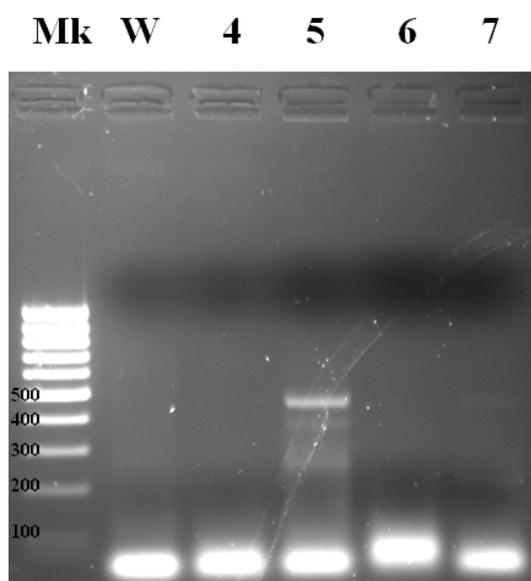
Nel genoma dei coronavirus, il gene S rappresenta il tratto più variabile e codifica per la proteina dello spike che è sede dei principali epitopi immunogeni ed è responsabile del legame con il recettore della cellula ospite. Per meglio analizzare il processo evolutivo a carico di questo gene e per confermare i rapporti filogenetici evidenziati dalle sequenze del gene RdRp, è stata eseguita l'analisi filogenetica di questo gene. L'elaborazione è stata eseguita utilizzando il software MEGA versione 5.0, mediante il metodo di massima probabilità (maximum likelihood, ML), basandosi sull'allineamento delle sequenze aminoacidiche. Sono stati ottenuti tre alberi filogenetici, il primo è stato costruito sull'allineamento delle sequenze dell'intero gene S che comprendeva: le sequenze ottenute nello studio, i 27 ceppi di referenza del gruppo SARS-related coronavirus ed il ceppo africano Zaria bat coronavirus ZBCoV (HQ166910) identificato in una specie di pipistrello non appartenente ai *Rhinolophus* spp. [19]. Gli altri due alberi sono stati costruiti rispettivamente sugli allineamenti delle sequenze del dominio RBD e del motivo RBM del gene S, comprendenti le sequenze ottenute nello studio e i 27 ceppi di referenza del gruppo SARS-related coronavirus. La valutazione statistica degli alberi ottenuti è stata effettuata calcolando i valori di bootstrap ottenuti ripetendo per 1.000 volte l'elaborazione dei dati.

I.3. Risultati

I.3.1. Ricerca di coronavirus nei campioni fecali di pipistrello mediante RT-PCR

Due dei 52 campioni analizzati, corrispondenti al 3,8%, sono risultati positivi mediante RT-PCR, ottenendo un amplicone delle dimensioni attese di 440 bp (**Figura 8**). Entrambi i campioni risultati positivi erano campioni fecali, mentre nessuno degli 11 tamponi rettali ha dato esito positivo.

Figura 8: Elettroforesi dei prodotti di real-time PCR su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: amplificati dei campioni di pipistrello testati con metodica di RT-PCR.



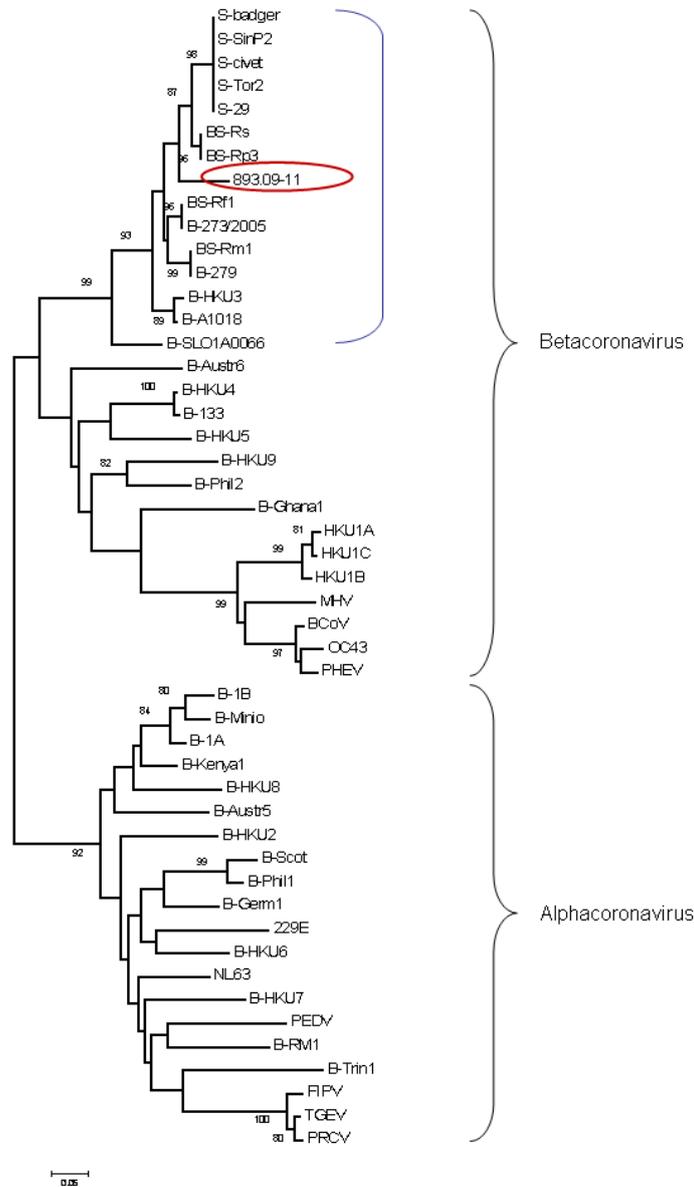
Le bande specifiche hanno una altezza di circa 440 bp. Nella figura è riportata la corsa elettroforetica dei campioni 771/09-4,5,6,7 appartenenti all'area 1 (Palagano, MO).

MK: MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). W: bianco di reazione.

I due campioni risultati positivi, 771/09-5 e 893/09-11, provenivano da diverse regioni italiane, rispettivamente una nel nord (Emilia Romagna, provincia di Modena, sito 1 vedi **Appendice 1 e Figura 5**) ed una nel sud (Puglia, provincia di Foggia, sito 2 vedi **Appendice 1 e Figura 5**).

Di questi due campioni, solo dal numero 893/09-11 è stato possibile ottenere la sequenza nucleotidica del prodotto di PCR, mentre per il campione 771/09-5 non si è ottenuta una sequenza leggibile di buona qualità, a causa della ridotta quantità dell'amplicone ottenuto dall'estratto fecale di partenza.

Figura 9: Relazioni filogenetiche del ceppo 893/09-11 con 48 ceppi di riferimento di coronavirus presenti sul nucleotide database di genBank.



L'albero filogenetico è stato generato con il metodo della distanza utilizzando le sequenze nucleotidiche di un frammento del gene RdRp ottenute nel presente studio e con 48 ceppi di riferimento di coronavirus ottenute dal database di GenBank. I valori di bootstrap $\geq 80\%$, calcolati su 1.000 replicati, sono riportati al fianco del ramo corrispondente. Cerchio: 893/09-11. Parentesi quadra: coronavirus del gruppo 2b, SARS-related coronavirus ed alcuni coronavirus non classificati.

Ceppi di riferimento di coronavirus disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica: S-civet (AY304488), S-badger (AY545919), S-29 (CQ903025), S-SinP2 (AY559089), S-Tor2 (NC_004718), BS-Rs (NC_013664), BS-Rp3 (NC_009693), BS-Rf1 (NC_009695), B-273/2005 (DQ648856), BS-Rm1 (NC_009696), B-279 (DQ648857), B-HKU3 (NC_009694), B-A1018 (DQ648795), B-SLO1A0066 (GQ404795), B-Austr6 (EU834950), B-HKU4 (NC_009019), B-133 (NC_008315), B-HKU5 (NC_009020), B-HKU9 (NC_009021), B-Phil2 (AB539081), B-Ghana1 (FJ710053), HKU1A (NC_006577), HKU1B (AY884001), HKU1C (DQ339101), MHV (NC_001846), BCoV (NC_003045), OC43 (NC_005147), PHEV (NC_007732), B-1B (NC_010436), B-Mino (AY864197), B-1A (NC_010437), B-Kenya1 (GQ920838), B-HKU8 (NC_010438), B-Austr5 (EU834951), B-HKU2 (NC_009988), B-Scot (NC_009657), B-Phil1 (AB539080), B-Germ1 (EU375875), 229E (NC_002645), B-HKU6 (DQ249224), NL63 (NC_005831), B-HKU7 (DQ249226), PEDV (NC_003436), B-RM1 (EF544565), B-Trin1 (EU769558), FIPV (AY994055), TGEV (NC_002306), PRCV (DQ811787).

L'allineamento della sequenza del campione 893/09-11 con sequenze di referenza di coronavirus umani ed animali presenti sul database di GenBank ha consentito di calcolare le seguenti percentuali di identità: 86-91% con coronavirus non classificati appartenenti al gruppo 2b, 89% con i SARS-CoV, 67-69% con i Bat-CoV appartenenti al genere *Betacoronavirus*, 57-64% con Bat-CoV del genere *Alphacoronavirus* ed identità nucleotidiche comprese tra 53 e 59% con tutti gli altri coronavirus dei mammiferi appartenenti ad entrambi i generi (con l'eccezione del CoV NL63 con cui ha una percentuale di identità del 64%). Inoltre, la sequenza del campione 893/09-11 presentava una notevole variabilità nelle percentuali di identità nucleotidica quando comparata con le sequenze di alcuni coronavirus non classificati: con i ceppi BtCoV/A1018/2005 (DQ648795) e BtCoV SLO1A0066/2008/SVN (GQ404795) mostrava un'alta percentuale di identità (84-87%), mentre con i ceppi Kenya bat CoV BtKY42 (GQ920838) e Bat CoV Hipposideros/GhanaKwam/10/2008 (FJ710053) mostrava una bassa percentuale di identità (64%).

Questi risultati sono supportati dall'albero filogenetico costruito utilizzando le sequenze nucleotidiche del frammento del gene RdRp del ceppo italiano 893/09-11 e dei 48 ceppi di referenza presenti sul database di GenBank, in cui il ceppo 893/09-11 appariva raggruppato con i SARS-CoV, i SARS-related CoV ed alcuni coronavirus non classificati (**Figura 9**). I dati erano supportati da valori di bootstrap > 90 %.

I.3.2. Messa a punto e validazione di una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per SARS-related coronavirus e sua applicazione nello screening di campioni fecali di pipistrello

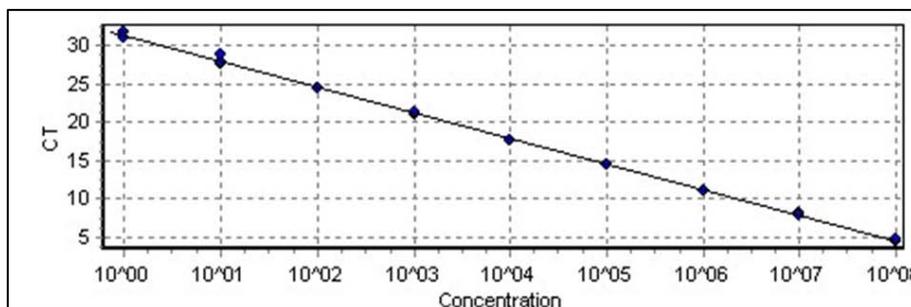
I.3.2.1. Messa a punto e validazione della metodica di SYBR Green real-time PCR. La linearità e l'efficienza della metodica di SYBR Green real-time PCR sono state valutate sulla base di una curva standard ottenuta testando diluizioni seriali in base 10 di un plasmide ricombinante a concentrazione nota contenente il frammento target del genoma di un Bat-SARS-like coronavirus. La curva standard è stata generata graficando il numero del ciclo soglia (Ct) ottenuto per ogni diluizione plasmidica con il numero di copie della stessa (**Figura 10**). La pendenza della retta ottenuta (curva standard) ha mostrato di avere una relazione lineare per 9 diluizioni plasmidiche in base 10 consecutive, comprese approssimativamente tra 1×10^0 e 1×10^8 copie/ μ l. La pendenza della retta (slope) era di -3,36 con un coefficiente di determinazione (R^2) > 0,99 ed una efficienza di reazione (E) di 0,99. Quest'ultima è stata calcolata sulla base della pendenza (S) mediante la formula $E=10^{(-1/S)}-1$.

Il limite di detection (LOD) della metodica, determinato sulla curva standard generata amplificando le diluizioni in base 10 del plasmide ricombinante, era di 0,0045 fg, corrispondenti a 1 copia/ μ l, mostrando quindi una elevata sensibilità della metodica.

La specificità della reazione è stata confermata da una temperatura di melting di 83,3 °C per le diluizioni dello standard plasmidico, comprovando la formazione di un singolo

prodotto di PCR, senza artefatti come prodotti di amplificazione aspecifici o primer dimers.

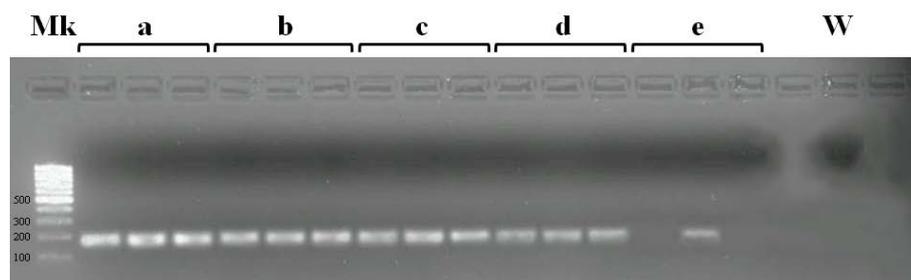
Figura 10: Curva standard e limite di detection (LOD) della reazione di SYBR Green real-time PCR.



CT: ciclo di reazione. Concentration: concentrazione rilevata.

Inoltre, gli ampliconi ottenuti sono stati testati mediante elettroforesi su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard TAE buffer e una chiara e ben definita banda specifica di approssimativamente 168 bp è stata visualizzata con luce UV per tutti i replicati delle diluizioni plasmidiche, con la sola eccezione della diluizione a concentrazione 1×10^{-1} copie/ μ l (**Figura 11**).

Figura 11: Elettroforesi dei prodotti di real-time PCR su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: amplificati delle diluizioni plasmidiche in base 10 ottenuti nella determinazione del limite di detection (LOD).



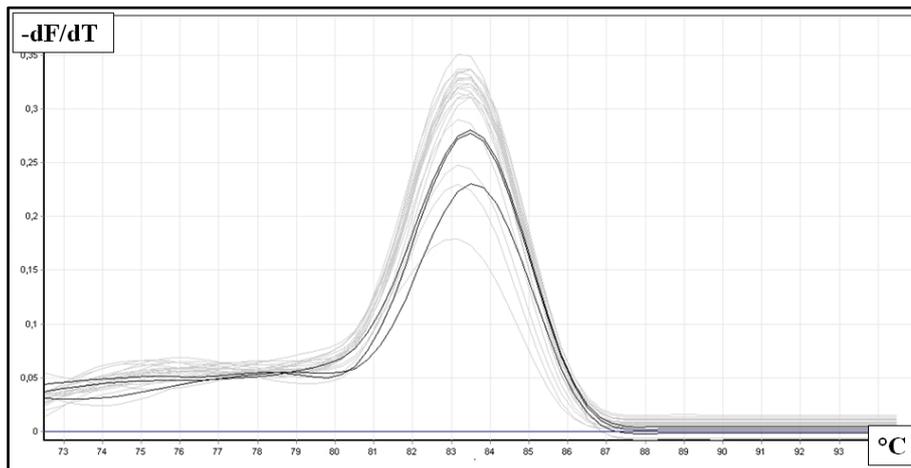
Le bande specifiche di circa 168 bp sono state visualizzate per tutti i replicati delle diluizioni plasmidiche ad eccezione della diluizione con concentrazione 1×10^{-1} copie/ μ L; per questa diluizione è stato visualizzato un solo prodotto specifico su tre replicati.

MK: MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). a, b, c, d, e: prodotti delle diluizioni plasmidiche in base 10 con concentrazione 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} copie/ μ L. W: bianco di reazione.

La metodica sviluppata è stata capace di amplificare il campione di Bat-SARS-like coronavirus 893/09-11, mentre nessun risultato si è avuto testando tutti gli altri virus a

RNA o DNA. L'analisi della curva di melting del campione 893/09-11 ha mostrato un singolo picco corrispondente a 83,3 °C (**Figura 12**). Questi risultati suggeriscono che la tecnica messa a punto possiede un'elevata specificità nei confronti dei Bat-SARS-like coronavirus.

Figura 12: Analisi della curva di melting delle diluizioni plasmidiche e del campione 893/09-11.



Grigio: segnale ottenuto dalle diluizioni plasmidiche. Nero: segnale ottenuto dal campione 893/09-11. Derivata $-dF/dT$: dove F è la fluorescenza e T è il tempo. °C: temperatura in gradi centigradi.

La variabilità intra-reazione è stata determinata, prima, testando sette diluizioni in base 10 del plasmide ricombinante in triplicato e, successivamente, testando tre campioni fecali di pipistrello con diversa concentrazione virale anch'essi in triplicato. Il coefficiente di variazione (CV) ottenuto variava da 0,45 a 1,41 per le diluizioni plasmidiche con concentrazione superiore a 10^2 copie/ μ l, mentre tale valore incrementava progressivamente per plasmidi a concentrazione più bassa. Per i campioni fecali di pipistrello il CV era di 1,27 per il campione a concentrazione virale di 10^2 copie/ μ l e 7,56-13,68 per i campioni a concentrazione di 10^0 copie/ μ l (**Tabella 14**). La variabilità inter-reazione valutata sui tre campioni fecali di pipistrello a concentrazione virale differente ha dato valori di CV pari a 1,38 per il campione a concentrazione 10^2 copie/ μ l e a 23,97-28,79 per i campioni a concentrazione 10^0 copie/ μ l (**Tabella 14**).

La variabilità intra- ed inter-reazione per le diluizioni plasmidiche ed i campioni risulta perciò bassa per concentrazioni decrescenti fino a valori pari a 10^2 copie/ μ l, mentre aumentano progressivamente per concentrazioni più basse, in quanto influenzate da distribuzioni statistiche (legge di Poisson) che prevedono un aumento dei valori di CV nella quantificazione di un numero di copie molto basso. Comunque, nonostante l'alta variabilità, i plasmidi e i campioni con concentrazioni molto basse sono stati sempre rilevati in tutte le ripetizioni dalla metodica di SYBR Green real-time PCR.

Inoltre, la deviazione standard (SD) calcolata tra reazioni individuali indipendenti aveva valori inferiori a 0,25 \log_{10} (**Tabella 14**), che è una soglia normalmente considerata come requisito minimo accettabile per valutare la riproducibilità di metodiche molecolari quantitative.

Tabella 14: Variabilità della reazione di SYBR Green real-time PCR.

Campioni	Numero di replicati (e reazioni)	Media (SD)	\log_{10} media (SD)	\log_{10} CV %
Variabilità intra-reazione				
A1	3 (1)	1,86E+06 (2,35E+05)	6,27 (0,05)	0,84
A2	3 (1)	2,03E+05 (1,77E+04)	5,31 (0,04)	0,71
A3	3 (1)	2,00E+04 (8,96E+02)	4,30 (0,02)	0,45
A4	3 (1)	2,26E+03 (2,53E+02)	3,35 (0,05)	1,41
A5	3 (1)	2,09E+02 (8,22)	2,32 (0,02)	0,74
A6	3 (1)	1,98E+01 (5,29)	1,28 (0,13)	9,99
A7	3 (1)	2,09E+00 (0,44)	0,31 (0,09)	28,58
B1	3 (1)	5,79E+02 (4,65E+01)	2,76 (0,03)	1,27
B2	3 (1)	2,00E+00 (0,10)	0,30 (0,02)	7,56
B3	3 (1)	4,01E+00 (0,74)	0,60 (0,08)	13,68
Variabilità inter-reazione				
B1	3 (3)	6,08E+02 (5,58E+01)	2,78 (0,04)	1,38
B2	3 (3)	2,06E+00 (0,34)	0,29 (0,07)	23,97
B3	3 (3)	3,11E+00 (0,82)	0,46 (0,13)	28,79

Diluizioni plasmidiche in base 10: A1 (2×10^6), A2 (2×10^5), A3 (2×10^4), A4 (2×10^3), A5 (2×10^2), A6 (2×10^1), and A7 (2×10^0).

Tre campioni di pipistrello con diversa concentrazione virale: B1 (10^2), B2 e B3 (10^0).

SD: deviazione standard.

CV: coefficiente di variazione.

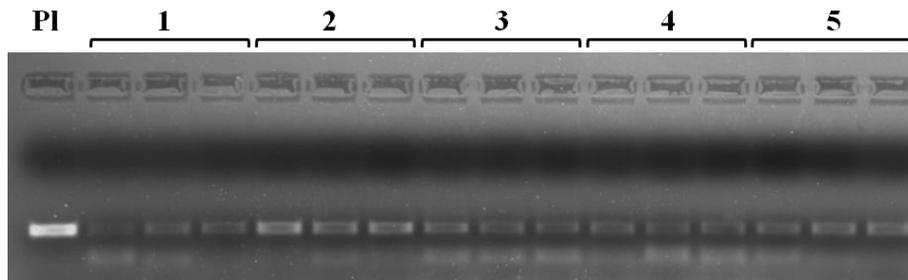
1.3.2.2. Screening di campioni fecali di pipistrello utilizzando la metodica SYBR Green real-time PCR. Gli RNA estratti da 45 campioni fecali di *Rhinolophus ferrumequinum* sono stati testati in triplicato per cercare la presenza di SARS-like coronavirus e 19 pipistrelli sono risultati positivi con una prevalenza del 42 %.

I campioni provenivano da (**Appendice 1 e Figura 5**): 10 dall'Emilia Romagna, provincia di Modena, sito A; 3 dal Piemonte, provincia di Cuneo, sito E; 3 dall'Emilia Romagna, provincia di Piacenza, siti G e H; 3 dalla Liguria, provincia di Savona, sito F.

La quantificazione del virus nei campioni positivi ha dato valori bassi, compresi tra 10^0 e 10^2 , che possono essere dovuti alla diluizione del materiale fecale di partenza durante la procedura di estrazione. L'analisi della curva di melting mostra per ogni campione fecale positivo, un picco singolo compreso tra 83,0 e 84,0 °C. La differenza nei valori della temperatura di melting tra lo standard plasmidico (83,3 °C) ed i diversi campioni fecali è probabilmente la conseguenza di mutazioni nucleotidiche presenti nella sequenza target amplificata durante la reazione.

I prodotti della reazione di real-time PCR sono stati testati mediante elettroforesi su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard TAE buffer ed una chiara e ben definita banda specifica di approssimativamente 168 bp è stata visualizzata con luce UV per tutti i replicati dei campioni risultati positivi (**Figura 13**).

Figura 13: Elettroforesi dei prodotti di real-time PCR su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: amplificati dei campioni di pipistrello risultati positivi con la metodica messa a punto.



Le bande specifiche di circa 168 bp sono state visualizzate per tutti i replicati dei campioni rilevati positivi. Nella figura sono riportate le tre ripetizioni di cinque degli 11 campioni di pipistrelli positivi appartenenti all'area A (San Cesario sul Panaro, MO).

PI: prodotto della diluizione plasmidica con concentrazione 1×10^4 copie/ μ L. 1, 2, 3, 4, 5: prodotti ottenuti da cinque campioni positivi appartenenti all'area di campionamento A, ognuno ripetuto tre volte.

I.3.3. Sequenziamento ed analisi di un tratto del gene Pol (ORF1a,b) dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello

I 21 campioni fecali di pipistrello risultati positivi per coronavirus negli screening precedenti sono stati amplificati mediante eminested RT-PCR specifica per un tratto altamente conservato del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) dei SARS-related coronavirus e sei (771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5) hanno originato ampliconi della lunghezza attesa di 446 bp. Mediante nested RT-PCR, specifica per lo stesso tratto altamente conservato del gene RdRp di tutti i coronavirus dell'ex gruppo 2, sono stati amplificati altri 2 campioni (893/09-75 e 1028/09-13), oltre ai sei precedenti, ottenendo prodotti della lunghezza attesa di 463 bp.

Il prolungamento in direzione 5' delle sequenze del frammento del gene RdRp ha permesso di ottenere dei prodotti di PCR della lunghezza di 618 bp da 6 campioni (771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5), mentre per i restanti due (893/09-68 e 893/09-75) non è stato ottenuto il prodotto atteso.

L'analisi eseguita con l'interfaccia web di BLAST ha confermato per tutte le sequenze ottenute, ad eccezione di quelle del campione 1103/09-5, un'elevata percentuale di similarità con i ceppi di referenza di *Betacoronavirus*, in particolare con il ceppo Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 (GU190215).

L'assemblaggio effettuato con il programma DNASTAR Lasergene 7 ha permesso di ottenere per i campioni 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21 e 1103/09-4 delle sequenze di lunghezza complessiva di 917 bp, mentre per i campioni 893/09-68 e 893/09-75 le sequenze erano rispettivamente di lunghezza 367 e 393 bp.

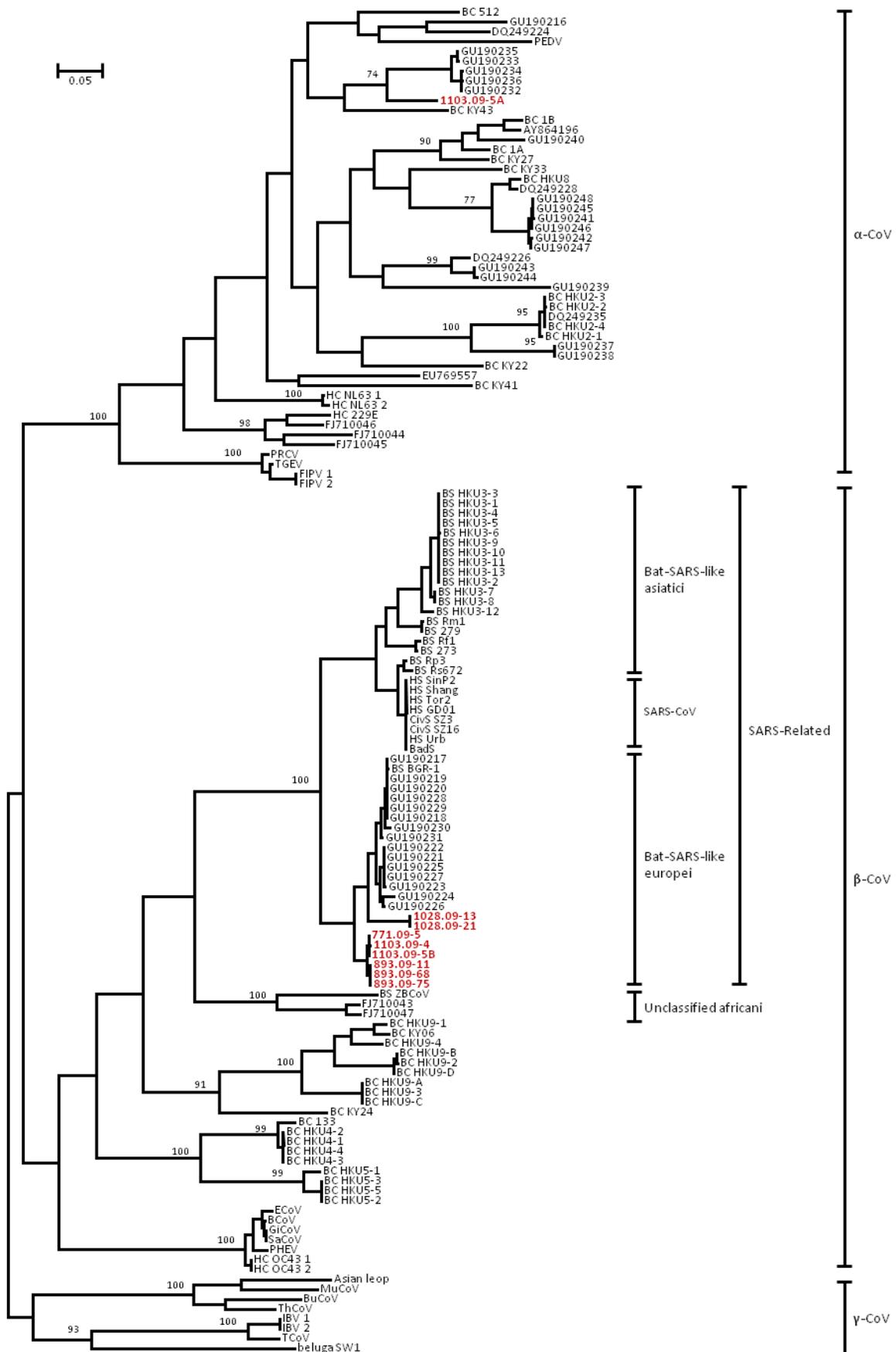
Diversamente, due sequenze ottenute dal campione 1103/09-5 mostravano nell'analisi eseguita con BLAST, come tutti gli altri campioni, un'elevata similitudine con ceppi di riferimento di *Betacoronavirus* (in particolare con il ceppo Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, GU190215). Mentre, una sequenza di 425 bp, presentava elevata similitudine con ceppi di riferimento di coronavirus non classificati o appartenenti agli *Alphacoronavirus* (in particolare Bat coronavirus A1201/2005, DQ648800; Bat coronavirus A1203/2005, DQ648801; Bat coronavirus HKU6, DQ249224; Bat coronavirus Trinidad/1FY2BA/2007, EU769557). L'assemblaggio delle prime due ha originato una sequenza completa di 917 bp, denominata 1103/09-5B, mentre la sequenza di 425 bp non identificata come *Betacoronavirus* è stata denominata 1103/09-5A.

Le percentuali di identità sono state calcolate su due allineamenti. Il primo allineamento era formato da sequenze nucleotidiche della lunghezza di 816 bp (come proposto da Drexler et al. [13]) e comprendeva le sequenze complete di 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5B, insieme a 128 sequenze di ceppi di riferimento della famiglia *Coronaviridae*. Il secondo allineamento invece era formato da sequenze nucleotidiche della lunghezza di 331 bp in modo da poter includere tutte le sequenze ottenute, comprese quelle incomplete di 893/09-68, 893/09-75 e 1103/09-5A, insieme a sequenze di riferimento di breve lunghezza.

Dall'analisi eseguita sul frammento di 816 bp è risultata, per i campioni 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4, 1103/09-5B, una elevata identità nei confronti dei SARS-related coronavirus del genere *Betacoronavirus*. Nel dettaglio, è stata calcolata un'identità compresa tra il 60 ed il 66% con tutti gli *Alphacoronavirus*, dal 62 al 67% con i *Gammacoronavirus*, del 67-68% con i *Betacoronavirus* non correlati al virus della SARS e non identificati in pipistrelli, del 69-71% con i *Betacoronavirus* identificati in pipistrelli ma non correlati al virus della SARS, dell'87-88% con i SARS-CoV umani ed animali, dell'86-88% con i Bat-SARS-like coronavirus asiatici, del 94-95% con i SARS-like coronavirus identificati in pipistrelli del genere *Rhinolophus* da Drexler et al. in Bulgaria [13] e del 72-73% con i ceppi di coronavirus identificati in Africa in specie di pipistrelli non appartenenti al genere *Rhinolophus* ma al genere *Hipposideros* (Zaria bat coronavirus ZBCoV, HQ166910; Bat coronavirus Hipposideros/GhanaBoo/348/2008, FJ710043; Bat coronavirus Hipposideros/GhanaKwam/20/2008, FJ710047).

Inoltre, sulla base dell'identità di sequenza, è stato possibile suddividere i sei campioni italiani in due gruppi, uno formato dai ceppi 771/09-5, 893/09-11, 1103/09-4 e 1103/09-5B e l'altro dai ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21, in quanto caratterizzati da una identità maggiore del 99% all'interno dei due gruppi e del 93% nel confronto tra i gruppi.

Figura 14: Relazioni filogenetiche elaborate su un frammento di 816 bp del gene RdRp dei ceppi di coronavirus.



L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della massima probabilità utilizzando le sequenze aminoacidiche del frammento di 816 bp del gene RdRp ottenute nel presente studio e con 128 ceppi di referenza della famiglia *Coronaviridae* ottenute dal database di GenBank. Nell'analisi sono stati inclusi anche i ceppi (893/09-68, 893/09-75 e 1103/09-5A) di cui era disponibile una sequenza incompleta del gene RdRp. I valori di bootstrap $\geq 70\%$, calcolati su 1.000 replicati, sono riportati al fianco del ramo corrispondente.

I ceppi di referenza disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica per i quali è disponibile l'intero genoma sono indicati da un acronimo mentre quelli per i quali è presente solo una porzione del genoma sono indicati dal codice d'accesso di GenBank:

Alphacoronavirus: BC 512 (DQ648858), HKU2-1 (EF203064), HKU2-2 (EF203065), HKU2-3 (EF203066), HKU2-4 (EF203067), BC 1B (EU420137), BC 1A (EU420138), BC HKU8 (EU420139), BC KY43 (HQ728480), BC KY41 (HQ728481), BC KY27 (HQ728484), BC KY33 (HQ728485), BC KY22 (HQ728486), HCoV-229E (AF304460), HC NL63 1 (AY567487), HC NL63 2 (AY518894), PEDV (AF353511), FIPV 1 (AY994055), FIPV 2 (DQ010921), PRCV (DQ811787), TGEV (DQ811789), AY864196, DQ249224, DQ249226, DQ249228, DQ249235, GU190216, GU190232, GU190233, GU190234, GU190235, GU190236, GU190237, GU190238, GU190239, GU190240, GU190241, GU190242, GU190243, GU190244, GU190245, GU190246, GU190247, GU190248, EU769557.

Betacoronavirus: HS Shang (AY463060), HS Urb (AY278741), HS Tor2 (AY274119), HS GD01 (AY278489), HS SinP2 (AY559089), CivS SZ3 (AY304486), CivS SZ16 (AY304488), BadS (AY545919), BS Rp3 (DQ071615), BS HKU3-1 (DQ022305), BS HKU3-2 (DQ084199), BS HKU3-3 (DQ084200), BS HKU3-4 (GQ153539), BS HKU3-5 (GQ153540), BS HKU3-6 (GQ153541), BS HKU3-7 (GQ153542), BS HKU3-8 (GQ153543), BS HKU3-9 (GQ153544), BS HKU3-10 (GQ153545), BS HKU3-11 (GQ153546), BS HKU3-12 (GQ153547), BS HKU3-13 (GQ153548), BS Rf1 (DQ412042), BS Rm1 (DQ412043), BS 273 (DQ648856), BS 279 (DQ648857), BS Rs672 (FJ588686), BS BGR-1 (GU190215), BC 133 (DQ648794), BC HKU4-1 (EF065505), BC HKU4-2 (EF065506), BC HKU4-3 (EF065507), BC HKU4-4 (EF065508), BC HKU5-1 (EF065509), BC HKU5-2 (EF065510), BC HKU5-3 (EF065511), BC HKU5-5 (EF065512), BC HKU9-1 (EF065513), BC HKU9-2 (EF065514), BC HKU9-3 (EF065515), BC HKU9-4 (EF065516), BC HKU9-A (HM211098), BC HKU9-B (HM211099), BC HKU9-C (HM211100), BC HKU9-D (HM211101), BS ZBCoV (HQ166910), BC KY24 (HQ728482), BC KY06 (HQ728483), BCoV (AF391541), HC OC43 1 (AY391777), HC OC43 2 (AY585229), PHEV (DQ011855), ECoV (EF446615), SaCoV (EF424621), GiCoV (EF424622), GU190217, GU190218, GU190219, GU190220, GU190221, GU190222, GU190223, GU190224, GU190225, GU190226, GU190227, GU190228, GU190229, GU190230, GU190231.

Gammacoronavirus: IBV 1 (M95169), IBV 2 (AJ311317), TCoV (EU095850), beluga SW1 (EU111742), BuCoV (FJ376620), ThCoV (FJ376621), MuCoV (FJ376622).

Non classificati: Asian leopard (EF584908), FJ710043, FJ710044, FJ710045, FJ710046, FJ710047.

Estendendo l'analisi anche alle sequenze più brevi, è stata rilevata una identità superiore al 99% dei campioni 893/09-68 e 893/09-75 con i ceppi 771/09-5, 893/09-11, 1103/09-4 e 1103/09-5B e del 92% con i ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21, evidenziandone quindi l'appartenenza al primo gruppo. La sequenza 1103/09-5A manifestava invece un comportamento completamente differente, mostrando una identità particolarmente elevata con gli *Alphacoronavirus*. Nel dettaglio, la sequenza 1103/09-5A aveva una percentuale d'identità del 52-53% con i *Betacoronavirus* non correlati al virus della SARS e non identificati in pipistrelli, del 52-61% con i *Gammacoronavirus*, del 56-58% con i SARS-CoV umani ed animali, del 56-61% con i *Betacoronavirus* identificati in pipistrelli ma non correlati al virus della SARS, del 67-71% con gli *Alphacoronavirus* non identificati nei pipistrelli e dal 70 all'86% con gli *Alphacoronavirus* identificati nei pipistrelli. La maggior percentuale di identità, del 82-86%, è stata rilevata nei confronti degli *Alphacoronavirus* identificati in pipistrelli europei ed africani, appartenenti al genere *Rhinolophus* ma non solo (GU190232, GU190233, GU190234, GU190235, GU190236, HQ728480, GU065387, GU065401, GU065402, GU065403, GU065413, GU065414, GU065415, GU065417, GU065418, GU065419, GU065423, GU065425, GU065427).

Tra i ceppi identificati nello studio, la sequenza 1103/09-5A veniva quindi a formare un terzo gruppo a se stante, mostrando una identità del 57% con i ceppi appartenenti agli altri due gruppi.

L'allineamento eseguito sulle sequenze di 331 bp ha inoltre permesso di confrontare un maggior numero di brevi sequenze di coronavirus dei pipistrelli disponibili nel database di GenBank, rilevando un'identità dell'83-84% dei ceppi 771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5B con i coronavirus identificati in *Rhinolophus hipposideros* da Rhitaric et al. in Slovenia (Bat coronavirus SLO1A0066/2008/SVN, GQ404795; Bat coronavirus SLO1A0050/2008/SVN, GQ404796; Bat coronavirus SLO1A0082/2008/SVN, GQ404797) [20]. La sequenza 1103/09-5A ha invece mostrato una identità del 74% con il Bat coronavirus N78-10/Germany/2008 (HM368166) identificato in *Myotis myotis* in Germania [75], del 73-76% con gli *Alphacoronavirus* identificati da Falcon et al. in Spagna [26] e del 74-77% con gli *Alphacoronavirus* identificati da Gloza-Rausch et al. in Germania [76].

L'albero filogenetico ottenuto con le sequenze aminoacidiche di 816 bp del gene RdRp (**Figura 14**) mostrava una netta suddivisione tra i tre generi che compongono la famiglia *Coronaviridae*. I ceppi 771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5B si presentavano raggruppati insieme ai SARS-related coronavirus. Il gruppo dei SARS-related coronavirus era suddiviso in due cluster, uno composto dai SARS-CoV e dai Bat-SARS-like coronavirus identificati in pipistrelli del genere *Rhinolophus* in Asia, mentre l'altro era composto dai Bat-SARS-like coronavirus europei, identificati in pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus* in Italia e in Bulgaria [13]. In particolare si può notare che i ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21 si presentavano correlati maggiormente ai ceppi bulgari mentre, i restanti ceppi (771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1103/09-4 e 1103/09-5B), formavano un raggruppamento separato e filogeneticamente divergente rispetto agli altri ceppi europei.

Al contrario, la sequenza 1103/09-5A, si raggruppava tra gli *Alphacoronavirus* insieme ad altri ceppi identificati in pipistrelli europei ed africani.

I.3.4. Sequenziamento ed analisi della porzione 3' del genoma dei Bat-SARS-like CoV identificati nei campioni fecali di pipistrello

Il sequenziamento mediante primer-walking della regione 3' del genoma dei coronavirus identificati nei campioni fecali di pipistrello ha permesso di ottenere sequenze nucleotidiche complete delle dimensioni di:

- 8163 bp per il campione 771/09-5,
- 8181 bp per il campione 893/09-11,
- 8150 bp per il campione 1028/09-13,
- 8211 bp per il campione 1028/09-21,
- 8183 bp per il campione 1103/09-4.

Per il campione 1103/09-5 non è stato invece possibile assemblare in una unica sequenza i diversi ampliconi ottenuti a causa della notevole variabilità nucleotidica presente tra le sequenze dei diversi prodotti di PCR. Inoltre, alcune delle sequenze ottenute per questo campione mostravano numerose ambiguità, dovute alla concomitante presenza di diversi coronavirus geneticamente distinti all'interno del medesimo ospite.

L'allineamento delle sequenze complete della porzione 3' del genoma dei campioni 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4, con 27 sequenze di referenza ha messo in evidenza una identità del 70-71% con i SARS-related coronavirus, ad eccezione del ceppo europeo Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 (GU190215), con il quale mostravano una identità dell'81%. Inoltre, come osservato in precedenza per il gene RdRp, è stato possibile suddividere sulla base dell'identità di sequenza i campioni analizzati in due gruppi, uno formato dai ceppi 771/09-5, 893/09-11 e 1103/09-4 e l'altro dai ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21, in quanto caratterizzati da una identità maggiore del 98% all'interno dei due gruppi e del 94% nel confronto tra i gruppi.

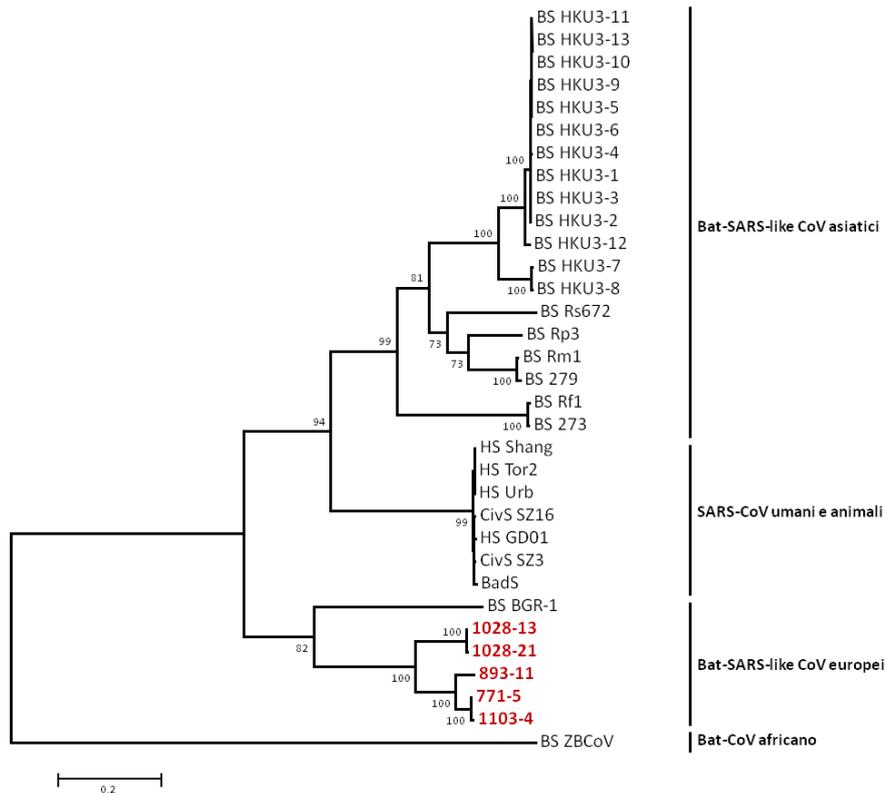
Analizzando singolarmente i diversi geni che compongono questo tratto del genoma virale (ORF2 o gene S, ORF3, ORF4 o gene E, ORF5 o gene M, ORF6, ORF7a,b, ORF8 ed ORF9 o gene N), è stato possibile riscontrare numerose differenze che distinguevano i virus italiani dai SARS-CoV, dai Bat-SARS-like CoV asiatici ed in alcuni casi anche dal ceppo europeo a cui erano più strettamente correlati.

I ceppi italiani mostravano per il gene S una identità del 77% con il Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 ed entrambi possedevano una identità del 70% con i SARS-CoV. Diversamente, i Bat-SARS-like coronavirus asiatici mostravano una identità del 74-76% con i SARS-CoV quindi, il gene S dei ceppi asiatici, appariva più simile a quello dei SARS-CoV di quanto non fosse per i ceppi europei. Valutando però il solo dominio di legame al recettore (RBD), compreso tra gli aminoacidi 319-518 della proteina S dei SARS-CoV, si evidenziava una maggior similitudine dei ceppi italiani con i SARS-CoV. Per questo dominio, l'identità dei ceppi italiani con i SARS-CoV era del 66-67%, contro l'identità del 65% tra i ceppi asiatici e i SARS-CoV. Lo stesso era ancora più evidente comparando il motivo di legame al recettore (RBM), compreso tra gli aminoacidi 424 e 495 della proteina S dei SARS-CoV, mostrando una identità del 52-54% tra i ceppi italiani e SARS-CoV e del 41-42% tra i ceppi asiatici e SARS-CoV. Una simile osservazione era già stata riportata anche per il ceppo Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008 [13], facendo supporre un comportamento simile per tutti i ceppi europei.

L'albero filogenetico ottenuto con le sequenze di tutto il gene S evidenziava rapporti molto simili a quelli visibili nell'albero costruito con le sequenze del gene RdRp (**Figura 15**). Anche in questo caso, il gruppo dei SARS-related coronavirus risultava suddiviso in due cluster, uno composto dai SARS-CoV e dai Bat-SARS-like coronavirus identificati in pipistrelli del genere *Rhinolophus* in Asia e l'altro dai Bat-SARS-like coronavirus identificati in pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus* in Europa. A differenza dell'albero costruito con le sequenze del gene RdRp, il cluster dei ceppi europei si presentava però nettamente separato tra il ceppo bulgaro BM48-31/BGR/2008 ed i ceppi

italiani, con questi ultimi suddivisi a loro volta in due sottogruppi, uno comprendente i ceppi 771/09-5, 893/09-11 e 1103/09-4 ed uno i ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21.

Figura 15: Relazioni filogenetiche elaborate sul gene S dei ceppi di SARS-related coronavirus.



L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della massima probabilità utilizzando le sequenze aminoacidiche del gene S ottenute nel presente studio insieme con 27 ceppi di riferimento del gruppo dei SARS-related coronavirus e ad un ceppo di riferimento africano che presenta elevate analogie con questo gruppo, ottenute dal database di GenBank. I valori di bootstrap $\geq 70\%$, calcolati su 1.000 repliche, sono riportati al fianco del ramo corrispondente.

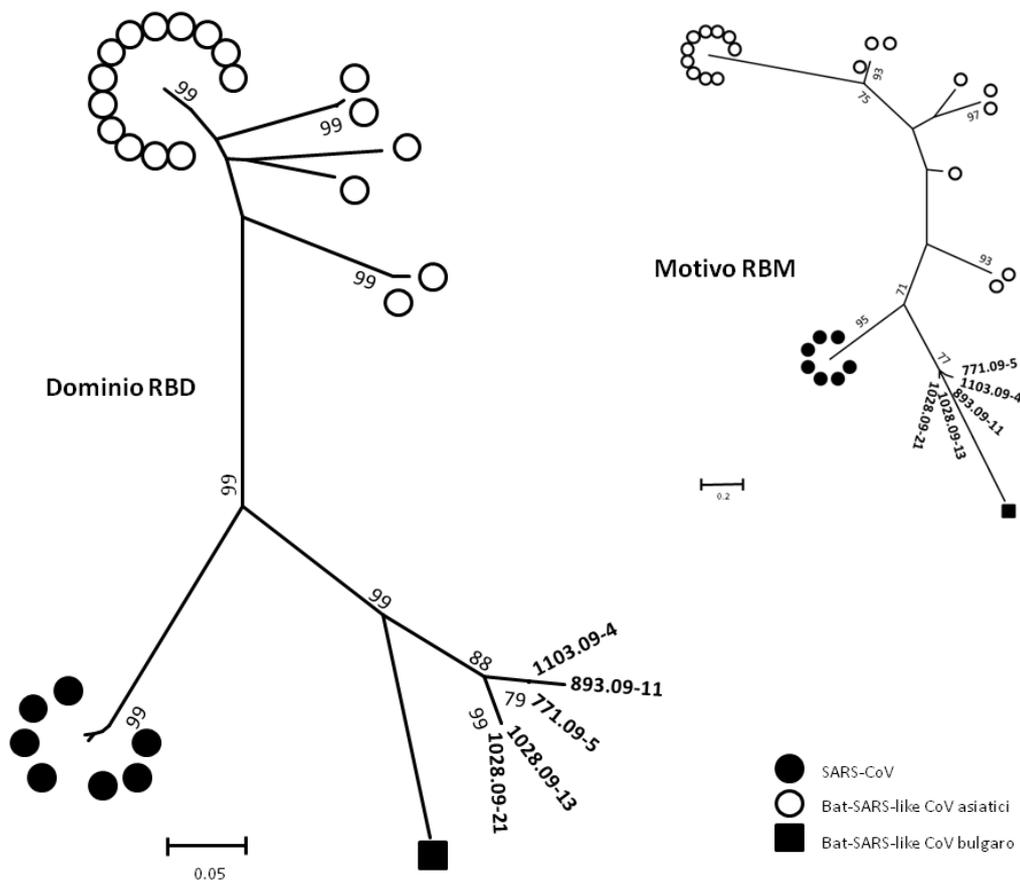
Ceppi di riferimento di *Betacoronavirus* disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica: HS Shang (AY463060), HS Urb (AY278741), HS Tor2 (AY274119), HS GD01 (AY278489), CivS SZ3 (AY304486), CivS SZ16 (AY304488), BadS (AY545919), BS Rp3 (DQ071615), BS HKU3-1 (DQ022305), BS HKU3-2 (DQ084199), BS HKU3-3 (DQ084200), BS HKU3-4 (GQ153539), BS HKU3-5 (GQ153540), BS HKU3-6 (GQ153541), BS HKU3-7 (GQ153542), BS HKU3-8 (GQ153543), BS HKU3-9 (GQ153544), BS HKU3-10 (GQ153545), BS HKU3-11 (GQ153546), BS HKU3-12 (GQ153547), BS HKU3-13 (GQ153548), BS Rf1 (DQ412042), BS Rm1 (DQ412043), BS 273 (DQ648856), BS 279 (DQ648857), BS Rs672 (FJ588686), BS BGR-1 (GU190215), BS ZBCoV (HQ166910).

I rapporti tra i diversi SARS-related coronavirus appaiono modificati negli alberi costruiti rispettivamente sulla base degli allineamenti riguardanti il dominio funzionale di legame al recettore (RBD), responsabile del legame tra la proteina S ed il recettore cellulare, ed il motivo RBM in esso contenuto (**Figura 16**). Dall'analisi di questi due

importanti tratti funzionali del gene S risultava infatti una relazione più stretta dei SARS-CoV con i Bat-SARS-like CoV europei rispetto a quella mostrata con i ceppi asiatici.

Nei ceppi italiani, come nella maggior parte dei Bat-SARS-like coronavirus, era presente un unico ORF3. L'ORF3b, che nei SARS-CoV è composto da 154 aminoacidi ed ha la funzione di contrastare l'interferone di tipo I, si interrompeva dopo soli 22 aminoacidi nei ceppi 771/09-5, 893/09-11 e 1103/9-4 e dopo 26 aminoacidi nei ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21. Curiosamente, anche il ceppo BM48-31/BGR/2008 presenta una precoce interruzione della proteina 3b, che però avviene dopo l'aminoacido 115.

Figura 16: Relazioni filogenetiche elaborate sul dominio RBD ed il motivo RBM del gene S dei ceppi di SARS-related coronavirus.



L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della massima probabilità utilizzando le sequenze aminoacidiche del dominio RBD e del motivo RBM del gene S ottenute nel presente studio insieme con 27 ceppi di referenza del gruppo dei SARS-related coronavirus ottenute dal database di GenBank. I valori di bootstrap $\geq 70\%$, calcolati su 1.000 replicati, sono riportati al fianco del ramo corrispondente.

Ceppi di referenza di *Betacoronavirus* disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica: SARS-CoV (AY463060, AY278741, AY274119, AY278489, AY304486, AY304488, AY545919); Bat-SARS-like CoV asiatici (DQ071615, DQ022305, DQ084199, DQ084200, GQ153539, GQ153540, GQ153541, GQ153542, GQ153543, GQ153544, GQ153545, GQ153546, GQ153547, GQ153548, DQ412042, DQ412043, DQ648856, DQ648857, FJ588686); Bat-SARS-like CoV bulgaro (GU190215); Bat-SARS-like CoV italiani (771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21 e 1103/09-4).

Nel confronto con gli altri SARS-related coronavirus, l'ORF5 o gene M si presentava della stessa lunghezza (666 nt) e notevolmente conservato (identità > 84%), ad eccezione del ceppo BM48-31/BGR/2008 che presenta una inserzione di 6 aminoacidi nella porzione iniziale della proteina.

L'ORF6 dei ceppi italiani risultava invece notevolmente diverso rispetto agli altri SARS-related coronavirus, mostrando una identità del 67-69%. Faceva eccezione il ceppo BM48-31/BGR/2008 che, pur essendo l'unico a presentare la delezione di un aminoacido nella estremità C-terminale della proteina, possedeva una identità del 72-74% con i ceppi identificati.

Nel confronto tra i ceppi identificati in Italia ed i virus appartenenti al gruppo dei SARS-related coronavirus, anche gli ORF7a e 7b mostravano una notevole variabilità. L'ORF7a dei ceppi italiani presentava una identità nettamente superiore con il ceppo BM48-31/BGR/2008 (76%), rispetto che con gli altri SARS-related (63-65%). Inoltre, sia i ceppi identificati in questo studio che il ceppo bulgaro, presentavano una delezione di 4 aminoacidi in questa proteina.

L'ORF7b nei SARS-CoV e nei Bat-SARS-like coronavirus asiatici ha una lunghezza di 135 nt per 44 aa, mentre nel ceppo BM48-31/BGR/2008 ha una lunghezza di 123 nt per 40 aa. Nei ceppi italiani questo ORF era caratterizzato da notevoli variazioni tra i diversi ceppi: nei ceppi 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13 e 1028/09-21 aveva una lunghezza di 132 nt per 43 aa e nel ceppo 1103/9-4 aveva una lunghezza di 111 nt per 36 aa a causa della delezione di un nucleotide nella porzione terminale del gene che ne alterava il codice di traduzione. Queste differenze determinavano una identità del 57-62% tra i ceppi italiani ed i SARS-related CoV e del 84-85% tra i ceppi italiani ed il ceppo bulgaro. Fa eccezione il ceppo 1103/9-4 che mostrava identità più basse di 3-5 punti percentuali.

Infine, in tutti i ceppi identificati in Italia, così come già riportato per il ceppo bulgaro [13], mancava completamente l'ORF8, a cui era stato imputato un ruolo importante nell'adattamento del virus all'ospite umano [11, 87].

I geni che codificano per le proteine E ed N erano invece caratterizzati da un elevato grado di conservazione mostrando, nel confronto con gli altri SARS-related coronavirus, identità prossime o superiori all'80%.

I.4. Discussione

Nel presente studio è stata indagata la presenza di coronavirus nella popolazione italiana di pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum*, con particolare attenzione alla presenza di virus correlati geneticamente al SARS-CoV, e sono state studiate le caratteristiche molecolari di alcuni ceppi identificati per valutare il processo evolutivo che ne ha caratterizzato la diffusione in Europa.

Fino ad ora, la maggior parte delle indagini volte a ricercare l'infezione da coronavirus nei pipistrelli di tutto il mondo si è avvalsa, per lo screening iniziale dei campioni fecali, di metodiche tradizionali di biologia molecolare quali la reverse transcription-PCR (RT-PCR). Tale metodica è stata utilizzata per una prima indagine svolta su campioni fecali e tamponi rettali di *Rhinolophus ferrumequinum* prelevati sul territorio nazionale nel 2009, permettendo di effettuare il primo ritrovamento in Italia di coronavirus infettanti i pipistrelli (**PUBBLICAZIONE 1**). La prevalenza di infezione rilevata è stata del 3,8% (2 positivi su 52 campioni testati). Entrambi i campioni risultati positivi erano campioni fecali e l'assenza di risultati positivi nei tamponi rettali testati è possibilmente dovuta alla scarsa quantità di materiale fecale raccolto con questo metodo, troppo bassa per rilevare il materiale genetico virale con una metodica di PCR.

Dai valori di identità nucleotidica, calcolata comparando la sequenza del campione 893/09-11 con diverse sequenze di riferimento appartenenti alla famiglia *Coronaviridae*, e dall'albero filogenetico costruito con queste sequenze, è possibile assumere che il ceppo di coronavirus identificato nei pipistrelli italiani abbia una relazione più stretta con i coronavirus correlati al virus della SARS (SARS-CoV umani ed animali e Bat-SARS-like CoV) appartenenti al genere *Betacoronavirus*, piuttosto che con tutti gli altri coronavirus dei mammiferi. Questi risultati sono comparabili a quanto ottenuto in altri paesi europei, quali Slovenia [20] e Bulgaria [13].

La prevalenza di infezione da coronavirus rilevata (3,8%) appare più bassa di quanto riscontrato in Asia [16, 17] o in altri paesi europei [13], dove normalmente ha valori superiori al 10%, raggiungendo anche il 30-40% per particolari specie di pipistrelli o aree geografiche.

Questo basso numero di positività riscontrate, può essere realmente dovuto ad una bassa prevalenza di infezione da CoV nei pipistrelli in Italia, come conseguenza per esempio di condizioni climatiche o geografiche tipiche dell'area mediterranea che, influenzando il comportamento sociale dei pipistrelli, riducono gli spostamenti ed il contatto tra individui diversi, portando ad una minore trasmissione e circolazione dei virus. Al contrario, il basso numero di pipistrelli riscontrati infetti da CoV, può essere dovuto ad una scarsa quantità di RNA virale nei campioni fecali, ad una scarsa sensibilità della metodica diagnostica utilizzata o ad un appaiamento non ottimale dei primer utilizzati per l'RT-PCR con i tratti complementari del genoma di coronavirus potenzialmente molto divergenti.

La PCR convenzionale, in comparazione con altre tecniche di analisi, possiede spesso un limite di detection più alto e quindi una minor sensibilità. Tale limite può portare ad una sottostima della reale prevalenza di infezione e ad una alterata valutazione del ruolo epidemiologico dei pipistrelli nell'ecologia virale, non rilevando il coronavirus in una parte di popolazione composta da soggetti cronicamente o persistentemente infetti. Questi soggetti, pur possedendo una bassa carica virale, sono comunque importanti per la trasmissione, il mantenimento e l'evoluzione del virus nell'ambiente.

In considerazione di questo, è stata messa a punto una metodica di SYBR Green real-time PCR specifica per i SARS-related coronavirus, allo scopo di avere uno strumento diagnostico più sensibile da utilizzare nello screening iniziale dei campioni fecali di pipistrello (**PUBBLICAZIONE 2**).

Dalle prove effettuate, la metodica messa a punto si è dimostrata capace di rilevare minime concentrazioni di virus e, allo stesso tempo, presentava ottimi valori di efficienza e linearità, associati a basse variazioni sia intra- che inter- reazione. Quindi, in considerazione della sua estrema sensibilità e riproducibilità, questa rapida e robusta tecnica può rappresentare un metodo alternativo di diagnosi per la ricerca di Bat-SARS-like CoV nelle indagini epidemiologiche, soprattutto per lo screening di campioni fecali di pipistrelli contenenti basse quantità di virus.

La metodica di SYBR Green real-time PCR è stata utilizzata per compiere una seconda indagine su campioni fecali di *Rhinolophus ferrumequinum* prelevati sul territorio nazionale nel 2009. Tale indagine ha permesso di rilevare una prevalenza di infezione del 42% (19 positivi su 45 campioni testati) con una carica virale nei campioni positivi compresa tra 10^0 e 10^2 copie/ μ l di RNA estratto. Drexler et al., che in Bulgaria hanno riscontrato mediante tecniche di PCR tradizionale una prevalenza d'infezione da coronavirus nei pipistrelli del 26% [13], sono gli unici autori che hanno già applicato una metodica di real-time PCR su feci di pipistrello in Europa, rilevando una quantità virale che arrivava fino a 10^8 copie/gr di feci. La prevalenza di infezione da coronavirus rilevata nei pipistrelli italiani appare più alta di quanto riscontrato in Bulgaria. Non è però possibile fare paragoni riguardo la diversa quantità di virus riscontrata nei campioni fecali testati in quanto le feci dei pipistrelli italiani sono state inizialmente diluite senza essere pesate.

La prevalenza di infezione da coronavirus rilevata in Italia con la metodica di real-time PCR (**PUBBLICAZIONE 2**) risulta molto superiore a quella riscontrata con la metodica di RT-PCR (**PUBBLICAZIONE 1**). Questa divergenza, essendo le due indagini condotte su campioni fecali appartenenti a gruppi diversi di pipistrelli (appartenenti entrambi alla specie *R. ferrumequinum*) provenienti da aree geografiche differenti, può essere dovuta ad una reale differenza nella prevalenza di infezione tra popolazioni diverse, ma anche la conseguenza del diverso metodo diagnostico utilizzato. Se la convenzionale metodica qualitativa di RT-PCR permette di sequenziare direttamente il prodotto ottenuto e quindi di caratterizzare geneticamente il virus identificato, la metodica qualitativa di real-time PCR consente, data la maggior sensibilità, di rilevare piccole quantità del genoma target dando una previsione più

realistica della prevalenza d'infezione. In definitiva, quindi, un approccio combinato con le due tecniche potrebbe fornire informazioni rilevanti e più complete della situazione epidemiologica dell'infezione da coronavirus nei pipistrelli.

L'amplificazione del gene RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) ha permesso di ottenere le sequenze di alcuni dei campioni riscontrati positivi in RT-PCR e real-time PCR: 771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5. Analizzando le sequenze ottenute per il campione 1103/09-5, proveniente dall'area di campionamento F (Giovo, SV, vedi **Appendice 1** e **Figura 5**), è emersa la presenza di una coinfezione da due coronavirus geneticamente diversi ed appartenenti rispettivamente al genere *Alphacoronavirus* (1103/09-5A) ed al genere *Betacoronavirus* (1103/09-5B). La presenza di più coronavirus nello stesso soggetto è stata riportata con una certa frequenza nei pipistrelli; sono state infatti riscontrate coinfezioni da diversi *Alphacoronavirus* in *Miniopterus* spp. [121], da diversi *Betacoronavirus* in *Rousettus leschenaulti* [122] e da *Alpha-* e *Betacoronavirus* insieme nei *Rhinolophus* spp. [13]. Le infezioni multiple sono eventi indispensabili per l'insorgenza dei fenomeni di ricombinazione che sono stati frequentemente chiamati in causa nell'evoluzione del gruppo dei SARS-related coronavirus e nell'origine dell'agente eziologico della SARS [15, 127, 128]. Il ritrovamento di coinfezioni riguardanti virus strettamente correlati al SARS-CoV nei *Rhinolophus* spp. avvalorano l'ipotesi che questo genere di pipistrelli possa rappresentare il serbatoio animale da cui il virus umano ha avuto origine.

L'analisi delle sequenze ottenute del gene RdRp, ha evidenziato una stretta correlazione dei ceppi 771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1028/09-13, 1028/09-21, 1103/09-4 e 1103/09-5B con i SARS-related coronavirus ed in particolare con i ceppi di Bat-SARS-like CoV identificati in alcune specie di *Rhinolophus* in Bulgaria [13]. La correlazione è risultata invece inferiore con i Bat-SARS-like CoV identificati nei *Rhinolophus* spp. in Asia ed in Slovenia (Bat coronavirus SLO1A0066/2008/SVN, GQ404795; Bat coronavirus SLO1A0050/2008/SVN, GQ404796; Bat coronavirus SLO1A0082/2008/SVN, GQ404797) [20], suggerendo la presenza in Europa di diverse popolazioni virali, caratterizzate da distinte localizzazioni geografiche, probabilmente dovute alla segregazione delle diverse colonie di pipistrelli.

Una osservazione simile può essere fatta anche per gli *Alphacoronavirus* infettanti i pipistrelli. Infatti, nel confronto con i diversi *Alphacoronavirus* identificati nei pipistrelli europei, il ceppo 1103/09-5A mostrava il maggior grado di correlazione genetica (86%) con gli *Alphacoronavirus* presenti in alcuni *Rhinolophus* campionati in Bulgaria [13] ed una correlazione inferiore, di circa dieci punti percentuali, con gli altri *Alphacoronavirus* sequenziati in diverse specie di pipistrelli compresi i rinolofi. Allo stesso tempo, è stato rilevato un elevato grado di correlazione (81-82%) del ceppo 1103/09-5A con alcuni *Alphacoronavirus* identificati in diverse specie di pipistrelli, non solo appartenenti al genere *Rhinolophus*, in Africa. Questi dati possono far supporre l'assenza di specie-specificità tra virus ed ospite, e che in passato ci possa essere stato un contatto tra le popolazioni di Chiroteri africane ed europee, con la migrazione del virus tra i due continenti.

Dallo studio eseguito, possono quindi essere distinti tre tipi virali diversi. I primi due, formati rispettivamente dai ceppi 771/09-5, 893/09-11, 893/09-68, 893/09-75, 1103/09-4 e 1103/09-5B e dai ceppi 1028/09-13 e 1028/09-21, erano SARS-related coronavirus e si raggruppavano filogeneticamente insieme agli altri Bat-SARS-like CoV europei, distinguendosi invece dai Bat-SARS-like CoV asiatici, con i quali mostravano una origine comune ma un percorso evolutivo indipendente. Il terzo tipo virale era invece rappresentato dal ceppo 1103/09-5A, identificato insieme al 1103/09-5B nel campione fecale dello stesso pipistrello, che apparteneva agli *Alphacoronavirus* ed era correlato filogeneticamente con altri ceppi europei ed africani. Risulta quindi evidente che in Italia, come già supposto per altri paesi europei, siano ampiamente diffusi nei *Rhinolophus* coronavirus strettamente correlati al virus della SARS. Inoltre, la popolazione europea di questi virus si distingue chiaramente da quella asiatica, con cui probabilmente condivide un'origine comune. Questa origine comune potrebbe essere ricercata in Africa, come ipotizzato da Quan et al. [19], dove alcuni coronavirus identificati in diverse specie di *Hipposideros* mostrano un notevole grado di correlazione al gruppo dei SARS-related CoV e si pongono, rispetto ad essi, in posizione ancestrale. Oppure, come proposto da Gouilh et al. [14], i Bat-SARS-like CoV dei *Rhinolophidae* e degli *Hipposideridae* potrebbero condividere una origine comune non ancora identificata a cui sarebbe seguito un percorso evolutivo indipendente nelle due famiglie di pipistrelli.

Il sequenziamento completo di tutti i geni che costituiscono la porzione 3' del genoma dei campioni 771/09-5, 893/09-11, 1028/09-13, 1028/09-21 e 1103/09-4 ha permesso di confermare una maggior similitudine dei ceppi italiani con il Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008, identificato anch'esso in Europa, e di approfondire le differenze esistenti a livello molecolare tra i ceppi ottenuti e gli altri SARS-related coronavirus.

Alcuni geni, codificanti per le proteine E, M ed N, presentavano un elevato grado di conservazione all'interno di tutto il gruppo dei SARS-related CoV, compresi i ceppi italiani. Al contrario, altri geni mostravano numerose differenze che permettono di distinguere i SARS-CoV dai Bat-SARS-like CoV e, tra questi, di differenziare i ceppi asiatici da quelli europei.

Il gene che codifica per la proteina dello spike è fondamentale per il legame al recettore cellulare e per la risposta immunitaria neutralizzante, svolgendo quindi un ruolo molto importante nell'infezione dell'ospite. Questo gene è caratterizzato da una notevole variabilità tra i diversi ceppi, conseguente alla forza selettiva agente su di esso nell'adattamento del virus all'ambiente. La capacità dei SARS-CoV di infettare l'uomo è dovuta al legame, mediato dal dominio RBD dalla proteina dello spike, che questi virus instaurano con il recettore ACE2 umano. Al contrario, i Bat-SARS-like coronavirus non sono in grado di legarsi a questo recettore quindi non possono infettare l'uomo, a meno che la proteina dello spike non acquisisca questa capacità [89]. A dispetto della minor identità manifestata dall'intero gene S dei SARS-CoV con i Bat-SARS-like CoV italiani, rispetto a quello dei ceppi asiatici, la similitudine mostrata a livello del dominio responsabile del legame al recettore (RBD), e del motivo RBM in esso contenuto, era molto più elevata tra i SARS-CoV ed i ceppi italiani. Questa maggiore correlazione, fa sì

che i Bat-SARS-like CoV italiani necessitano di un minor numero di mutazioni a livello del gene S per consentirgli di legarsi al recettore ACE2 umano e quindi li rende più propensi ad acquisire la capacità di infettare l'uomo.

Oltre al gene S, altre regioni del genoma virale mostravano numerose variazioni distintive per i ceppi identificati in Italia. Ad essere interessati da questa notevole variabilità erano soprattutto gli ORF che codificano per proteine non-strutturali cosiddette "accessorie" (ORF3, ORF6, ORF7a,b ed ORF8), i cui trascritti proteici svolgono funzioni non ancora del tutto chiarite ma per lo più ricondotte alla regolazione delle interazioni tra virus ed ospite durante l'infezione.

In particolare, in tutti i cinque ceppi sequenziati per questa porzione del genoma, si è evidenziata la totale assenza dell'ORF8. Questo ORF è stato oggetto di numerosi studi in quanto manifesta notevole variabilità e, negli Human-SARS-CoV identificati nelle fasi avanzate dell'epidemia, è sede di una caratteristica delezione di 29 nt che si è ipotizzato conseguire dall'adattamento all'ospite umano [87]. La totale assenza dell'ORF8 in tutti i ceppi italiani di Bat-SARS-like CoV, ma anche in tutti quelli europei fino ad ora sequenziati per questa regione, rende evidente che il suo trascritto proteico non è indispensabile al compimento del ciclo replicativo virale nei pipistrelli. Inoltre, la costante assenza dell'ORF8, insieme con l'elevata variabilità nucleotidica di alcuni geni e l'elevata similarità nel dominio RBD del gene S con i SARS-CoV piuttosto che con gli altri Bat-SARS-like CoV, suggerisce una possibile origine comune di tutti i ceppi europei ed una divergenza evolutiva con i ceppi presenti nel resto del mondo. Infatti, non essendo mai stati rinvenuti Bat-SARS-like CoV privi dell'ORF8 al di fuori dell'Europa e non essendo mai stati rinvenuti Bat-SARS-like CoV dotati di questo ORF in Europa, è presumibile l'assenza di contatti tra i ceppi virali infettanti i *Rhinolophus* spp. in Europa e quelli presenti in altri continenti, tra cui l'Asia.

In conclusione, il nostro lavoro fornisce importanti informazioni riguardanti la presenza di coronavirus, ed in particolare i coronavirus correlati all'agente eziologico della SARS, nei pipistrelli europei, confermando la diffusa relazione tra questi virus e numerose specie di pipistrelli, come riportato anche in Germania, Olanda, Slovenia, Bulgaria e Spagna [13, 20, 26, 75, 76, 79]. Lo studio dei Bat-SARS-like coronavirus italiani evidenzia caratteristiche molecolari distintive ed un processo evolutivo indipendente da quanto osservato in altri continenti, soprattutto con l'Asia, in cui ha avuto origine l'epidemia umana della SARS. Inoltre, il ritrovamento di coinfezioni tra coronavirus geneticamente molto distanti e la correlazione rilevata a livello del dominio della proteina dello spike responsabile del legame con il recettore cellulare, quindi del tropismo per l'ospite, tra i ceppi di Bat-SARS-like CoV italiani ed il virus della SARS, generano nuovi quesiti sul ruolo che i virus europei potrebbero aver svolto nella genesi del SARS-CoV e sulla possibilità che possano avvenire futuri salti di specie e nuovi eventi zoonotici.

Queste ipotesi necessitano di indagini più approfondite sulla popolazione europea di pipistrelli per acquisire maggiori informazioni in merito all'epidemiologia ed all'evoluzione dei Bat-SARS-like CoV in questo continente. La ricerca, dovrebbe inoltre

focalizzarsi maggiormente sulle specie di pipistrello appartenenti al genere *Rhinolophus* che, in Europa, sembrano essere gli unici ospiti di questi virus e sulla situazione epidemiologica dell'area mediterranea che potrebbe giocare un ruolo importante nell'evoluzione di questi virus.

SEZIONE II - Virus a DNA

Indagine sulla complessità genetica e le infezioni multiple
del parvovirus nel gatto

II.1. Introduzione

Il virus della panleucopenia felina (FPV), il virus prototipo dei parvovirus dei carnivori, è responsabile dell'omonima malattia, una patologia altamente contagiosa che colpisce i gatti e che è caratterizzata da una grave leucopenia, gastroenterite, disordini riproduttivi e sintomi nervosi [28].

Il FPV non è l'unica specie di parvovirus in grado di infettare il gatto; oltre al MEV anche le nuove varianti del parvovirus canino, il CPV-2a, il CPV-2b [30] ed il CPV-2c [129] hanno acquisito la capacità di infettare l'ospite felino causando una patologia indistinguibile dalla classica panleucopenia felina. In letteratura sono già stati riportati casi di infezioni di campo in gatti e felidi selvatici con il parvovirus canino [29], ma tuttora, il FPV, rimane la principale specie di parvovirus a causare malattia nei gatti [130]. Ulteriori indagini, svolte recentemente per caratterizzare a livello molecolare i ceppi di parvovirus identificati in gatti infettati naturalmente e con manifestazioni cliniche di gastroenterite, hanno rilevato una netta prevalenza del FPV, rispetto al CPV [129, 131]. Al contrario, è stato riportato per alcune regioni dell'Asia, una predominanza di più dell'80% del CPV negli isolati virali di gatti e felidi selvatici, ma l'esatto meccanismo che ha portato al prevalere delle infezioni da parvovirus canino rispetto a quello felino nei gatti di queste regioni resta tuttora oscuro [117].

Inoltre, poiché i gatti sono sensibili sia all'infezione da FPV che alle nuove varianti del CPV-2, sono possibili superinfezioni o coinfezioni con ceppi diversi di parvovirus che facilitano l'instaurarsi di popolazioni virali ad elevata complessità genetica e l'insorgenza di eventi di ricombinazione [33, 34, 35, 36].

Alla luce dell'importanza che i gatti rivestono come potenziale fonte di diversità genetica per i parvovirus e poiché il virus della panleucopenia felina sta riemergendo come principale causa di mortalità nei felini, 24 ceppi di parvovirus identificati in gatti con sintomatologia clinica riferibile a panleucopenia sono stati analizzati e caratterizzati geneticamente, valutando la diversità di sequenza e la complessità genetica del gene del capsidico VP2. Inoltre, per uno dei campioni analizzati, soggetto a coinfezione con due specie diverse di parvovirus, è stata valutata anche la diversità di sequenza del gene non strutturale NS1/2.

Dall'indagine eseguita è risultata una netta prevalenza di infezione nel gatto da FPV rispetto al CPV mentre i risultati più significativi ottenuti sono stati: il ritrovamento in un soggetto di una coinfezione da FPV e CPV-2a con la presenza di una variante di parvovirus che esibiva caratteristiche intermedie alle due specie virali ed il ritrovamento, in un altro gatto, di una popolazione di quasispecie virale appartenente alla nuova variante 2c del CPV-2.

II.2. Materiali e Metodi

II.2.1. Campionamento

Ventiquattro gatti, di età compresa tra i 40 giorni ed i 3 anni e con una diagnosi clinica di infezione da parvovirus, sono stati campionati prelevando almeno un campione biologico (feci o tampone rettale per i soggetti vivi, porzione di intestino per i soggetti morti) nel periodo compreso tra Marzo 2000 e Novembre 2009 (**Tabella 15**). I campioni prelevati sono stati conservati a – 80 °C.

Tabella 15: Tabella campionamenti gatti in Italia.

N° campione	Materiale biologico	Anno	Età	Sintomatologia	Stato vaccinale	Provenienza
702	Feci	2000	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Di proprietà
713	Intestino	2001	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Di proprietà
671	Intestino	2002	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Negoziò
1076	Tampone rettale	2002	15M	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
1469	Tampone rettale	2002	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Di proprietà
828	Intestino	2003	2M	Morte improvvisa	Non vaccinato	Gattile
829	Tampone rettale	2003	2A	nessuna	Completo	Gattile
1759	Intestino	2003	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Di proprietà
1306	Intestino	2004	2M	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
339	Intestino	2006	1A	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
1897	Tampone rettale	2006	nd	Gastroenterite	Non vaccinato	Di proprietà
159	Tampone rettale	2007	9M	Gastroenterite	Completo	Di proprietà
173	Tampone rettale	2007	7M	Gastroenterite	Completo	Di proprietà
239	Tampone rettale	2007	7M	Gastroenterite	Completo	Di proprietà
398	Tampone rettale	2007	3A	Gastroenterite	Completo	Di proprietà
998	Feci	2008	3M	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
1033	Intestino	2009	40D	Morte improvvisa	Non vaccinato	Gattile
1034	Intestino	2009	40D	Morte improvvisa	Non vaccinato	Gattile
1035	Intestino	2009	40D	nessuna	Non vaccinato	Gattile
1036	Intestino	2009	40D	Gastroenterite	Incompleto	Gattile
1037	Intestino	2009	40D	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
1038	Intestino	2009	3M	Gastroenterite	Incompleto	Gattile
1039	Intestino	2009	40D	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile
1040	Intestino	2009	40D	Gastroenterite	Non vaccinato	Gattile

D: giorni. M: mesi. A: anni. nd: non disponibile.

In molti casi i gatti non erano vaccinati o avevano una storia di incompleta vaccinazione. Solitamente i sintomi clinici osservati erano caratterizzati da: febbre, anoressia, segni di gastroenterite (vomito e/o diarrea), depressione, debolezza e leucopenia. Nella maggior parte dei casi il decorso clinico è stato lieve e cronico con due soggetti (829/03 e 1035/09) clinicamente sani. Otto gatti hanno invece mostrato manifestazioni cliniche molto gravi: 3 di questi (828/03, 1033/09 e 1034/09) sono morti improvvisamente senza sintomi apparenti e gli altri 5 sono stati ricoverati all'Ospedale Didattico Veterinario (ODV) dell'*Alma Mater Studiorum*-Università di Bologna per gravi ed acute manifestazioni cliniche di malattia che li hanno portati rapidamente a morte nonostante le cure intensive.

Quattordici dei 24 gatti provenivano da gattili soggetti ad infezioni ricorrenti da parvovirus con ricorrenza stagionale.

II.2.2. Estrazione del DNA virale

Il DNA virale è stato estratto dai 24 campioni utilizzando il NucleoSpin Tissue Mini Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. Nel caso dei tamponi rettali, il materiale di partenza è stato preventivamente sospeso in 200 µl di phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ± 0.2. L'RNA estratto è stato conservato a -20 °C.

II.2.3. Diagnosi molecolare di parvovirus ed amplificazione dei geni VP2 e NS1/2 mediante PCR

La conferma di infezione da parvovirus è stata ottenuta mediante l'utilizzo di una metodica di touch-down PCR già descritta in precedenza [132].

L'amplificazione dell'intero gene VP2 è stata ottenuta per tutti i campioni analizzati mediante PCR, utilizzando la Klen Taq LA Polymerase Mix (Clontech-TAKARA Bio Company, Mountain View, CA, USA) che contiene una polimerasi principale, la KlenTaq-1 DNA polymerase, associata ad un seconda polimerasi con attività proofreading 3'-5' per un'alta fedeltà di amplificazione. E' stata utilizzata una coppia di primer (P1 e VPR, vedi **Appendice 2**) specifica per il parvovirus felino e canino. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 16**.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio

all'1% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Tabella 16: Mix e ciclo di reazione, primer P1 - VPR.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μl	Concentrazione finale
10X Buffer	10X	5	1X
dNTP	10 mM ognuno	1	0,2 mM
Primer P1	20 μ M	1	0,4 μ M
Primer VPR	20 μ M	1	0,4 μ M
KlenTaq LA DNA Polymerase Mix	5 unit/ μ l	1	0,1 unit/ μ l
H ₂ O distillata autoclavata		36	
Campione (cDNA)		5	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione	94 °C x 30 sec
Annealing	54 °C x 2 min
Estensione	72 °C x 2 min
Estensione finale per ottenere una coda di poli-A	72 °C x 10 min

Tabella 17: Mix e ciclo di reazione, primer NS1 - NS2.

Mix di reazione			
Reagenti	Concentrazione iniziale	Quantità in μl	Concentrazione finale
10X Buffer	10X	5	1X
dNTP	10 mM ognuno	1	0,2 mM
Primer NS1	20 μ M	1	0,4 μ M
Primer NS2	20 μ M	1	0,4 μ M
KlenTaq LA DNA Polymerase Mix	5 unit/ μ l	1	0,1 unit/ μ l
H ₂ O distillata autoclavata		36	
Campione (cDNA)		5	
Totale		50	

Ciclo di reazione	
Fasi del ciclo	Temperature e tempi
Denaturazione iniziale	94 °C x 1 min
Denaturazione	94 °C x 30 sec
Annealing	55 °C x 2 min
Estensione	72 °C x 2 min
Estensione finale per ottenere una coda di poli-A	72 °C x 10 min

Anche l'amplificazione dell'intero gene NS1/2 del campione 998/08 è stata ottenuta in PCR utilizzando la Klen Taq LA Polymerase Mix (Clontech-TAKARA Bio Company, Mountain View, CA, USA), utilizzando una coppia di primer (NS1 e NS2, vedi **Appendice 2**) specifica per il parvovirus felino e canino. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 17**.

Durante l'esecuzione delle reazioni sono state prese tutte le precauzioni necessarie per evitarne la contaminazione ed il bianco di reazione, ottenuto aggiungendo acqua alla mix di reazione, non ha mostrato positività, escludendo la presenza di falsi positivi.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

II.2.4. Purificazione dei prodotti di PCR e Sequenziamento

I prodotti di amplificazione dei campioni risultati positivi sono stati purificati utilizzando l'High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. La sequenza nucleotidica dei prodotti di PCR purificati è stata ottenuta, sia con il primer forward che reverse, utilizzando il sequenziatore ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA).

II.2.5. Clonaggio dei geni VP2 e NS1/2

Nonostante per l'amplificazione dei geni VP2 e NS1/2 sia stata utilizzata una polimerasi ad attività proofreading, alcune sequenze ottenute mostravano numerose ambiguità nell'elettroferogramma, suggerendo la presenza di popolazioni virali miste.

I prodotti di PCR che presentavano queste ambiguità di sequenza, ossia l'amplicone del gene VP2 ottenuto dai campioni 1469/02 e 998/08 e l'amplicone del gene NS1/2 ottenuto dal campione 998/08, sono stati clonati utilizzando il vettore plasmidico pCR4 mediante il TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Otto e dieci cloni ricombinanti del gene VP2 sono stati ottenuti rispettivamente per i campioni 1469/02 e 998/08 e dieci cloni ricombinanti del gene NS1/2 sono stati ottenuti per il campione 998/08. I cloni sono stati purificati mediante il Turbo Kit (QBIogene-MP Biomedicals, Montreal, Canada) seguendo le istruzioni del produttore e successivamente sequenziati.

II.2.6. Analisi delle sequenze del gene VP2

Le sequenze complete del gene VP2 sono state analizzate utilizzando l'interfaccia web di BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed allineate con 85 sequenze di referenza

disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizzando l'interfaccia web di ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

La traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacidiche ed il calcolo del grado di similarità tra le sequenze, sia a livello nucleotidico che aminoacidico, sono stati effettuati mediante il programma BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.9.

L'analisi statistica riguardante la diversità nucleotidica e la variabilità di sequenza è stata eseguita sui dati di sequenza utilizzando il programma DNASP versione 5.10.00 [133]. L'analisi è stata eseguita su sottopopolazioni, raggruppando le sequenze in base alla specie di parvovirus d'appartenenza ed al tipo antigenico. I parametri considerati sono stati i seguenti: il numero di siti polimorfici (S) che indica il numero totale di siti sottoposti a mutazione, la diversità nucleotidica (π) che rappresenta il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra due sequenze (con deviazione standard o errore standard) [134], il numero totale di differenze (o sostituzioni) sinonime (SynDif) che rappresenta il numero totale di sostituzioni non determinanti un cambio aminoacidico, il numero totale di differenze (o sostituzioni) non-sinonime (NSynDif) che indica il numero totale di sostituzioni determinanti un cambio aminoacidico ed infine la frazione delle differenze (o sostituzioni) non-sinonime (NSyn fraction) che indica il rapporto tra il numero di sostituzioni non-sinonime ed il totale delle mutazioni.

La percentuale di cloni mutati e la frequenza di mutazione, intesa come il rapporto tra il numero totale di cambiamenti e il numero totale di basi nucleotidiche sequenziate, sono state utilizzate come indicatori della diversità genetica della popolazione virale dei campioni 1469/02 e 998/08.

Per valutare la pressione evolutiva a cui è sottoposto il parvovirus all'interno dell'ospite nel tempo, è stato calcolato il rapporto ω o dN/dS che rappresenta il rapporto tra il numero di sostituzioni non-sinonime per sito nucleotidico soggetto a sostituzioni non-sinonime (dN) ed il numero di sostituzioni sinonime per sito nucleotidico soggetto a sostituzioni sinonime (dS). Questi rapporti sono stati calcolati con l'interfaccia web di Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>), uno strumento di analisi statistica basato sulla massima probabilità (maximum likelihood) che permette di identificare i siti soggetti a selezione positiva o negativa [135]. Datamonkey implementa tre metodi di calcolo: single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL) e random effects likelihood (REL). I modelli di analisi scelti per il calcolo statistico sono stati: HKY85 per tutte le sequenze analizzate compresi i cloni del campione 998/09 e F81 per i soli cloni del campione 1469/02.

Poiché si è dimostrato che gli eventi ricombinanti possono avvenire e contribuire all'evoluzione del parvovirus [35, 36], i dati di sequenza sono stati analizzati per la ricerca di siti di ricombinazione con l'algoritmo GARD (Genetic Algorithms for Recombination Detection) implementato nell'interfaccia web di Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/GARD/>) [136].

L'analisi filogenetica eseguita sulle sequenze nucleotidiche con il programma PAUP versione 4.0, utilizzando il metodo di massima probabilità (maximum likelihood, ML) e

scegliendo con Modeltest [137] il modello di sostituzione nucleotidica che meglio si adattasse ai diversi raggruppamenti di sequenze, ha permesso di elaborare due alberi filogenetici sovrapponibili. Il modello di sostituzione TrN + I + Γ è risultato essere ottimale per l'analisi di tutte le sequenze (comprese le sequenze dei ceppi di riferimento), mentre il modello GTR + I + Γ è stato usato per l'analisi delle sole sequenze ottenute dai campioni prodotti in questo studio. I valori dei parametri chiave (le matrici di sostituzione TrN e GTR, la proporzione dei siti costanti I e la gamma distribuzione Γ del tasso di variazione con otto categorie) sono stati elaborati sulla base dei dati forniti.

Per valutare il livello di confidenza di ogni ramo dei modelli grafici ottenuti, sono stati calcolati, utilizzando PAUP versione 4.0, i valori di bootstrap ripetendo per 1.000 volte l'elaborazione degli alberi filogenetici costruiti utilizzando il metodo neighbour-joining.

II.2.7. Analisi delle sequenze del gene NS1/2

Le sequenze complete dei cloni del gene NS1/2 del campione 998/08 sono state allineate con 45 sequenze di riferimento disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizzando l'interfaccia web di ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

La traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacidiche ed il calcolo del grado di similarità tra le sequenze, sia a livello nucleotidico che aminoacidico, sono stati effettuati mediante il programma BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.9.

L'analisi statistica riguardante la diversità nucleotidica e la variabilità di sequenza è stata eseguita utilizzando il programma DNASP versione 5.10.00 [133], considerando gli stessi parametri utilizzati per le sequenze del gene VP2.

Per valutare la diversità genetica della popolazione virale sono state calcolate la percentuale di cloni mutati e la frequenza di mutazione, mentre per evidenziare eventuali siti di ricombinazione è stata eseguita l'analisi con l'algoritmo GARD implementato nell'interfaccia web di Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/GARD/>) [136].

L'utilizzo del software MEGA versione 5.0 ha permesso di elaborare, mediante il metodo della massima probabilità (maximum likelihood, ML), le relazioni filogenetiche esistenti tra i 10 cloni ottenuti dal gene NS1/2 del campione 998/08 e 45 sequenze di riferimento di FPV e CPV disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank. L'albero filogenetico ottenuto sulle sequenze nucleotidiche è stato valutato statisticamente calcolando i valori di bootstrap ripetendo per 1.000 volte l'elaborazione dei dati.

II.3. Risultati

In questo studio sono stati analizzati 24 ceppi di parvovirus identificati in gatti domestici sia di proprietà che provenienti dalle collettività feline, quali gattili e negozi di animali. La ricerca del parvovirus nei campioni biologici è stata eseguita mediante metodiche di biologia molecolare (PCR), ottenendo per ogni ceppo la sequenza nucleotidica dell'intero gene VP2 (**PUBBLICAZIONE 4**) e per il ceppo 998/08 anche la sequenza nucleotidica completa del gene NS1/2.

Figure 17 e 18: Elettroforesi dei prodotti di real-time PCR su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: amplificati dei geni VP2 e NS1/2.

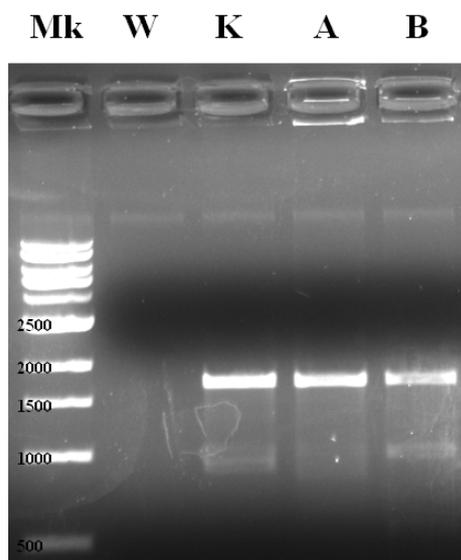


Figura 17: Amplificati del gene VP2.

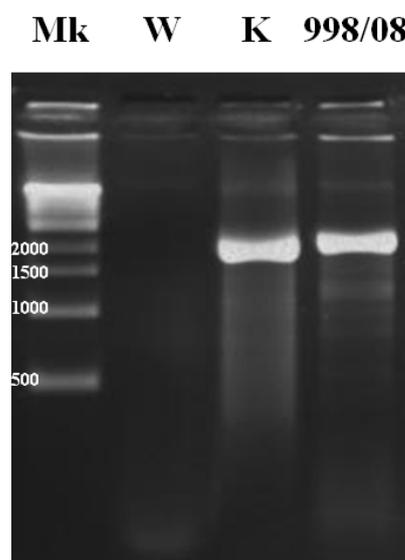


Figura 18: Amplificati del gene NS1/2.

Le bande specifiche hanno una altezza di circa 1745 bp per il gene VP2 e di 2032 bp per il gene NS1/2.

MK: Quick-Load 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). W: bianco di reazione. K: controllo positivo di reazione, campione di parvovirus già testato e risultato positivo. A: Campione 1033/09. B: Campione 1034/09.

La sequenza nucleotidica del gene VP2 ottenuta per ogni campione era di 1745 bp di lunghezza (**Figura 17**), mentre quella del gene NS1/2 l era di 2032 bp (**Figura 18**).

II.3.1. Analisi delle sequenze del gene VP2

L'analisi della sequenza aminoacidica del gene VP2 ed in particolare di specifici residui aminoacidici (**Tabella 18**), ha permesso di identificare la specie di parvovirus di

appartenenza: 22 dei 24 ceppi virali erano FPV mentre, per i restanti due campioni (1469/02 e 998/08), è stato necessario procedere con il clonaggio dei prodotti di PCR a causa dell'inusuale elevato numero di ambiguità osservate nel tracciato ottenuto dal sequenziamento diretto degli ampliconi, che suggeriva la presenza di popolazioni virali miste. I prodotti di PCR dei campioni 1469/02 e 998/08 sono stati clonati e sequenziati. Per il campione 1469/02 sono stati ottenuti 8 cloni (numeri: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 10) e per il campione 998/08 sono stati ottenuti 10 cloni (numeri: 1, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 15 e 20).

La comparazione delle sequenze nucleotidiche dei cloni ottenuti dal campione 1469/02 ha evidenziato 8 diverse popolazioni virali con una percentuale di similarità di sequenza che variava da 99,8 a 99,9%. A livello aminoacidico invece, i cloni 2, 6 e 7 erano identici tra loro, mentre tutti i cloni rimanenti (1, 3, 4, 8 e 10) differivano con una percentuale di identità variabile tra 99,5 e 99,8%. L'analisi delle posizioni aminoacidiche, che consente di distinguere il parvovirus felino da quello canino ed anche le nuove varianti antigeniche del CPV, ha permesso di riconoscere come appartenenti alla variante CPV-2c tutti i cloni ottenuti dal ceppo 1469/02.

La comparazione delle sequenze nucleotidiche dei cloni ottenuti per il gene VP2 dal campione 998/08 ha evidenziato 6 diverse popolazioni virali, con una identità del 100% tra i cloni 6 e 20, così come tra i cloni 1, 3, 4 e 7, ed una percentuale di similarità variabile tra 98,3 e 99,9% per i restanti cloni (9, 12, 13 e 15). A livello aminoacidico invece, i cloni 1, 3, 4, 7, 12 e 13 erano identici tra loro e tutti i cloni rimanenti (6, 9, 15 e 20), di cui il 6 ed il 20 identici tra loro, differivano con una percentuale di identità variabile tra 97,6 e 99,8%. L'analisi delle posizioni aminoacidiche ha permesso di riconoscere come appartenenti alla variante CPV-2a i cloni 6, 15 e 20, mentre tutti i cloni rimanenti (1, 3, 4, 7, 9, 12 e 13) erano FPV, evidenziando la presenza di una infezione mista con due specie di parvovirus nello stesso ospite.

In merito ai 22 ceppi di FPV, la comparazione delle sequenze nucleotidiche ha evidenziato una identità del 100% tra i campioni: 828/03 e 829/03; 159/07, 239/07 e 389/07; 1033/09, 1034/09, 1035/09, 1036/09, 1037/09, 1038/09, 1039/09 e 1040/09. Per i restanti ceppi la percentuale di similarità variava tra 99,1 e 99,8%. A livello aminoacidico invece, i ceppi 828/03, 713/01, 239/07, 398/07, 173/07, 1897/06 e i cloni 1, 3, 4, 7, 12 e 13 del ceppo 998/08, così come i due ceppi 339/06 e 1076/07, erano identici tra loro. I ceppi rimanenti differivano con una percentuale di identità variabile tra 99,6 e 99,8%.

Numerose sostituzioni sinonime e non-sinonime sono state riscontrate confrontando le sequenze. Le sostituzioni nelle sequenze aminoacidiche sono riassunte nella **Tabella 18**. Le sequenze ottenute sono state comparate con ceppi di riferimento disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank. L'allineamento ottenuto mostra che almeno 2 delle 6 mutazioni non-sinonime rilevate erano molto comuni perché presenti anche in alcuni ceppi di riferimento, residui 13 (Pro-Ser) e 91 (Ala-Ser), mentre 3 mutazioni non-sinonime erano uniche e caratteristiche dei ceppi analizzati in questo studio: 426 (Asn-Ser), 501 (Lys-Arg) e 517 (Asn-Ser).

Tabella 18: Cambi aminoacidici nella sequenza del gene VP2 dei ceppi di parvovirus analizzati.

Ceppi	Posizioni aminoacidiche																										Tipo	
	13	46	80	87	91	93	98	103	110	232	282	297	300	305	323	340	373	415	426	440	482	498	501	511	517	564		568
FPV^a	Pro	Asn	Lys	Met	Ala	Lys	Leu	Val	Ser	Val	Asn	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Ile	Asn	Thr	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Asn	Ala	
CPV-2^b	-	-	Arg	-	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	-	-	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
CPV-2a^b	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
CPV-2b^b	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
CPV-2a^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
CPV-2b^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
CPV-2c^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	
702/00	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	FPV
713/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
671/02	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
1759/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
1306/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
339/06	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
1034/09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	FPV
1469/02_1	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	Asn	-	Ser	Gly	CPV-2c
1469/02_2	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2c
1469/02_3	-	Asp	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	Asp	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2c
1469/02_4	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	Val	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2c
1469/02_8	-	-	Arg	Leu	-	Asn	Ser	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2c
1469/02_10	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	Val	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2c
998/08_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
998/08_6	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	Ala	Pro	-	-	-	-	Ser	Gly	CPV-2a
998/08_9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	FPV
998/08_15	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	Pro	Ile	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	-	-	-	CPV-2a

Allo scopo di semplificare la presentazione dei risultati, le sequenze identiche a livello aminoacidico non sono state incluse nella tabella.

Grigio: posizioni aminoacidiche che permettono di distinguere i ceppi di FPV e CPV-2a,b,c.

Sequenze aminoacidi che del gene VP2 ottenute dal database di GenBank:

^a Prototipo di FPV: FPV-b (M38246).

^b Prototipi di CPV: tipo 2: CPV-b (M38245), tipo 2a: CPV-15 (M24003), tipo 2b: CPV-39 (M74849).

^c ceppi di referenza: tipo 2a: CPV-677 (AF306445), tipo 2b: CPV-637 (AF306450), tipo 2c: CPV-695 (AF01519).

Il campione 1469/02 mostrava una elevata variabilità genetica generata all'interno dell'ospite infettato. Sei delle 10 (60%) mutazioni riscontrate erano non-sinonime, con le sostituzioni riguardanti i residui 46 (Asn-Asp), 98 (Leu-Ser), 340 (Ala-Val), 373 (Asp-Val) e 511 (Asp-Asn) mai riportate precedentemente in letteratura e la sostituzione del residuo 282 (Asn-Asp) già riportata in precedenza [138].

Anche il campione 998/08 mostrava una elevata complessità genetica. Sulla base delle sequenze aminoacidiche ottenute del gene VP2 è stato possibile distinguere i 10 cloni in 4 principali popolazioni virali. I cloni 1, 3, 4, 7, 12 e 13 potevano essere ricondotti al predominante ceppo FPV circolante nella nostra area poiché le loro sequenze erano identiche alla maggior parte dei ceppi di FPV analizzati in questo studio. Il clone 9 era un ceppo di FPV con caratteristiche uniche ed era distinguibile dagli altri cloni per una sostituzione aminoacidica nel residuo 498 (Leu-Ser). I cloni 6 e 20 erano classici CPV-2a con una sostituzione aminoacidica in posizione 482 (Leu-Pro). Infine, il clone 15 appariva come un vero intermedio tra il FPV ed il CPV in quanto, analizzando le 10 principali posizioni aminoacidiche che permettono di distinguere il parvovirus felino e quello canino, si è visto che 8 residui erano identici a quelli che identificano il CPV-2a ed i rimanenti 2 corrispondevano a quelli che identificano l'FPV (**Tabella 18**).

La **Tabella 19** riporta schematicamente i risultati delle analisi di sequenza effettuate con il programma DNASP. I dati di sequenza sono stati analizzati separatamente sulla base del tipo virale d'appartenenza, suddividendo le sequenze in tre diverse sottopopolazioni: FPV (tutti i ceppi di FPV), 1469/02 (tutti i cloni ottenuti dal campione 1469/02) e 998/08 (tutti i cloni ottenuti dal campione 998/08). I dati sono stati comparati con altri campioni precedentemente analizzati nel nostro laboratorio che presentavano analoghe caratteristiche di diversità genetica (campioni 116/05 e 231/03, [33, 113]). La variabilità di sequenza, espressa dai valori del parametro π , del campione 998/08 si è rivelata maggiore di quella calcolata per tutte le altre sequenze analizzate. Un totale di 38 siti polimorfici, distribuiti tra tutti i 10 cloni, sono stati rilevati per il campione 998/08. La frazione delle differenze non-sinonime (NSyn fraction) è risultata invece maggiore per il campione 1469/02, indicando una netta prevalenza del numero di mutazioni non-sinonime, rispetto a quelle sinonime, nei cloni ottenuti da questo campione. Infatti, sul totale degli 8 cloni ottenuti dal campione 1469/02, 6 delle 10 mutazioni nucleotidiche erano non-sinonime e quindi esitavano in un cambio aminoacidico.

Per i campioni 1469/02 e 998/08, sono stati utilizzati come indicatori della diversità di popolazione la percentuale di cloni virali mutati e la frequenza di mutazione (**Tabella 20**).

La frequenza di mutazione era nell'ordine di grandezza di 1 mutazione ogni $7,2 \times 10^4$ nt per 1469/02 e di 1 mutazione ogni 2×10^3 nt per 998/08.

Tabella 19: Variabilità di sequenza dei ceppi di parvovirus analizzati.

Gene VP2					
Ceppi	S ^b	π^c	SynDif ^d	NSynDif ^e	NSyn fraction ^f
FPV (n ^a = 22)	37	0.00551 (SE 0.00049)	31	6	0.16
1469/02 (n = 8)	10	0.00153 (SE 0.00018)	4	6	0.60
998/08 (n = 10)	34	0.00913 (SE 0.00266)	19	15	0.44
116/05 (n = 14)	19	0.00156 (SE 0.00036)	7	12	0.63
231/03 (n = 3)	6	0.00229 (SE 0.00108)	4	2	0.33
Gene NS1/2					
Ceppi	S ^b	π^c	SynDif ^d	NSynDif ^e	NSyn fraction ^f
998/08 (n = 10)	6	0.00075 (SE 0.00026)	3	3	0.50

^a n : dimensione del campione, numero di soggetti.

^b S : siti polimorfici.

^c π : diversità nucleotidica.

^d SynDif: numero totale di differenze (o sostituzioni) sinonime.

^e NSynDif: numero totale di differenze (o sostituzioni) non-sinonime.

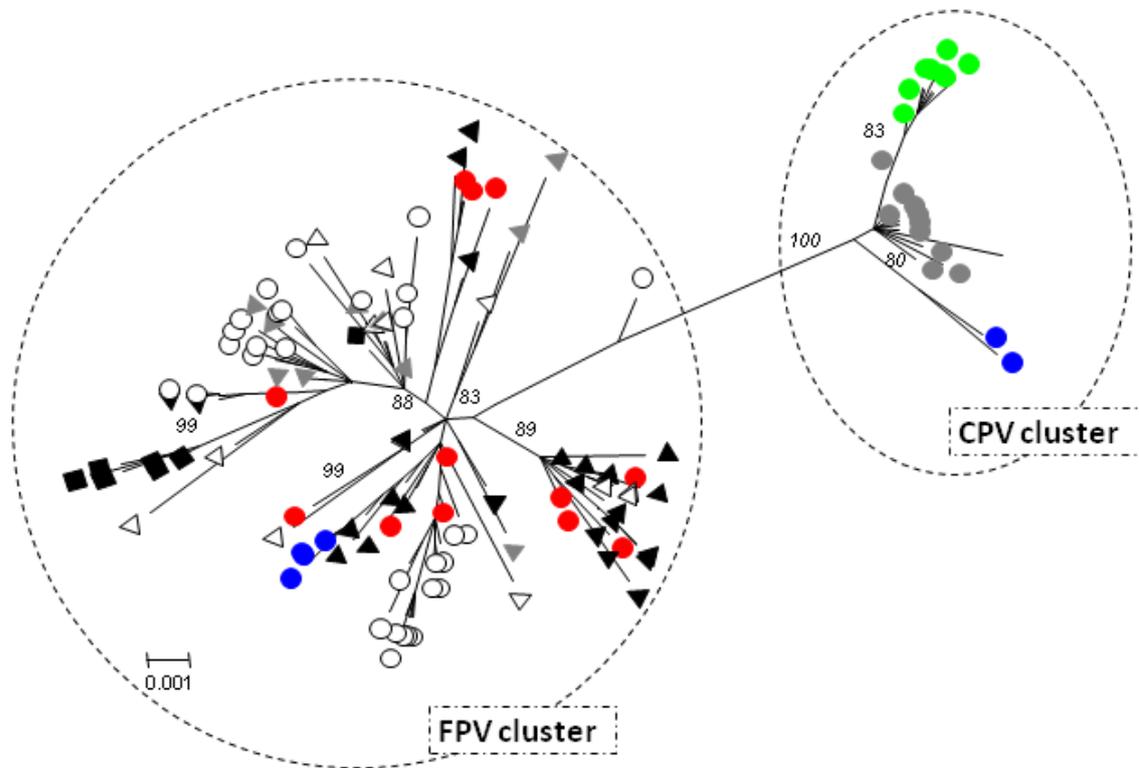
^f NSyn fraction : frazione delle differenze (o sostituzioni) non-sinonime.

Tabella 20: Variabilità di quasispecie nelle popolazioni virali ad elevata complessità genetica.

Gene VP2			
Ceppi	% cloni mutati	N° tot mutazioni/ N° tot basi sequenziate	Frequenza di mutazione
1469/02	100 (8/8)	10/13960	7.2×10^{-4}
998/08	60 (6/10)	34/17450	2×10^{-3}
116/05	57 (8/14)	19/24430	7.8×10^{-4}
231/03	67 (2/3)	6/5235	1.1×10^{-3}
Gene NS1/2			
Ceppi	% cloni mutati	N° tot mutazioni/ N° tot basi sequenziate	Frequenza di mutazione
998/08	40 (4/10)	8/20070	4.0×10^{-4}

Per valutare la pressione di selezione che agisce sul gene VP2, il rapporto tra le sostituzioni non-sinonime per sito e le sostituzioni sinonime per sito ($\omega = dN/dS$) è stato calcolato per l'intero gene. Il valore di ω è stato stimato pari a 0,27 per l'insieme di tutte le sequenze analizzate, di 0,04 per l'insieme delle 22 sequenze di FPV, di 0,33 per l'insieme dei cloni ottenuti dal campione 1469/02 e di 0,18 per l'insieme dei cloni ottenuti dal campione 998/08.

Figura 19: Albero filogenetico elaborato con le sequenze nucleotidiche del gene VP2 dei ceppi di parvovirus.



Ceppi di parvovirus identificati nello studio:

- 1469/02
- 116/05 [33]
- 998/08
- FPV

Ceppi di referenza di FPV:

- Asia
- ▲ Italia
- △ Europa
- ▲ USA
- Sud America
- ◆ Australia

L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della massima probabilità utilizzando le sequenze nucleotidiche del gene VP2 ottenute nel presente studio e con 85 ceppi di referenza di FPV ottenute dal database di GenBank. I rami orizzontali hanno lunghezza proporzionale alla divergenza evolutiva (sostituzioni nucleotidiche per sito) e i valori di bootstrap $\geq 70\%$, calcolati su 1.000 replicati, sono riportati al fianco del ramo corrispondente.

Ceppi di referenza di FPV disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica:

Asia: AB000052; AB000054; AB000056; AB000059; AB000061; AB000064; AB000066; AB000068; AB000070; AB054225; AB054226; AB054227; AF015223; D78584; D88286; D88287; DQ474236; DQ474237; EF988660; EU252145; EU252146; EU252147; EU697383; EU697384; EU697386; EU697387; FJ231389; FJ405225; FJ93617.

Australia: X55115.

Europa: AY665655; EF418569; DQ474238; EU145593; EU221279; EU221280; EU360958; EU360959; EU498713; EU498714; EU498716; EU498717; EU498719; FPU22188.

Italia: EU498682; EU498683; EU498684; EU498685; EU498690; EU468692; EU498693; EU498694; EU498695; EU498697; EU498698; EU498699; EU498700; EU498701; EU498704; EU498705; EU498706; EU498707; EU498708; EU498709; EU498710; EU498711; EU498712; EU498715; EU498720.

Sud America: FJ440712; EU018142; EU018143; EU018144; EU018145; FJ440714.

USA: EU659111; EU659112; EU659113; EU659114; EU659115; M10824; M24002; M24004; U22187; U22189.

Un'analisi statistica basata sulla massima probabilità è stata effettuata sui cloni virali per identificare i siti soggetti a selezione. Per l'elaborazione sono stati utilizzati tutti i metodi implementati nell'interfaccia web di Datamonkey ottenendo così un'analisi comparativa. Analizzando insieme tutti i dati di sequenza prodotti, i metodi SLAC e FEL non hanno rilevato siti soggetti a selezione positiva ma solo 8 e 32 siti rispettivamente soggetti a selezione negativa; solo il metodo REL, utilizzando un valore Bayesiano di 100, ha rilevato 3 siti soggetti a selezione positiva (residui 13, 426 e 564). Analizzando separatamente i dati di sequenza prodotti dai cloni dei campioni 1469/02 e 998/08, allo scopo di investigare quale pressione selettiva agisca durante l'infezione all'interno dell'ospite, entrambi i tre metodi utilizzati (SLAC, FEL e REL) hanno evidenziato diversi siti soggetti a selezione negativa.

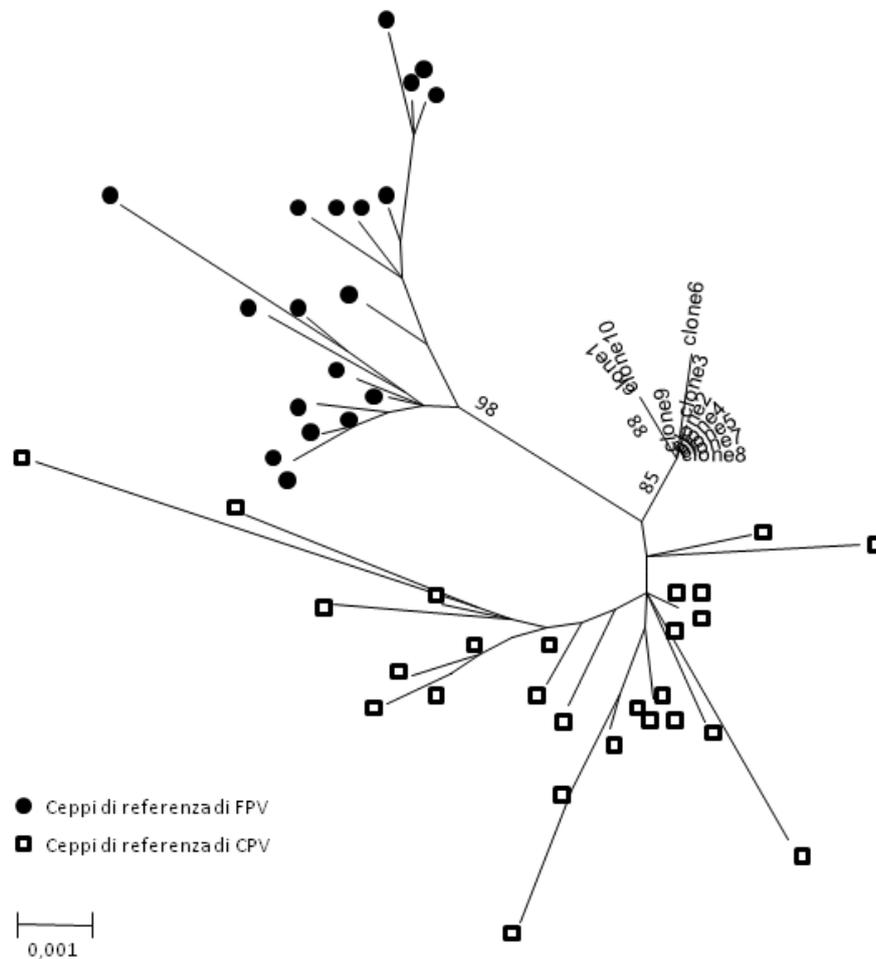
Dall'analisi effettuata con GARD, non sono stati rilevati potenziali eventi di ricombinazione nelle sequenze ottenute dai cloni virali.

Dalle sequenze nucleotidiche del gene VP2 ottenute in questo studio, insieme con quelle di riferimento scaricate dal database di GenBank, è stato elaborato un albero filogenetico unrooted (**Figura 19**). L'albero ottenuto presentava due principali raggruppamenti supportati da elevati valori di bootstrap: un cluster composto dagli FPV ed uno composto dai CPV. Il gruppo dei CPV includeva tutti i cloni ottenuti dal campione 1469/02 ed i cloni identificati come CPV-2a (numeri 6, 15 e 20) ottenuti dal campione 998/08, con il clone 15 del campione 998/08 che formava un ramo monofiletico a se stante. Il gruppo degli FPV includeva invece tutti i 22 ceppi di FPV ed i cloni 1, 3, 4, 7, 9, 12 e 13 ottenuti dal campione 998/08. Il cluster degli FPV non presentava caratteristiche temporali o geografiche, infatti, i ceppi di FPV analizzati in questo studio formavano diversi sottogruppi con ceppi di riferimento italiani, europei ed asiatici. Un ceppo di FPV isolato recentemente da una scimmia con sintomatologia diarroica [139] formava un lineage intermedio tra i due gruppi principali.

II.3.2. Analisi delle sequenze del gene NS1/2

Il clonaggio del prodotto di PCR del gene NS1/2 del campione 998/08 ha permesso di ottenere 10 cloni (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) ed il sequenziamento ha fornito sequenze della lunghezza di 2032 bp. Le successive analisi sono state eseguite su tratti di sequenza di 2007 bp, corrispondenti all'intero gene NS1/2. La comparazione delle sequenze nucleotidiche dei cloni ha evidenziato 4 diverse popolazioni virali, caratterizzate da una percentuale d'identità variabile da 99,7 a 99,9% ed una identità completa tra i cloni 1 e 10, così come tra i cloni 2, 4, 5, 7, 8 e 9. A livello aminoacidico invece sono stati riscontrati tre diversi profili solo per la proteina NS1, mentre la proteina NS2 era uguale per tutti i cloni. I tre profili della proteina NS1 erano caratterizzati da una percentuale di identità compresa tra 99,5 e 99,8%, con una identità del 100% tra i cloni 1 e 10, così come tra i cloni 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9.

Figura 20: Albero filogenetico elaborato con le sequenze nucleotidiche del gene NS1/2 dei ceppi di parvovirus.



L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della massima probabilità utilizzando le sequenze nucleotidiche del gene NS1/2 ottenute nel presente studio e con 45 ceppi di referenza di FPV e CPV ottenute dal database di GenBank. I valori di bootstrap $\geq 70\%$, calcolati su 1.000 replicati, sono riportati al fianco del ramo corrispondente.

Ceppi di referenza di FPV e CPV disponibili nel database di sequenze nucleotidiche di GenBank utilizzati per l'analisi filogenetica:

FPV: AB000069, EU659115, EU659114, EU659113, EU659112, EU659111, X55115, AB000067, AB000065, AB000063, AB000062, AB000060, AB000058, AB000057, AB000055, AB000053, AB000051, AB000049, AB000048.

CPV: AY742936, AY742935, AY742934, AY742933, AY742932, AY742956, AY742954, AY742952, AY742950, AY742948, AY742946, GQ421597, EU310373, AY787930, AY787929, AY787927, AY787926, EU659121, EU659120, EU659119, EU659118, EU659117, EU659116, D26079, EF011664, AJ564427.

In letteratura non sono riportati, contrariamente a quanto avviene per la proteina VP2, siti specifici che permettano di distinguere sulla base della sequenza aminoacidica del gene NS1/2 i ceppi di FPV da quelli di CPV. Ciononostante, dall'allineamento eseguito con 45 ceppi di referenza disponibili sul database di GenBank, è stato possibile riconoscere cinque posizioni costantemente distintive tra le due specie virali, di cui

quattro nella proteina NS1 ed una nella proteina NS2. Nella proteina NS1 i residui potenzialmente distintivi erano: 247 (His per FPV e Gln per CPV), 248 (Thr per FPV e Ile per CPV), 545 (Gln per FPV e Glu per CPV) e 595 (His per FPV e Gln per CPV); mentre nella proteina NS2 il residuo potenzialmente distintivo era il 105 (Arg per FPV e Ser per CPV). Tutti i cloni ottenuti per il gene NS1/2 del ceppo 998/08 presentavano residui potenzialmente specifici per CPV nelle posizioni 247, 545 e 595 della proteina NS1 e 105 della proteina NS2, mentre per la posizione 248 della proteina NS1 presentavano l'aminoacido treonina potenzialmente specifico per FPV.

Confrontando le sequenze nucleotidiche codificanti per le proteine NS1 ed NS2 sono state riscontrate alcune sostituzioni sinonime e non-sinonime. In particolare, le sostituzioni aminoacidiche che distinguono i cloni 1 e 10, 238 (F-L), ed il clone 6, 394 (N-S) e 413 (I-M), erano localizzate nella sequenza della proteina NS1 e non erano presenti in nessuna delle sequenze di riferimento disponibili su GenBank.

La **Tabella 19** riporta schematicamente i risultati delle analisi di sequenza effettuate con il programma DNASP. Si può notare come, su un totale di 10 cloni analizzati, fossero presenti solo 6 siti polimorfici lungo i 2007 nt della sequenza del gene, a cui consegue una ridotta variabilità di sequenza (π). Ciononostante il 50% delle mutazioni erano non - sinonime.

La diversità di popolazione nei 10 cloni del gene NS1/2 del campione 998/08 è stata valutata mediante la frequenza di mutazione che ha mostrato un valore nell'ordine di 1 mutazione ogni $4,0 \times 10^4$ nt (**Tabella 20**), mentre la pressione di selezione agente sul gene è stata stimata calcolando il rapporto dN/dS che ha dato un valore di 0,26, di grandezza paragonabile a quanto rilevato per il gene VP2.

L'analisi effettuata con GARD, come rilevato anche per il gene VP2, non ha identificato potenziali eventi di ricombinazione nelle sequenze prodotte dai cloni virali.

L'albero filogenetico ottenuto con le sequenze dei cloni del gene NS1/2 del campione 998/08 e con le sequenze di ceppi di riferimento di FPV e CPV disponibili su GenBank presentava due principali raggruppamenti (**Figura 20**), composti rispettivamente dalle sequenze di FPV e dalle sequenze di CPV, senza suddivisioni temporali o geografiche. In questo albero i 10 cloni del campione 998/08 erano tutti riuniti in un unico lineage contiguo al cluster dei CPV.

II.4. Discussione

II.4.1. Infezione da FPV nei gatti

Il presente studio riguardante le caratteristiche molecolari dei ceppi di parvovirus circolanti nella popolazione felina, pur analizzando un numero relativamente limitato di campioni, ha permesso di ottenere importanti informazioni in merito all'evoluzione del virus e alle interazioni tra il parvovirus e l'ospite (**PUBBLICAZIONE 4**).

Dallo studio, è emerso che la maggior parte dei casi di panleucopenia felina sono causati da ceppi virali appartenenti a FPV e che questi variano, in seguito a singole mutazioni puntiformi distribuite nel genoma, con una frequenza molto bassa, senza una chiara distribuzione temporale o geografica, come già riportato recentemente da altri autori [131].

Considerando tutte le mutazioni nucleotidiche presenti nelle sequenze del gene VP2 ottenute nel nostro studio dai ceppi di FPV, le sostituzioni sinonime prevalgono su quelle non-sinonime e, di conseguenza, la maggior parte di questi ceppi sono identici a livello aminoacidico. Tuttavia, nonostante la bassa variabilità di sequenza riscontrata nel gene del capsido delle sequenze di FPV analizzate, una importante sostituzione non-sinonima è stata evidenziata in corrispondenza del residuo 426 che costituisce un importante marker genetico per il parvovirus del cane. La mutazione del residuo aminoacidico 426 coinvolge infatti un epitopo essenziale per il CPV, in cui diverse sostituzioni hanno modificato negli anni il profilo antigenico originale, originando le nuove varianti del virus. Studi di epidemiologia molecolare eseguiti su questa sostituzione, localizzata nel principale sito antigenico posto sullo spike del capsido dei CPV, hanno dimostrato che complesse dinamiche di selezione agiscono su questo residuo [48].

Il residuo 426 nei CPV è andato incontro a due mutazioni: la prima da asparagina (Asn) ad aspartato (Asp) ha portato all'emergenza della variante CPV-2b e, più recentemente, la sostituzione con glutammato (Glu) ha dato origine alla variante CPV-2c. Questa differenza aminoacidica è l'unica che permetta di distinguere i ceppi appartenenti alla variante CPV-2a da quelli appartenenti rispettivamente alle varianti CPV-2b e CPV-2c [140]. Le conseguenze biologiche di queste mutazioni non sono tuttora chiare, ciononostante è stato osservato che le nuove varianti hanno acquisito diversi vantaggi rispetto all'originale tipo CPV-2. Fino ad ora non sono state riportate per il FPV mutazioni che coinvolgano il residuo 426 e le conseguenze di questo cambio aminoacidico da asparagina (Asn) a serina (Ser) individuata nel ceppo 1306/04 non sono conosciute. Analogamente a quanto accade per i CPV, è però ipotizzabile che questo cambio aminoacidico possa modificare il profilo antigenico del FPV conferendo un vantaggio evolutivo al virus.

Indagini più approfondite, ampliando le dimensioni della popolazione felina oggetto di studio ed estendendo la ricerca anche a ceppi di FPV provenienti da altre parti del

mondo, saranno necessarie per chiarire se questa mutazione si è fissata nella popolazione virale come meccanismo di elusione antigenica alla pressione immunitaria o per ulteriore adattamento del virus all'ospite felino.

II.4.2. Infezione multipla da CPV nei gatti ed evidenza di confezione

La diffusione del parvovirus canino nei gatti domestici ed il suo potenziale patogenetico nel causare infezione e malattia in questi ospiti non è stato fino ad ora studiato sistematicamente. Il presente studio conferma che l'infezione da CPV nel gatto sia un evento raro in Europa essendo il virus rilevato solo sporadicamente nei campioni biologici di questi felidi [130].

I principali ritrovamenti effettuati in questo studio sono stati l'elevata complessità genetica riscontrata nel campione 1469/02 e la prima segnalazione di una coinfezione da FPV-CPV per il campione 998/08 (**PUBBLICAZIONE 4**).

Nel campione 1469/02 sono state identificate, sulla base delle sequenze dei cloni ottenuti dal gene VP2, 8 diverse popolazioni virali appartenenti al parvovirus canino di tipo 2c che coesistevano nello stesso gatto, un fenomeno simile alla distribuzione di quasispecie riportata tipicamente per i virus a RNA. Infezioni multiple ad elevata complessità genetica sono già state riportate in letteratura per il CPV-2c [33]. La diversità genetica espressa dal virus nel campione 1469/02 è analoga all'elevata variabilità di sequenza osservata per un campione di CPV (116/05) osservata in uno studio precedente [33]; in questo studio fu riportata un'elevata variabilità genetica data dalla coinfezione con due varianti antigeniche 2a e 2c del CPV-2 in un gatto domestico. Un caso di coinfezione con due varianti antigeniche 2a e 2c del CPV-2 è stato riportato anche per il cane [113].

Dati sperimentali ed osservazioni di campo riportano un decorso clinico più severo ed un tasso di mortalità più elevato in corso di infezioni da CPV-2c, così come la capacità di infettare e causare malattia in cani adulti, anche se ripetutamente vaccinati. Questi dati suggeriscono che la mutazione Glu-426 possa determinare un certo vantaggio nella replicazione virale [141]. Il pattern antigenico caratteristico esibito dal CPV-2c può quindi conferire vantaggi biologici a questa variante, come la capacità di eludere la risposta immunitaria e la possibilità di aumentare la complessità e la diversità delle quasispecie.

La dinamica di quasispecie virale, osservata per questo soggetto, è stata descritta come il meccanismo per evadere la risposta difensiva dell'ospite o come fonte di varianti virali con un vantaggio selettivo nell'adattamento a nuovi ambienti; tale diversità è stata correlata con la capacità del virus di infettare potenzialmente un numero più elevato di ospiti [142] e può quindi acquisire implicazioni biologiche importanti sia per l'evoluzione che per la patogenicità del virus.

Mediante l'analisi delle sequenze dei cloni ottenuti dal gene VP2 del campione 998/08 è stato possibile identificate 2 diverse specie di parvovirus, il feline panleukopenia

virus e la variante 2a del parvovirus canino di tipo 2, con la presenza di una variante di parvovirus (clone numero 15) che mostrava caratteristiche intermedie alle due specie.

Il clone 15 presentava nelle posizioni aminoacidiche 80, 93, 103 e 323 gli stessi residui caratteristici della variante CPV-2a ma, allo stesso tempo, i residui 564 e 568 mostravano rispettivamente gli aminoacidi Asn e Ala che sono tipici delle sequenze dell'FPV. Poiché l'analisi eseguita con l'algoritmo GARD implementato in Datamonkey ha escluso che possano essere avvenuti eventi di ricombinazione, si può ipotizzare che questi cambi aminoacidici siano il risultato di mutazioni indipendenti avvenute durante l'infezione *in vivo* come evento adattativo del CPV al nuovo ambiente rappresentato dall'ospite felino. Poiché il gatto rappresenta un ospite relativamente nuovo per CPV, le sostituzioni rinvenute nelle posizioni 564 e 568 potrebbero aumentare la fitness virale e potrebbero esitare nell'adattamento del virus al nuovo ospite.

Inoltre, la frequenza di mutazione rilevata per questo gene nel campione 998/08 era nell'ordine di 2×10^{-3} nt/sito, un valore analogo a quello dei virus a RNA e superiore al tasso di mutazione annuale stimato per i parvovirus dei carnivori che è nell'ordine del 10^{-4} - 10^{-5} nt/sito. Questo risultato supporta l'importanza delle coinfezioni come potenziale fonte di diversità genetica, confermando i precedenti risultati riguardanti la diversità del parvovirus all'interno dell'ospite [34].

Svolgere sul campione 998/08 anche l'analisi delle sequenze dei cloni ottenuti dal gene NS1/2 ha permesso di confermare la minore variabilità di questo gene [27, 48], evidenziando un tasso di mutazione dieci volte inferiore rispetto a quanto osservato per il gene VP2 dello stesso campione.

Anche se nell'insieme di tutti i cloni del gene NS1/2 analizzati è stato evidenziato un numero inferiore di siti nucleotidici soggetti a sostituzione rispetto al gene VP2, è da evidenziare come la proporzione delle sostituzioni non-sinonime sia comunque elevata, ad indicare che tutto il genoma del parvovirus sia comunque soggetto ad una elevata pressione selettiva.

Lo studio delle sequenze nucleotidiche dei cloni del gene NS1/2 ha permesso di identificare quattro diverse popolazioni virali ma, non essendo stati riportati in letteratura siti aminoacidici specifici di questo gene che permettano di distinguere le diverse specie virali di parvovirus, è impossibile identificare con certezza se esse appartengano al FPV o al CPV-2a, già identificati attraverso l'analisi dei cloni del gene VP2. Comunque, dall'allineamento eseguito sui ceppi di riferimento di FPV e CPV disponibili sul database di GenBank è stato possibile riconoscere cinque posizioni costantemente distintive tra le due specie virali, quattro nella proteina NS1 e una nella proteina NS2. Tutti i cloni ottenuti per il gene NS1/2 del ceppo 998/08 presentavano residui potenzialmente specifici per CPV ad eccezione di uno dei quattro siti della proteina NS1 che corrispondeva invece a FPV (Thr-248). In considerazione di questo e dell'analisi filogenetica eseguita sui cloni, che ha evidenziato un raggruppamento degli stessi insieme ai ceppi di riferimento di CPV, è perciò presumibile che i cloni appartengano alla specie del parvovirus canino.

Poiché l'analisi eseguita con l'algoritmo GARD implementato in Datamonkey ha escluso che possano essere avvenuti eventi di ricombinazione anche in questo tratto del

genoma, si può ipotizzare che l'aminoacido Thr-248 presente in tutti i cloni della proteina NS1 sia il risultato di una mutazione indipendente avvenuta all'inizio dell'infezione, prima della generazione della popolazione di quasispecie, nell'adattamento del CPV all'ospite felino, come ipotizzato anche per il clone 15 del gene VP2.

L'elevata eterogeneità genetica rilevata nel campione 998/08, mette in evidenza il ruolo centrale del gatto nell'epidemiologia del parvovirus dei carnivori, sia come portatore del FPV e del CPV (in quanto sensibile all'infezione da entrambi), sia come fonte di nuove varianti di parvovirus [143].

Pur essendo eventi plausibili, casi di confezioni da FPV e CPV in natura non sono stati riportati in precedenza. Questo studio dimostra che le confezioni da FPV e CPV nei gatti possono generare più varianti per entrambe le specie virali e, in particolare, è stata identificata una variante di CPV intermedia alle due specie. Un lavoro precedente ha dimostrato che il CPV originò come variante d'ospite del FPV, acquisendo l'abilità di infettare il cane attraverso mutazioni multistep, consecutive ed indipendenti, nella sequenza aminoacidica della proteina del capsido (VP2) che controlla le interazioni molecolari del virus con il recettore cellulare dell'ospite (recettore per la transferrina, TfR) [101]. Questo tipo di adattamento progressivo è già stato riscontrato per altri virus, come il virus dell'influenza, ed è favorito quando le varianti virali con caratteristiche intermedie possono essere selezionate nel tempo [5].

L'ipotesi che l'emergenza del CPV sia collegata al salto di specie del virus con la trasmissione tra carnivori selvatici e domestici è confermata dall'identificazione di ceppi FPV-like con caratteristiche intermedie tra il FPV ed il CPV [106]. In quest'ottica, il ritrovamento del clone 15 del gene VP2 nel campione 998/08, contenente epitopi specifici sia al FPV che al CPV, avvalorava l'importanza di questo meccanismo evolutivo per mutazioni multistep nella produzione di nuove varianti e nell'emergenza di nuovi virus.

In conclusione, questo studio fornisce importanti risultati in merito alle dinamiche evolutive del CPV correlate all'infezione nel gatto, mostrando come il virus abbia potenzialmente iniziato una nuova fase di riadattamento nell'ospite felino e confermando l'importanza del salto d'ospite nell'emergenza di nuovi virus. Il ritrovamento nel gatto di infezioni miste da FPV e CPV, associate ad una elevata complessità genetica del parvovirus canino, enfatizza il ruolo del gatto come possibile fonte di nuove varianti di parvovirus ed accresce la necessità di condurre ulteriori indagini allo scopo di chiarire il ruolo epidemiologico del gatto nelle infezioni da parvovirus.

3. Conclusioni Generali

I virus, più di qualunque altro organismo, hanno nella capacità di evolvere in tempi relativamente rapidi il loro principale fattore di successo.

L'estrema variabilità manifestata dal genoma virale consente la generazione di mutanti con caratteristiche diverse, aumentando le probabilità del virus di adattarsi meglio all'ambiente d'origine o di conquistare nuove nicchie ecologiche precedentemente ostili. L'ambiente a cui si fa riferimento parlando di virus è l'ospite d'infezione quindi, l'adattamento del virus, esprime la capacità di svolgere al meglio il ciclo replicativo nell'organismo ospite e di trasmettersi all'interno della popolazione. A sua volta, il salto di specie, cioè il passaggio di un virus in un nuovo ospite, è considerato come la conquista di un nuovo ambiente ed è influenzato, ed influenza, la capacità evolutiva del virus stesso. Infatti, se l'evoluzione e l'acquisizione di determinate caratteristiche fenotipiche sono fondamentali per ampliare lo spettro d'ospite virale, il nuovo ambiente eserciterà una ulteriore forza selettiva, stimolando di conseguenza il processo evolutivo.

I virus si distinguono per notevoli differenze, principalmente riconducibili alle caratteristiche del genoma che li costituisce. Normalmente, i virus a RNA vengono considerati molto più variabili di quelli a DNA, in virtù della maggiore propensione all'errore che si manifesta durante la duplicazione dell'RNA. In realtà, la propensione all'errore e quindi alla mutazione, non è appannaggio dei soli virus ad RNA ma si mostra evidente anche per i virus a DNA con materiale genomico di piccole dimensioni. Inoltre, anche virus con genomi di grosse dimensioni, pur avendo una bassa frequenza di mutazione, manifestano una certa capacità evolutiva ed adattativa grazie alla variabilità di pochi siti funzionali detti "hot spot".

Nel presente lavoro sono state approfondite le dinamiche evolutive dei virus e come queste incidano sullo spettro d'ospite, prendendo in esame virus a RNA e a DNA.

Nella prima parte dello studio è stata indagata la presenza ed il processo evolutivo a cui sono soggetti i coronavirus infettanti i pipistrelli italiani. Il recente interesse per la diffusa relazione tra questa famiglia virale ed i Chiroteri è dovuto al ruolo che questi ospiti svolgono nell'emergenza di nuovi virus animali ed umani, tra cui il coronavirus della SARS. L'estrema varietà di specie e l'isolamento delle colonie di pipistrelli, sono alla base della notevole diversità caratterizzante questi complessi virus ad RNA e porta alla frequente origine di nuovi virus in grado di superare le barriere di specie e dare malattia in ospiti diversi. Dall'indagine svolta è emersa la presenza, anche in Italia, di una notevole diversità di coronavirus nei pipistrelli appartenenti alla specie *Rhinolophus ferrumequinum*, ed in particolare di virus strettamente correlati al SARS-CoV. Le peculiarità genomiche rinvenute per questi virus suggeriscono una possibile origine comune di tutti i ceppi europei ed una divergenza evolutiva con i ceppi presenti nel resto del mondo. Inoltre, l'elevata similitudine presente a livello del dominio proteico responsabile del tropismo per l'ospite tra i ceppi identificati ed il SARS-CoV, pongono

nuovi interrogativi sul ruolo svolto nell'origine del SARS-CoV e sulla possibilità futura di acquisire la capacità di infettare l'uomo.

Nella seconda parte dello studio è stato valutato il comportamento evolutivo esibito da due virus a DNA strettamente correlati tra loro, il virus della panleucopenia felina (FPV) ed il parvovirus canino (CPV). Questi due virus, in contrasto con la stretta correlazione genomica ed antigenica che li accomuna, hanno manifestato un comportamento evolutivo completamente differente, soprattutto relativamente allo spettro d'ospite. Infatti, il gatto rappresenta l'ospite tradizionale del FPV, che appare evolutivamente stabile in quanto estremamente adattato a compiere il proprio ciclo replicativo in questo animale. Al contrario, il CPV ha acquisito la capacità di infettare il gatto solo da pochi decenni e si trova nella fase di rapida evoluzione che caratterizza il processo di adattamento al nuovo ospite. L'indagine svolta ha confermato la stabilità evolutiva del FPV ed ha permesso di evidenziare la notevole variabilità a cui è soggetto il CPV. A tal proposito è stata identificata in un gatto una popolazione di quasispecie virale appartenente alla nuova variante 2c del CPV-2 e, in un altro gatto, una coinfezione da FPV e CPV-2a con la presenza di una variante di parvovirus che esibiva caratteristiche intermedie alle due specie virali. I risultati ottenuti in merito all'infezione da CPV nell'ospite felino evidenziano come il virus abbia potenzialmente iniziato una nuova fase di riadattamento ed enfatizzano il ruolo del gatto come possibile fonte di nuove varianti di parvovirus.

In conclusione, la grande variabilità dei coronavirus messa in luce nei pipistrelli è alla base dei complessi meccanismi evolutivi che possono portare al superamento delle barriere di specie. Allo stesso tempo, l'elevata variabilità che caratterizza il processo adattativo a cui sta andando incontro il parvovirus canino nel nuovo ospite felino, determina una rapida evoluzione del virus e la possibilità di originare nuove specie con caratteristiche diverse. Quindi, il lavoro condotto su virus a RNA e DNA notevolmente diversi, mette in evidenza come l'evoluzione virale e l'infezione di nuovi ospiti siano eventi costantemente connessi tra loro.

La prevenzione di futuri salti di specie e dell'emergenza di nuove patologie, in particolare di quelle a carattere zoonotico, deve considerare due aspetti. Da un lato, i meccanismi genetici ed evolutivi che permettono al virus di superare le barriere di specie e di adattarsi ad un nuovo ospite e, dall'altro, le relazioni esistenti tra gli ospiti che possono fungere da reservoir, permettendo ai virus di persistere ed evolvere al loro interno. Nel caso degli animali selvatici, che rappresentano spesso i principali serbatoi di infezione, la conservazione dell'habitat naturale e la limitazione dei contatti con l'uomo e gli animali domestici, rappresentano il primo passo fondamentale nella prevenzione del rischio di trasmissione.

Bibliografia

1. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology*. Ed.III. Volume II. **ASM Press**, Washington, DC, USA. 2009; Chapter 10:310-56.
2. Domingo E. in Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. Ed.V. Volume I. **Wolters Kluwer Health-Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, PA, USA. 2007; Section I, Chapter 12:389-421.
3. Holmes EC, Drummond AJ. *The evolutionary genetics of viral emergence*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2007;315:51-66.
4. Daniels PW, Halpin K, Hyatt A, Middleton D. *Infection and disease in reservoir and spillover hosts: determinants of pathogen emergence*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2007;315:113-31.
5. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park EC, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P. *Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2008;72(3):457-70.
6. Bolles M, Donaldson E, Baric R. *SARS-CoV and Emergent Coronaviruses: Viral Determinants of Interspecies Transmission*. **Curr Opin Virol**. 2011;1(6):624-634.
7. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. *Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event*. **J Virol**. 2005;79(3):1595-604.
8. Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. *Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence*. **Virus Genes**. 2001;23(2):137-44.
9. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. *Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses*. **Science**. 2005;310(5748):676-9.
10. Wang LF, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton BT. *Review of bats and SARS*. **Emerg Infect Dis**. 2006;12(12):1834-40.
11. Shi Z, Hu Z. *A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus*. **Virus Res**. 2008;133(1):74-87.
12. Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. *Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping*. **Exp Biol Med (Maywood)**. 2009;234(10):1117-27.

13. Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Müller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C. *Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences.* **J Virol.** 2010;84(21):11336-49.
14. Gouilh MA, Puechmaille SJ, Gonzalez JP, Teeling E, Kittayapong P, Manuguerra JC. *SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory.* **Infect Genet Evol.** 2011;11(7):1690-702.
15. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, Choi GK, Xu H, Lam CS, Guo R, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. *Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events.* **J Virol.** 2010;84(6):2808-19.
16. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats.* **Proc Natl Acad Sci USA.** 2005;102(39):14040-5.
17. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Wang M, Lam CS, Xu H, Guo R, Chan KH, Zheng BJ, Yuen KY. *Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome.* **Virology.** 2007;367(2):428-39.
18. Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Müller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF, Drosten C. *Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana.* **Emerg Infect Dis.** 2009;15(9):1377-84.
19. Quan PL, Firth C, Street C, Henriquez JA, Petrosov A, Tashmukhamedova A, Hutchison SK, Egholm M, Osinubi MO, Niezgodka M, Ogunkoya AB, Briese T, Rupprecht CE, Lipkin WI. *Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria.* **MBio.** 2010;1(4). pii: e00208-10.
20. Rihtaric D, Hostnik P, Steyer A, Grom J, Toplak I. *Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia.* **Arch Virol.** 2010;155(4):507-14.
21. Tang XC, Zhang JX, Zhang SY, Wang P, Fan XH, Li LF, Li G, Dong BQ, Liu W, Cheung CL, Xu KM, Song WJ, Vijaykrishna D, Poon LL, Peiris JS, Smith GJ, Chen H, Guan Y. *Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China.* **J Virol.** 2006;80(15):7481-90.

22. Tong S, Conrardy C, Ruone S, Kuzmin IV, Guo X, Tao Y, Niezgodá M, Haynes L, Agwanda B, Breiman RF, Anderson LJ, Rupprecht CE. *Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):482-5.
23. Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, Tsoi HW, Yip BC, Huang Y, Chan KH, Yuen KY. *Molecular diversity of coronaviruses in bats. Virology.* 2006;351(1):180-7.
24. Woo PC, Wang M, Lau SK, Xu H, Poon RW, Guo R, Wong BH, Gao K, Tsoi HW, Huang Y, Li KS, Lam CS, Chan KH, Zheng BJ, Yuen KY. *Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. J Virol.* 2007;81(4):1574-85.
25. Yuan J, Hon CC, Li Y, Wang D, Xu G, Zhang H, Zhou P, Poon LL, Lam TT, Leung FC, Shi Z. *Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in Rhinolophus sinicus and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. J Gen Virol.* 2010;91(Pt 4):1058-62.
26. Falc3n A, V3zquez-Mor3n S, Casas I, Aznar C, Ruiz G, Pozo F, Perez-Breña P, Juste J, Ib3ñez C, Garin I, Aihartza J, Echevarr3a JE. *Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. Arch Virol.* 2011;156(10):1883-90.
27. Hoelzer K, Parrish CR. *The emergence of parvoviruses of carnivores. Vet Res.* 2010;41(6):39.
28. Verge J, Christoforoni N. *La gastroenterite infectieuse des chats; est-elle due à un virus filtrable? CR Seances Soc Biol Fil.* 1928;99:312.
29. Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. *Parvovirus infections in wild carnivores. J Wildl Dis.* 2001;37(3):594-607.
30. Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR. *Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. J Virol.* 1995;69(8):4702-10.
31. Parrish CR. *Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol.* 1999;69(1-2):29-40.
32. Clegg SR, Coyne KP, Dawson S, Spibey N, Gaskell RM, Radford AD. *Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. Vet Microbiol.* 2011 Dec 24. [Epub ahead of print].
33. Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S. *High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. Virology.* 2006;352(1):22-6.

34. Hoelzer K, Shackelton LA, Holmes EC, Parrish CR. *Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. J Virol.* 2008;82(22):11096-105.
35. Mochizuki M, Ohshima T, Une Y, Yachi A. *Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. J Vet Med Sci.* 2008;70(12):1305-14.
36. Ohshima T, Mochizuki M. *Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. J Vet Med Sci.* 2009;71(4):403-8.
37. Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. *Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nat Genet.* 2002;32(4):569-77.
38. Domingo E. *Rapid evolution of viral RNA genomes. J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):958S-961S.
39. Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, Novella IS, Holland JJ. *Basic concepts in RNA virus evolution. FASEB J.* 1996;10(8):859-64.
40. Holmes EC, Rambaut A. *Viral evolution and the emergence of SARS coronavirus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359(1447):1059-65.
41. Cleaveland S, Haydon DT, Taylor L. *Overviews of pathogen emergence: which pathogens emerge, when and why? Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:85-111.
42. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martín-Hernández AM, Sáiz JC, Escarmís C. *Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):521-7.
43. Woolhouse ME, Haydon DT, Antia R. *Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. Trends Ecol Evol.* 2005;20(5):238-44.
44. Antia R, Regoes RR, Koella JC, Bergstrom CT. *The role of evolution in the emergence of infectious diseases. Nature.* 2003;426(6967):658-61.
45. Smolinski MS, Hamburg MA, Lederberg J. *Microbial Threats to Health. Emergence, Detection and Response. The National Academies Press, Washington, DC, USA.* 2003; Chapter 3:53-148.
46. Childs JE, Richt JA, Mackenzie JS. *Introduction: conceptualizing and partitioning the emergence process of zoonotic viruses from wildlife to humans. Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:1-31.
47. Real LA, Biek R. *Infectious disease modeling and the dynamics of transmission. Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:33-49.

48. Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR, Holmes EC. *Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. J Gen Virol.* 2008;89(Pt 9):2280-9.
49. Allison AB, Harbison CE, Pagan I, Stucker KM, Kaelber JT, Brown JD, Ruder MG, Keel MK, Dubovi EJ, Holmes EC, Parrish CR. *Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. J Virol.* 2012;86(2):865-72.
50. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. *Virus Taxonomy.* Ed.VIII. **Elsevier academic press**, Amsterdam, The Netherland. 2005;937-55.
51. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. *Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):531-45.
52. Altringham J.D. *Bats, biology and behaviour. Oxford university press*, New York, NY, USA. 1996; Introduction:1-4.
53. Altringham J.D. *Bats, biology and behaviour. Oxford university press*, New York, NY, USA. 1996; Chapter 7:199-229.
54. Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. *Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. J Virol.* 2010;84(24):13004-18.
55. Kunz T.H., Fenton M.B. *Bat ecology. The University of Chicago Press*, Chicago, IL, USA. 2003; Chapter 14:622-79.
56. Kunz T.H., Fenton M.B. *Bat ecology. The University of Chicago Press*, Chicago, IL, USA. 2003; Chapter 1:3-89.
57. Altringham J.D. *Bats, biology and behaviour. Oxford university press*, New York, NY, USA. 1996; Chapter 6:155-98.
58. Kunz T.H., Fenton M.B. *Bat ecology. The University of Chicago Press*, Chicago, IL, USA. 2003; Chapter 4:156-208.
59. Altringham J.D. *Bats, biology and behaviour. Oxford university press*, New York, NY, USA. 1996; Chapter 4:115-32.
60. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.

61. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ; SARS Working Group. *A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med.* 2003;348(20):1953-66.
62. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY; SARS study group. *Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet.* 2003;361(9366):1319-25.
63. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Peñaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Günther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. *Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science.* 2003;300(5624):1394-9.
64. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;52(11):226-8.
65. Peiris JS, Guan Y, Yuen KY. *Severe acute respiratory syndrome. Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S88-97.
66. Skowronski DM, Astell C, Brunham RC, Low DE, Petric M, Roper RL, Talbot PJ, Tam T, Babiuk L. *Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review. Annu Rev Med.* 2005;56:357-81.
67. Li W, Wong SK, Li F, Kuhn JH, Huang IC, Choe H, Farzan M. *Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions. J Virol.* 2006;80(9):4211-9.
68. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP. *Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(7):2430-5.

69. Graham RL, Baric RS. *Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission.* **J Virol.** 2010;84(7):3134-46.
70. Chu DK, Poon LL, Chan KH, Chen H, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. *Coronaviruses in bent-winged bats (*Miniopterus spp.*).* **J Gen Virol.** 2006;87(Pt 9):2461-6.
71. Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. *Identification of a novel coronavirus in bats.* **J Virol.** 2005;79(4):2001-9.
72. Brandão PE, Scheffer K, Villarreal LY, Achkar S, Oliveira Rde N, Fahl Wde O, Castilho JG, Kotait I, Richtzenhain LJ. *A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*.* **Braz J Infect Dis.** 2008;12(6):466-8.
73. Carrington CV, Foster JE, Zhu HC, Zhang JX, Smith GJ, Thompson N, Auguste AJ, Ramkissoon V, Adesiyun AA, Guan Y. *Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats.* **Emerg Infect Dis.** 2008;14(12):1890-3.
74. Dominguez SR, O'Shea TJ, Oko LM, Holmes KV. *Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America.* **Emerg Infect Dis.** 2007;13(9):1295-300.
75. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbini RM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Müller MA, Drosten C. *Amplification of emerging viruses in a bat colony.* **Emerg Infect Dis.** 2011;17(3):449-56.
76. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Götsche M, Panning M, Felix Drexler J, Petersen N, Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C. *Detection and prevalence patterns of group 1 coronaviruses in bats, northern Germany.* **Emerg Infect Dis.** 2008;14(4):626-31.
77. Misra V, Dumonceaux T, Dubois J, Willis C, Nadin-Davis S, Severini A, Wandeler A, Lindsay R, Artsob H. *Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada.* **J Gen Virol.** 2009;90(Pt 8):2015-22.
78. Osborne C, Cryan PM, O'Shea TJ, Oko LM, Ndaluka C, Calisher CH, Berglund AD, Klavetter ML, Bowen RA, Holmes KV, Dominguez SR. *Alphacoronaviruses in New World bats: prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans.* **PLoS One.** 2011;6(5):e19156.
79. Reusken CB, Lina PH, Pielaat A, de Vries A, Dam-Deisz C, Adema J, Drexler JF, Drosten C, Kooi EA. *Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in Western Europe.* **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2010;10(8):785-91.
80. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S,

- Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. *Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan.* **Virus Genes.** 2011 Aug 30. [Epub ahead of print],
81. Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. *Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines.* **Emerg Infect Dis.** 2010;16(8):1217-23.
 82. Vijaykrishna D, Smith GJ, Zhang JX, Peiris JS, Chen H, Guan Y. *Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses.* **J Virol.** 2007;81(8):4012-20.
 83. Stockman LJ, Haynes LM, Miao C, Harcourt JL, Rupprecht CE, Ksiazek TG, Hyde TB, Fry AM, Anderson LJ. *Coronavirus antibodies in bat biologists.* **Emerg Infect Dis.** 2008;14(6):999-1000.
 84. Hou Y, Peng C, Yu M, Li Y, Han Z, Li F, Wang LF, Shi Z. *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry.* **Arch Virol.** 2010;155(10):1563-9.
 85. Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, Hu Z, Zhao G, Fontanet A, Guan Y, Wang L, Jones G, Field HE, Daszak P, Zhang S. *Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts.* **Emerg Infect Dis.** 2007;13(10):1526-32.
 86. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Kraiden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. *The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus.* **Science.** 2003;300(5624):1399-404.
 87. Oostra M, de Haan CA, Rottier PJ. *The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8.* **J Virol.** 2007;81(24):13876-88.
 88. Ren W, Li W, Yu M, Hao P, Zhang Y, Zhou P, Zhang S, Zhao G, Zhong Y, Wang S, Wang LF, Shi Z. *Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis.* **J Gen Virol.** 2006;87(Pt 11):3355-9.
 89. Ren W, Qu X, Li W, Han Z, Yu M, Zhou P, Zhang SY, Wang LF, Deng H, Shi Z. *Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS)*

- coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. J Virol.* 2008;82(4):1899-907.
90. Yu M, Tachedjian M, Crameri G, Shi Z, Wang LF. *Identification of key amino acid residues required for horseshoe bat angiotensin-I converting enzyme 2 to function as a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Gen Virol.* 2010;91(Pt 7):1708-12.
 91. Müller MA, Paweska JT, Leman PA, Drosten C, Grywna K, Kemp A, Braack L, Sonnenberg K, Niedrig M, Swanepoel R. *Coronavirus antibodies in African bat species. Emerg Infect Dis.* 2007;13(9):1367-70.
 92. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. *Virus Taxonomy.* Ed.VIII. **Elsevier academic press**, Amsterdam, The Netherland. 2005;353-69.
 93. Clegg SR, Coyne KP, Parker J, Dawson S, Godsall SA, Pinchbeck G, Cripps PJ, Gaskell RM, Radford AD. *Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic. J Virol.* 2011;85(15):7892-9.
 94. Green CE. *Infectious Diseases of the dog and cat.* Ed.III. **Saunders-Elsevier**, St Louis, MO, USA. 2006; Chapter 8:63-71.
 95. Green CE. *Infectious Diseases of the dog and cat.* Ed.III. **Saunders-Elsevier**, St Louis, MO, USA. 2006; Chapter 10:78-88.
 96. Hueffer K, Parrish CR. *Parvovirus host range, cell tropism and evolution. Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):392-8.
 97. Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR. *Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. Virology.* 1994;198(1):175-84.
 98. Wikoff WR, Wang G, Parrish CR, Cheng RH, Strassheim ML, Baker TS, Rossmann MG. *The structure of a neutralized virus: canine parvovirus complexed with neutralizing antibody fragment. Structure.* 1994;2(7):595-607.
 99. Truyen U, Agbandje M, Parrish CR. *Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. Virology.* 1994;200(2):494-503.
 100. Hueffer K, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Parrish CR. *Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. J Virol.* 2003;77(18):10099-105.
 101. Hueffer K, Parker JS, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY, Parrish CR. *The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from*

- virus-specific binding to the canine transferrin receptor. J Virol.* 2003;77(3):1718-26.
102. Johnson RH, Margolis G, Kilham L. *Identity of feline ataxia virus with feline panleukopenia virus. Nature.* 1967;214(5084):175-7.
 103. Koptopoulos G, Papadopoulos O, Papanastasopoulou M, Cornwell HJ. *Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. Vet Rec.* 1986;118(12):332-3.
 104. Truyen U. *Emergence and recent evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol.* 1999;69(1-2):47-50.
 105. Veijalainen P. *Characterization of biological and antigenic properties of raccoon dog and blue fox parvoviruses: a monoclonal antibody study. Vet Microbiol.* 1988;16(3):219-30.
 106. Truyen U, Müller T, Heidrich R, Tackmann K, Carmichael LE. *Survey on viral pathogens in wild red foxes (Vulpes vulpes) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. Epidemiol Infect.* 1998;121(2):433-40.
 107. Parrish CR. *Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. Virology.* 1991;183(1):195-205.
 108. Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, Evermann JF, Senda M, Carmichael LE. *The global spread and replacement of canine parvovirus strains. J Gen Virol.* 1988;69 (Pt 5):1111-6.
 109. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. *Natural variation of canine parvovirus. Science.* 1985;230(4729):1046-8.
 110. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. *Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J Gen Virol.* 2001;82(Pt 12):3021-5.
 111. Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. *High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(2):379-84.
 112. Url A, Truyen U, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Schmidt P. *Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3801-5.
 113. Battilani M, Gallina L, Vaccari F, Morganti L. *Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). Vet Res Commun.* 2007;31 Suppl 1:209-12.

114. Shackelton LA, Hoelzer K, Parrish CR, Holmes EC. *Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses.* **J Gen Virol.** 2007;88(Pt 12):3294-301.
115. Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, Terio V, Elia G, Lucente MS, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. *Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia.* **Res Vet Sci.** 2010;89(2):275-8.
116. Decaro N, Desario C, Amorisco F, Losurdo M, Colaianni ML, Greco MF, Buonavoglia C. *Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions.* **J Feline Med Surg.** 2011;13(4):231-6.
117. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E. *Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats.* **Virology.** 2000;278(1):13-9.
118. Mochizuki M, Horiuchi M, Hiragi H, San Gabriel MC, Yasuda N, Uno T. *Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia.* **J Clin Microbiol.** 1996;34(9):2101-5.
119. Chalmers WS, Truyen U, Greenwood NM, Baxendale W. *Efficacy of feline panleucopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat.* **Vet Microbiol.** 1999;69(1-2):41-5.
120. Smith CS, de Jong CE, Crameri G, McEachern J, Yu M, Corney B, Bulach DM, Tachedjian M, Meers J, Henning J, Wang L-F, Field HE. *Molecular Identification of Group 1 and Group 2 Coronaviruses in Australian Bats.* Unpublished. Direct submission of nucleotide GenBank sequences.
121. Chu DK, Peiris JS, Chen H, Guan Y, Poon LL. *Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in Miniopterus bats.* **J Gen Virol.** 2008;89(Pt 5):1282-7.
122. Lau SK, Poon RW, Wong BH, Wang M, Huang Y, Xu H, Guo R, Li KS, Gao K, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. *Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Rousettus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup.* **J Virol.** 2010;84(21):11385-94.
123. Battilani M, Coradin T, Scagliarini A, Ciulli S, Ostanello F, Prosperi S, Morganti L. *Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats.* **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2003;39(2):141-7.
124. Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, Thorén P, Klingeborn B, Belák S, Berg M, Blomberg J. *SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses.* **Arch Virol.** 2007;152(1):41-58.

125. US Environmental Protection Agency. *Quality assurance/quality control guidance for laboratories performing PCR analysis on environmental samples*. **US Environmental Protection Agency**, Washington, DC. 2004. http://www.epa.gov/nerlcwww/qa_qc_pcr10_04.pdf.
126. Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. *Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats*. **Vet Res**. 2011;42(1):43.
127. Hon CC, Lam TY, Shi ZL, Drummond AJ, Yip CW, Zeng F, Lam PY, Leung FC. *Evidence of the recombinant origin of a bat severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus and its implications on the direct ancestor of SARS coronavirus*. **J Virol**. 2008;82(4):1819-26.
128. Zhang XW, Yap YL, Danchin A. *Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus*. **Arch Virol**. 2005;150(1):1-20.
129. Battilani M, Bassani M, Forti D, Morganti L. *Analysis on the evolution of feline parvovirus (FPV)*. **Vet Res Commun**. 2006;30(Suppl 1):223-226.
130. Truyen U, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. *Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management*. **J Feline Med Surg**. 2009;11(7):538-46.
131. Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza A, Buonavoglia C. *Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis*. **J Gen Virol**. 2008;89(Pt 9):2290-8.
132. Schunck B, Kraft W, Truyen U. *A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces*. **J Virol Methods**. 1995;55(3):427-33.
133. Librado P, Rozas J. *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. **Bioinformatics**. 2009;25(11):1451-2.
134. Nei M, Miller JC. *A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data*. **Genetics**. 1990;125(4):873-9.
135. Pond SL, Frost SD. *Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments*. **Bioinformatics**. 2005;21(10):2531-3.
136. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD. *Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm*. **Mol Biol Evol**. 2006;23(10):1891-901.

137. Posada D, Crandall KA. *MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics*. 1998;14(9):817-8.
138. Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C. *Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. Virology*. 2009;385(1):5-10.
139. Yang S, Wang S, Feng H, Zeng L, Xia Z, Zhang R, Zou X, Wang C, Liu Q, Xia X. *Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey. Vet Microbiol*. 2010;143(2-4):155-9.
140. Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. *Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. Virus Genes*. 2006;33(1):11-3.
141. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. *Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. New Microbiol*. 2008;31(1):125-30.
142. Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmís C, Domingo E. *Memory in viral quasispecies. J Virol*. 2000;74(8):3543-7.
143. Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Takahashi E, Mochizuki M. *Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. Emerg Infect Dis*. 2002;8(4):341-6.

Pubblicazione 1

SHORT REPORT

Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats

A. BALBONI¹, A. PALLADINI², G. BOGLIANI² AND M. BATTILANI^{1*}

¹ Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, University of Bologna, Italy

² Department of Animal Biology, University of Pavia, Italy

(Accepted 19 April 2010; first published online 18 May 2010)

SUMMARY

The association between coronaviruses and bats is a worldwide phenomenon and bats belonging to genus *Rhinolophus* are the reservoir host for several coronaviruses, including a large number of viruses closely related genetically to severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV). We carried out a survey in colonies of Italian bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) for the presence of coronaviruses. Two of 52 *R. ferrumequinum* captured from different Italian areas tested positive by reverse transcription PCR for a fragment of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene of viruses related to *Coronavirus*. Phylogenetic analysis revealed close correlations between one of the positive samples and SARS-related CoV belonging to the genus *Betacoronavirus*.

Key words: Bats, coronavirus, *Rhinolophus* spp, SARS.

Coronaviruses (CoVs) are a group of enveloped, single-stranded RNA, positive-strand viruses with a corona-like morphology. CoVs have diverse animal hosts ranging from mammalian to avian species, causing mainly enteric and respiratory diseases of varying severity.

In particular, the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV), is the aetiological agent of SARS disease, which caused a global human epidemic in 2002–2003, resulting in more than 8000 infections and more than 700 deaths [1].

Several studies indicate that bats might be the natural reservoir for several viruses closely related genetically to SARS-CoV, the SARS-like coronaviruses (SARS-like CoVs), and that all mammalian CoVs were derived from ancestor viruses residing in bats [2]. The association between CoVs and bats is

a worldwide phenomenon, in fact, after the initial discovery of this virus in Chinese bats [3, 4], recent studies have confirmed their presence in bats from Europe, Africa, and South and North America.

In particular, bats belonging to the genus *Rhinolophus* (suborder Microchiroptera, family Rhinolophidae) are reservoir hosts for several species of CoVs, including the SARS-like CoVs [5–7].

The recent discovery of novel CoVs in bats has led the Coronavirus Study Group of the International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) to propose a reclassification of the family Coronaviridae into two subfamilies, Coronavirinae and Torovirinae. The subfamily Coronavirinae comprises only three genera, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, and *Gammacoronavirus*, which have replaced the traditional antigenic groups 1, 2, and 3, respectively [2]. All mammalian CoVs, including all bat CoVs detected up to now and SARS-CoV, belong to the *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* genera, whereas all avian CoVs belong to the genus *Gammacoronavirus*.

* Author for correspondence: Dr M. Battilani, Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, Università di Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064-Ozzano Emilia (Bo), Italy. (Email: mara.battilani@unibo.it)

This study examined the presence of CoVs in Italian colonies of the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*, which is one of about 70 species of the genus *Rhinolophus* widely distributed in tropical and temperate regions of Asia, Africa, Europe, and Australia. All bat species in Italy are protected by national and international laws. *R. ferrumequinum* is a vulnerable species according to the Italian Mammals Red List 2007 because of human disturbance of its roosting sites, mainly caves and abandoned buildings, and of the progressive depletion and fragmentation of its habitats.

Fifty-two *R. ferrumequinum* specimens were captured from different roosts spread over peninsular Italy, including caves, mines and abandoned houses, over a 5-month period (from July to November 2009). All captures were authorized by the Italian Ministry of the Environment and were part of a Ph.D. project on *R. ferrumequinum* conservation.

Bats were caught using harp traps and put singly into cotton bags prior to subsequent investigation. Once species, sex, age category (juvenile, subadult, adult), forearm length and weight were determined, bats were released at their capture site.

Faeces (41 samples) or anal swabs (11 samples, collected if the bat did not produce a fresh bolus during handling) were collected and kept in 2 ml RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen, Germany) to allow the conservation of RNA during transport. Samples were then conserved at -80°C before processing.

Viral RNA extraction from faecal samples was performed by using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and CoV screening was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using conserved primers for the RNA-dependent RNA polymerase gene (forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' and reverse: 5'-CCATCATCAGATAGATCATCATA-3') frequently used for CoV detection and subsequent phylogenetic analysis [3, 4, 5, 7].

RT-PCR was performed using the Titanium One-Step RT-PCR kit (Clontech, USA), in a total volume of 50 μl , using a RNA extract of feline coronavirus (FCoV)-positive sample as positive control. The mixtures were amplified as follows: (i) initial reverse transcription at 50°C for 60 min, and 94°C for 5 min; (ii) 40 cycles of amplification with 1 cycle consisting of 1 min at 94°C , 1 min at 48°C , and 1 min at 68°C ; (iii) final further elongation at 68°C for 10 min. Standard precautions were taken to avoid PCR

contamination, and water controls included in all RT-PCR assays did not show false-positive results.

PCR products (5 μl each) were electrophoresed in 2.0% agarose gels in standard TAE buffer and visualized by UV light after staining with GelRed (Biotium, USA).

Positive PCR products of the expected size of 440 bp, were detected in 2/52 samples examined with 3.8% virus prevalence. Both positives were from faecal samples, whereas none of the 11 anal swab specimens tested positive by RT-PCR. It is possible that the absence of positive results in the anal swab specimens was due to the small quantity of faecal material collected with this technique.

The two positive samples, 771/09-5 and 893/09-11, came from different Italian regions, one in the north and the other in the south, from the provinces of Modena and Foggia, respectively.

Nucleotide sequence of the sample 893/09-11 was obtained by direct sequencing of PCR product with an ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA); whereas for sample 771/09-5, it was not possible to obtain a reading sequence of good quality, probably due to the limited amount of genetic material in the faecal sample. The 893/09-11 sequence was aligned and compared to 48 selected human and animal CoV sequences available from the GenBank database using ClustalW software implemented in BioEdit version 7.0.5.

The phylogenetic relationships were evaluated using MEGA version 4.0; pairwise genetic distances were calculated by the Tamura 3-parameter model and phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method. Bootstrap values were determined by 1000 replicates to assess the confidence level of each branch pattern (Fig. 1).

The comparison of RdRp gene fragment reference sequences to the sequence of sample 893/09-11 showed a percentage of nucleotide identity ranging from 86% to 91% with unclassified CoV group 2b, and a value of 89% of similarity with SARS-CoVs. The percentage of nucleotide identity decreased to values which varied from 69% to 67% with bat CoVs of the genus *Betacoronavirus*, to 57–64% with bat CoVs of the genus *Alphacoronavirus* and to 53–59% with mammalian non-bat CoVs of both genera, *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* (with the exception of 64% of human CoV NL63). Furthermore, sample 893/09-11 had highly variable values of nucleotide identity when compared to some unclassified bat CoVs, e.g. with A1018/2005 and SLO1A0066/2008/SVN

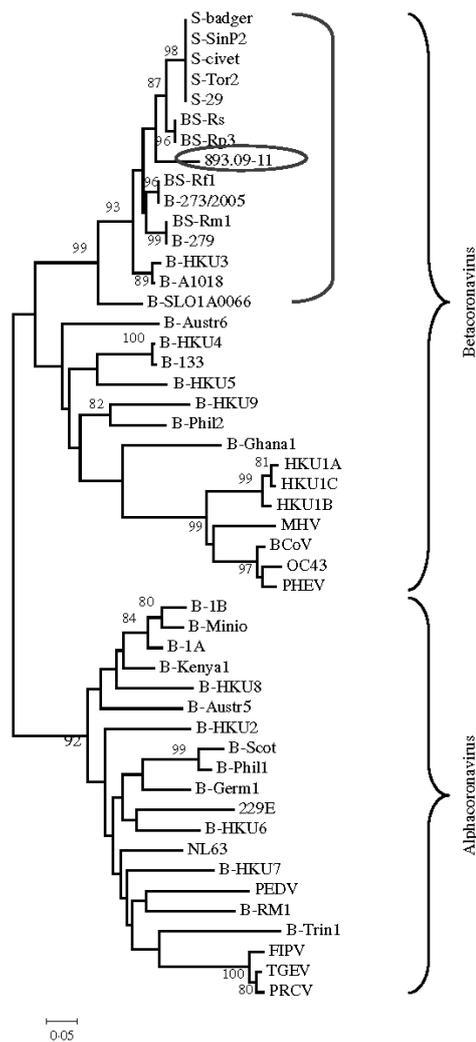


Fig. 1. Phylogenetic relationship of 893/09-11 with 48 alphacoronaviruses and betacoronaviruses obtained from GenBank. The tree was generated based on a fragment of RNA-dependent RNA polymerase region by the neighbour-joining method in the MEGA program. Numbers to the left of branches are bootstrap values $\geq 80\%$, calculated from 1000 bootstrap replicates. Circled: 893/09-11; bracketed: coronavirus group 2b, SARS-related coronavirus and some unclassified coronavirus. Sequences obtained from GenBank: S-civet (AY304488), S-badger (AY545919), S-29 (CQ903025), S-SinP2 (AY559089), S-Tor2 (NC_004718), BS-Rs (NC_013664), BS-Rp3 (NC_009693), BS-Rf1 (NC_009695), B-273/2005 (DQ648856), BS-Rm1 (NC_009696), B-279 (DQ648857), B-HKU3 (NC_009694), B-A1018 (DQ648795), B-SLO1A0066 (GQ404795), B-Austr6 (EU834950), B-HKU4 (NC_009019), B-133 (NC_008315), B-HKU5 (NC_009020), B-HKU9 (NC_009021), B-Phil2 (AB539081), B-Ghana1 (FJ710053), HKU1A (NC_006577), HKU1B (AY884001), HKU1C (DQ339101), MHV (NC_001846), BCoV (NC_003045), OC43 (NC_005147), PHEV

strains it had a percentage of 84–87%, while the nucleotide identity with other strains, such as Kenya bat CoV BtKY42 and Bat CoV *Hipposideros/GhanaKwam/10/2008*, was 64% (data not shown).

From these values of nucleotide identity it can be assumed that a strict correlation exists between 893/09-11 and CoVs related to SARS (human SARS-CoV, civet, and ferret badger SARS-CoV, and SARS-related *Rhinolophus* bat CoV) rather than to other bat and mammalian CoVs.

These findings are supported by the phylogenetic tree created with this fragment of the RdRp gene that suggests sample 893/09-11 was grouped together with SARS-CoVs, SARS-related CoVs and a few unclassified CoVs (Fig. 1). Data are supported by bootstrap values $> 90\%$.

To our knowledge, this is the first report of the detection of CoVs in bats of the genus *Rhinolophus* in Italy. The genetic analysis of the sequence obtained in this study has supported evidence that the virus is related to the SARS-like CoVs from the genus *Betacoronavirus*. This finding is similar to that obtained from another study conducted in Slovenia [7].

In our study we detected a virus prevalence of 3.8%, which appears to be lower than those found in Asia or in other European countries, where it is usually higher than 10%, reaching 30–40% in particular bat species and geographical locations. This low number of infected bats may signify a genuine low prevalence of CoV infection in Italian bats. It may be that the climatic or geographical conditions influence the social behaviour of bats, reducing the length of displacements and meetings between bats, thus reducing virus transmission (or circulation).

Alternatively, the low number of infected bats detected may also be due to small amounts of viral RNA in the faecal samples or a suboptimal match of the primers used for RT-PCR with genetically more divergent CoVs.

In conclusion, our report provides some information about the ecology and evolution of CoVs in wildlife, confirming the widespread association between CoVs and several bat species in Europe, as

(NC_007732), B-1B (NC_010436), B-Mino (AY864197), B-1A (NC_010437), B-Kenya1 (GQ920838), B-HKU8 (NC_010438), B-Austr5 (EU834951), B-HKU2 (NC_009988), B-Scot (NC_009657), B-Phil1 (AB539080), B-Germ1 (EU375875), 229E (NC_002645), B-HKU6 (DQ249224), NL63 (NC_005831), B-HKU7 (DQ249226), PEDV (NC_003436), B-RM1 (EF544565), B-Trin1 (EU769558), FIPV (AY994055), TGEV (NC_002306), PRCV (DQ811787).

recently reported in Germany, The Netherlands, and Slovenia [7–9].

SARS-like CoVs are widespread in Asia, Africa, and Europe, and are mainly associated, in Asia and Europe, with horseshoe bats. Bat species belonging to the genus *Rhinolophus* have a greater importance in CoV ecology compared to other bat species for the great variety in alphacoronaviruses and betacoronaviruses identified therein and, in particular, for the close correlation that some CoVs detected in *Rhinolophus* spp. (SARS-related *Rhinolophus* bat CoV) have with SARS-CoV. In the light of these results, it is likely that SARS-related *Rhinolophus* bat CoVs have a key role in the evolutionary history of SARS-CoV and in the possible future emergence of new zoonotic CoV variants [6, 10].

The detection of CoVs in Italian bat populations and the close genetic correlation of Italian *Rhinolophus* CoV with human CoVs, underline the necessity to conduct further investigation to assess the prevalence of CoVs in Italian horseshoe bats and to determine the ecological relationships between bats, humans and other animals. Further understanding of virus maintenance in natural hosts, molecular mechanisms underlying interspecies jumping and zoonotic potential of *Rhinolophus* CoV are essential to contain emerging viruses and concurrently protect our wildlife heritage.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine* 2004; **10**: 88–97.
2. Woo PCY, et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine* 2009; **234**: 1117–1127.
3. Lau SKP, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005; **102**: 14040–14045.
4. Poon LLM, et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *Journal of Virology* 2005; **79**: 2001–2009.
5. Lau SKP, et al. Complete genome sequence of coronavirus HKU2 from Chinese Horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome. *Virology* 2007; **367**: 428–439.
6. Tang X, et al. Differential stepwise evolution of SARS coronavirus functional proteins in different host species. *BMC Evolutionary Biology* 2009; **9**: 52.
7. Rihtaric D, et al. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Archives of Virology* (in press).
8. Gloza-Rausch F, et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, Northern Germany. *Emerging Infectious Diseases* 2008; **14**: 626–631.
9. Reusken CBEM, et al. Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in western Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2010; **10**: 1–7.
10. Lau SKP, et al. Eco-epidemiology and complete genome comparison of SARS-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *Journal of Virology* (in press).

Pubblicazione 2

Research Article

A Real-Time PCR Assay for Bat SARS-Like Coronavirus Detection and Its Application to Italian Greater Horseshoe Bat Faecal Sample Surveys

Andrea Balboni,¹ Laura Gallina,¹ Alessandra Palladini,² Santino Proserpi,¹ and Mara Battilani¹

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia, Italy

² Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia, Via Taramelli 24, 27100 Pavia, Italy

Correspondence should be addressed to Mara Battilani, mara.battilani@unibo.it

Received 5 October 2011; Accepted 16 November 2011

Academic Editors: R. Marquet, M. McCrae, and S. Y. Morozov

Copyright © 2012 Andrea Balboni et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bats are source of coronaviruses closely related to the severe acute respiratory syndrome (SARS) virus. Numerous studies have been carried out to identify new bat viruses related to SARS-coronavirus (bat-SARS-like CoVs) using a reverse-transcribed-polymerase chain reaction assay. However, a qualitative PCR could underestimate the prevalence of infection, affecting the epidemiological evaluation of bats in viral ecology. In this work an SYBR Green-real time PCR assay was developed for diagnosing infection with SARS-related coronaviruses from bat guano and was applied as screening tool in a survey carried out on 45 greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) sampled in Italy in 2009. The assay showed high sensitivity and reproducibility. Its application on bats screening resulted in a prevalence of 42%. This method could be suitable as screening tool in epidemiological surveys about the presence of bat-SARS-like CoVs, consequently to obtain a more realistic scenario of the viral prevalence in the population.

1. Introduction

Among the human viral epidemics which have emerged in the past ten years, one of the most important is represented by the outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) which appeared in China in 2002-2003, rapidly causing a human epidemic [1].

Several studies showed, firstly, that a new coronavirus was the aetiological agent of SARS, the SARS-CoV [2], and subsequently bats were the natural reservoir for several viruses closely related genetically to the SARS-CoV, the SARS-like coronaviruses (SARS-like CoVs) [3]. At present, the presence of SARS-like CoVs in bats has been demonstrated in Asia, Africa, and Europe [4-9], showing the wide diffusion of these viruses.

Bats play a critical role in the ecology and evolution of these viruses; therefore, numerous studies have been carried out to identify new bat-SARS-like CoVs and to

understand the mechanisms of transmission from animal hosts to humans.

In most of the surveys carried out on bat-SARS-like CoVs, the preferred technique for the initial screening of population samples has been a reverse-transcribed-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay or an RT-nested PCR assay on RNA extracted from faecal samples. The primers used for the PCR reaction generally amplified a fragment of the RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp, the 12th nonstructural protein encoded by ORF1a, b), a conserved feature of the coronavirus genome which was also frequently used for subsequent phylogenetic analysis [4, 8, 10-16]. However, this technique may not have an optimal sensitivity, causing an underestimation of the true prevalence of infection, which may be due to a low amount of viral clearance in the faeces during the infection, too low to be detected by traditional PCR methods.

Real-time PCR assay is a method with a significantly lower limit of detection than conventional PCR, allowing to increase the sensitivity of diagnostic test. In spite of high sensitivity, until now, only a few authors have used this technique in their epidemiological surveys [5, 10, 13]. The developed real-time PCRs described by other authors have used primers designed on viral sequences found in local geographical areas; therefore, it is uncertain whether these assays are able to detect viruses from other areas, in light of the high genetic variability of the coronaviruses.

The aim of this work was to develop a real-time PCR assay for diagnosing infection with SARS-related coronaviruses from bat guano in order to use it as a screening tool in epidemiological surveys for the detection of the viruses. For this purpose, an SYBR Green real-time PCR assay, amplifying a fragment of the RdRp gene for the generic detection of the coronavirus [17], was modified to increase the specificity towards the SARS-related coronavirus. The developed SYBR Green real-time PCR techniques were applied to an SARS-like coronavirus survey carried out on 45 greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) which were sampled in Italy in 2009, resulting in a prevalence of coronavirus infection of 42%.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling from Bats. Forty-five greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) specimens were captured from different roosts in all of Italy, including caves, mines, and abandoned houses, over a 4-month period (from August to November 2009) (Figure 1 and Table 1). All captures were authorised by the Italian Ministry of the Environment and were part of a Ph.D. project on *Rhinolophus ferrumequinum* conservation.

The bats were caught using harp traps and placed individually into cotton bags before subsequent investigation started. Once species, sex, age category (juvenile, subadult, adult), forearm length, and weight were determined, the bats were released at their capture site.

The faeces were immediately collected when bats produced fresh bolus during handling and kept in 2 mL of RNAlater RNA stabilisation reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) permitting RNA conservation during transport. The samples were then conserved at -80°C before processing.

2.2. RNA Extraction and cDNA Synthesis. Faecal boluses of each sampled bat were suspended in $200\ \mu\text{L}$ of phosphate buffered saline (PBS) $\text{pH } 7.2 \pm 0.2$, and viral RNA extraction was performed beginning with $140\ \mu\text{L}$ of suspended faeces by using the QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Germany) following the supplier's recommendations. Extracted RNA was stored at -80°C . First-strand cDNA was synthesised using random hexamers with the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions, and was stored at -20°C .



FIGURE 1: Distribution of bat sampling in Italy. Sites of bat sampling from August to November 2009. For correspondence between letters and places, see Table 1.

2.3. Primer Design. The forward and reverse primers were designed on the basis of the 11FW and 13RV degenerate primers which amplified a fragment of RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp), previously published by Escutenaire et al. [17]. The sequences of the two primers were modified on the basis of a multiple sequence alignment including 10 SARS-related coronavirus reference strains available from the GenBank database in order to increase the specificity of the primers towards the bat-SARS-like coronaviruses (Figure 2). Reference sequences were aligned using ClustalW software implemented with BioEdit version 7.0.5.

Using 11FW-modified (5'-TGA TGA TGC CGT CGT GTG CTA CAA-3') and 13RV-modified (5'-TGT GAG CAA AAT TCG TGA GGT CC-3') primers, a 168 bp fragment located between the nt 15647–15814 (Coronavirus, SARS-CoV Tor2; NC_004718) was able to be detected.

2.4. Preparation of Standard DNA. A pCR4 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing a copy of the RdRp target sequence was produced as the external standard for the construction of the assay standard curve.

The template DNA to be inserted as a target sequence in the plasmid vector was produced by amplifying the cDNA obtained from sample 893/09-11, an Italian bat-SARS-like CoV detected and only partially sequenced by the authors in

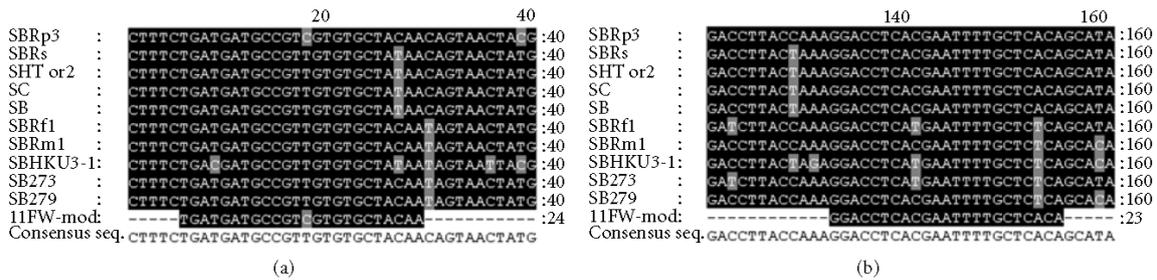


FIGURE 2: Multiple sequence alignment of primer binding sites. The alignments include 10 SARS-related coronavirus reference strains: SBRp3 (Bat SARS CoV Rp3/2004, DQ071615, identified from *Rhinolophus pearsoni*), SBRs (SARS coronavirus Rs_672/2006, FJ588686, identified from *Rhinolophus sinicus*), SHTor2 (SARS coronavirus Tor2, AY274119, identified from Human), SC (Civet SARS CoV SZ16/2003, AY304488, identified from *Paguma larvata*), SB (SARS coronavirus isolate CFB/SZ/94/03, AY545919, identified from *Melogale moschata*), SBRf1 (Bat SARS CoV Rf1/2004, DQ412042, identified from *Rhinolophus ferrumequinum*), SBRm1 (Bat SARS CoV Rm1/2004, DQ412043, identified from *Rhinolophus macrotis*), SBHKU3-1 (Bat coronavirus HKU3, DQ022305, identified from *Rhinolophus sinicus*), SB273 (Bat CoV 273/2005, DQ648856, identified from *Rhinolophus ferrumequinum*), and SB279 (Bat CoV 279/2005, DQ648857, identified from *Rhinolophus macrotis*).

TABLE 1: Bats tested for coronavirus infection using SYBR Green real-time PCR assay.

	Location	Date	No. of bats	Positives
A	San Cesario sul Panaro, MO	16/08/2009	11	10
B	Sigillo, PG	18/09/2009	1	0
C	Monte Croara, S. Lazzaro, BO	05/10/2009	2	0
D	Piobesi d'Alba, CN	11/10/2009	10	0
E	Rossana, CN	11/10/2009	12	3
F	Giovo, SV	19/10/2009	3	3
G	Val di Trebbia, PC	20/10/2009	3	1
H	Castell'arquato, PC	04/11/2009	3	2
	Total		45	19

a preceding survey [4]. A conventional PCR was carried out by Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) using 11FW-modified and 13RV-modified primers; the thermal cycler conditions consisted of an initial incubation at 94°C for 5 min followed by 50 cycles of denaturation at 94°C for 40 sec, annealing at 50°C for 40 sec, and polymerisation at 72°C for 40 sec. A final cycle of extension at 72°C for 30 min was performed to produce a single 3' deoxyadenosine (A) overhang.

The amplification product was purified by the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the supplier's recommendations and was cloned into the pCR4 vector using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, The Netherlands), according to the manufacturer's instructions. The resulting recombinant plasmid purification was carried out using the PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Leek, The Netherlands); purity was assessed by a spectrophotometer using the 260/280 nm ratio.

In order to simulate the amplification efficiency of viral reverse-transcribed RNA more closely and to avoid the presence of supercoiled plasmid DNA, the plasmid was linearised above the bat-SARS-like CoV fragment sequence using restriction endonuclease Spe I (Fermentas, Burlington,

Ontario, Canada). The linearised plasmid was visualised and quantified by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide in 1x standard TAE buffer and using a Quick-Load 1Kb DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). The copy number (CN) of standard plasmid DNA was calculated using the equation described by the US Environmental Protection Agency protocol [18].

2.5. SYBR Green Real-Time PCR. The real-time PCR was performed using the SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio inc., Shiga, Japan) and the Rotor-Geen 3000 system (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The fluorescence signal was acquired on the FAM channel (multi channel machine, source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) with a fluorescence reading taken at the end of each elongation step.

The SYBR Green real-time PCR was performed in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of SYBR Premix Ex Taq II, 0.4 µM of forward (11FW-modified) and reverse (13RV-modified) primers and 2 µL of template DNA. Autoclaved nanopure water was added to arrive at a final volume of 25 µL.

Each run consisted of an initial incubation for activation of the hot-start DNA polymerase at 95°C for 30 sec followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing

TABLE 2: Intra- and interassay variability of the SYBR green real-time PCR method.

Samples	Replicate (and assay) numbers	Intra- and interassay variability		
		Mean (SD)	log ₁₀ mean (SD)	log ₁₀ CV%
Intraassay variability				
A1	3 (1)	1,86E + 06 (2,35E + 05)	6,27 (0,05)	0,84
A2	3 (1)	2,03E + 05 (1,77E + 04)	5,31 (0,04)	0,71
A3	3 (1)	2,00E + 04 (8,96E + 02)	4,30 (0,02)	0,45
A4	3 (1)	2,26E + 03 (2,53E + 02)	3,35 (0,05)	1,41
A5	3 (1)	2,09E + 02 (8,22)	2,32 (0,02)	0,74
A6	3 (1)	1,98E + 01 (5,29)	1,28 (0,13)	9,99
A7	3 (1)	2,09E + 00 (0,44)	0,31 (0,09)	28,58
B1	3 (1)	5,79E + 02 (4,65E + 01)	2,76 (0,03)	1,27
B2	3 (1)	2,00E + 00 (0,10)	0,30 (0,02)	7,56
B3	3 (1)	4,01E + 00 (0,74)	0,60 (0,08)	13,68
Interassay variability				
B1	3 (3)	6,08E + 02 (5,58E + 01)	2,78 (0,04)	1,38
B2	3 (3)	2,06E + 00 (0,34)	0,29 (0,07)	23,97
B3	3 (3)	3,11E + 00 (0,82)	0,46 (0,13)	28,79

Successive 10-fold dilutions of recombinant plasmid: A1 (2×10^6), A2 (2×10^5), A3 (2×10^4), A4 (2×10^3), A5 (2×10^2), A6 (2×10^1), and A7 (2×10^0). Three bat samples with different viral concentrations: B1 (10^2), B2 and B3 (10^0).

SD: standard deviation.

CV: coefficient of variation.

at 55°C for 20 sec, and polymerization at 72°C for 20 sec. During the melt cycle, the temperature was increased by increments of 1°C from 72°C to 95°C.

Specimens were considered positive if the fluorescence curve in the amplification plot showed an exponential increase, and a specific melting peak was observed.

2.6. Standard Curve and Limit of Detection (LOD). The SYBR Green real-time PCR standard curve was generated by serial 10-fold dilutions of recombinant plasmid with a known copy number (from 1×10^8 to 1×10^{-1} copies/ μ L). These dilutions were tested in triplicate and used as quantification standards to construct the standard curve by plotting the plasmid copy number against the corresponding threshold cycle values (Ct). The threshold was determined using the Autofind Threshold function of the Rotor-Gene 3000, which scans the range of the threshold levels to obtain the best fit of the standard curve through the samples which have been defined as standards. The limit of detection (LOD) of the reaction was determined based on the highest dilution of plasmid possible to amplify with good reproducibility.

To verify the specificity of the reaction, a melting curve analysis and electrophoresis on agarose gel were carried out for the products of the SYBR Green real-time PCR reaction. Five microliters of the amplicons were electrophoresed in 2% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide in 1x standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and visualised by ultraviolet (UV) light; MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) was used to check that amplicons of the expected size were present.

2.7. Diagnostic Sensitivity and Specificity. The analytical sensitivity and efficiency of real-time PCR is reflected by the LOD, which was assessed as described previously.

The specificity of the assay was evaluated using several dilutions of the recombinant plasmid together with a bat-SARS-like CoV, coronaviruses of different genera, and other RNA and DNA viruses, in triplicate.

The cDNA obtained from RNA extracted from faecal sample 893/09-11 [4] was used as a standard to test the amplification of the bat-SARS-like CoV while coronaviruses of other genera tested were feline coronavirus FCoV (Alpha-coronavirus, strain 420, cDNA obtained from RNA extracted from lymph node, [19]), and infectious bronchitis virus IBV (Gammacoronavirus, strain M41, DQ834384, cDNA obtained from RNA extracted from infected cells, kindly provided by Professor Elena Catelli). To further determine the specificity of the amplification reaction, the canine distemper virus CDV (Morbillivirus, Onderstepoort strain, NOBIVAC PUPPY CP, Nobivac, Boxmeer, The Netherlands, cDNA obtained from RNA extracted from vaccine suspension) and the feline panleukopenia virus FPV (Parvovirus, strain 1033/09, cDNA obtained from RNA extracted from tongue, [20]) were tested as noncoronavirus RNA viruses and as DNA viruses, respectively. A melting curve analysis of the amplification products obtained was carried out.

2.8. Intra- and Interassay Variability. In order to determine the intraassay variability of the technique for the standard plasmid and for samples, seven successive 10-fold dilutions (from 2×10^6 to 2×10^0 copies/ μ L) of recombinant plasmid were tested in triplicate within the same run, and the same

was done for three samples with different viral concentrations (the highest viral concentration detected among the sampled bats (B1): 10^2 , and two low viral concentrations near the limit of detection (B2 and B3): 10^0) (Table 2).

The interassay variability was tested on bat samples by testing the three samples with different viral concentrations (B1, B2, and B3) in triplicate on three different days (Table 2).

Mean, standard deviation (SD), and coefficient of variation (CV) were calculated. In particular, the CV was calculated as the percentage of the ratio of standard deviation and the mean of the copies obtained, in accordance with the US Environmental Protection Agency protocol [18].

2.9. Detection of Coronavirus in Bat Faecal Samples Using SYBR Green Real-Time PCR. After optimisation of the SYBR Green real-time PCR assay, for each run, duplicates of six 10-fold dilutions of the standard plasmid, triplicates of the viral reverse-transcribed RNA of the bat samples, and a no template control were simultaneously subjected to analysis.

Bat samples were considered positive if the mean of three replicates was greater than the LOD.

To confirm the expected size of the reaction products, five microliters of the amplicons were electrophoresed in 2% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide in 1x standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and visualised by ultraviolet (UV) light; MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) was used to check the size of DNA fragments.

3. Results

3.1. Development and Validation of SYBR Green Real-Time PCR. The linearity and efficiency of the SYBR Green real-time PCR were determined by generating a standard curve in which serial 10-fold dilutions of recombinant plasmid were tested. The standard curve was generated by plotting the real-time PCR threshold cycle numbers (Ct) of each dilution against the known copy numbers of recombinant plasmid. The resulting slope showed a linear relationship over 9 orders of magnitude, ranging from approximately 1×10^0 to 1×10^8 copies/ μ L. The slope was -3.36 with a coefficient of determination (R^2) > 0.99 and a reaction efficiency (E) of 0.99 , calculated from the slope (S) using $E = 10^{(-1/S)} - 1$.

The LOD determined on the standard curve generated by amplifying the recombinant plasmid dilutions was found to be 0.0045 fg or 1 copy/ μ L, thus showing a high sensitivity of the assay. The specificity of the reaction was confirmed by a melting temperature of 83.3°C for standard plasmid dilutions, indicating the formation of a single PCR product with no artefacts, such as nonspecific amplification products or primer dimers (results not shown). Furthermore, amplification products were also checked on agarose gel stained with ethidium bromide in standard TAE buffer and a clear and well-defined specific band of approximately 168 bp was visualised for all replicates of recombinant plasmid dilutions, except the concentration of 1×10^{-1} copies/ μ L. (Figure 3).

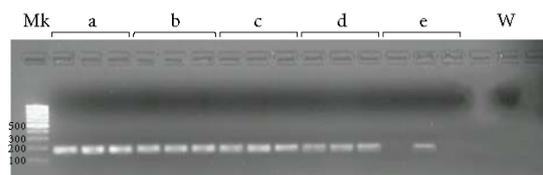


FIGURE 3: Real-time PCR reaction products checked on agarose gel stained with ethidium bromide in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: serial 10-fold dilutions of recombinant plasmid. Specific bands of approximately 168 bp were visualised for all replicates of recombinant plasmid dilutions, except the concentration of 1×10^{-1} copies/ μ L. For recombinant plasmid dilution with a concentration of 1×10^{-1} copies/ μ L only one specific amplicon to three replicates was visualised. MK: MassRuler Low-Range DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). a, b, c, d, and e: recombinant plasmid dilutions with concentrations of 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , and 1×10^{-1} copies/ μ L, respectively. W: no template control (water).

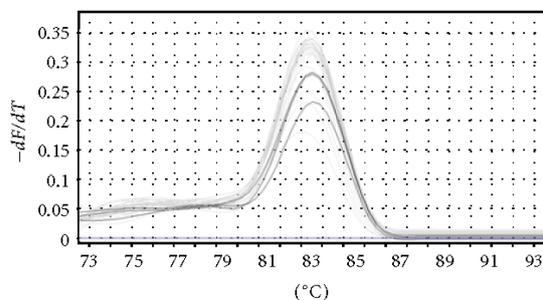


FIGURE 4: Melting curve analysis of standard plasmid dilutions and sample 893/09-11. In gray: signals obtained from the standard plasmid dilutions; in black: signals obtained from the sample 893/09-11; derivative $-dF/dT$ where F is fluorescence and T is time; $^\circ\text{C}$: temperature (centigrade).

The developed assay was capable of detecting bat-SARS-like CoV sample 893/09-11 and no positive results were obtained with any other RNA or DNA viruses tested. The melting curve analysis of sample 893/09-11 showed a single peak at 83.3°C (Figure 4). These results suggested that the technique was highly specific for the bat-SARS-like coronaviruses.

The intraassay variability was determined, first, on seven successive 10-fold dilutions of recombinant plasmid tested in triplicate and, then, on three bat samples with different viral concentrations tested in triplicate. The coefficient of variation (CV) obtained ranged from 0.45 to 1.41 for plasmid concentrations higher than 10^2 copies/ μ L, while they increased progressively for lower concentrations. For bat samples, the CV obtained was 1.27 for the viral concentration of 10^2 copies/ μ L and 7.56 – 13.68 for concentrations of 10^0 copies/ μ L (Table 2). The determination of the interassay variability tested on three bat samples gave a CV of 1.38 for the viral concentration of 10^2 copies/ μ L and 23.97 – 28.79 for concentrations of 10^0 copies/ μ L (Table 2).

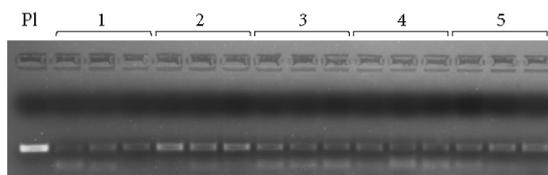


FIGURE 5: Real time-PCR reaction products checked on agarose gel stained with ethidium bromide in standard tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: positive samples detected by developed real-time PCR. Specific bands of approximately 168 bp were visualised for all replicates of the detected positive samples. In this figure is represented the 2% (w/v) agarose gel electrophoresis of five of the 11 positive samples detected in bats belonging to sampling area A (San Cesario sul Panaro, MO). Pl: amplicon of the recombinant plasmid with 1×10^4 copies/ μL ; 1, 2, 3, 4, and 5: amplicons of the five positive samples belonging to sampling area A, each with three repetitions.

The intra- and interassay variability for plasmid dilutions and samples is therefore low for decreasing concentrations down to 10^2 copies/ μL and progressively higher for lower concentrations, as influenced by distribution statistics (Poisson's law) which involves an increase in CV values for the quantification of very low copy number. However, despite the higher variability, low viral concentrations were always detected in all repetitions using the SYBR Green assay.

Furthermore, the standard deviation (SD) between the individual assays was below $0.25 \log_{10}$ (Table 2), a level which is normally considered the minimum requirement for acceptable reproducibility of quantitative molecular assays.

3.2. Detection of Coronavirus in Bat Faecal Samples Using SYBR Green Real-Time PCR. Faecal samples of 45 greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) were tested in triplicate for the presence of SARS-like coronaviruses; 19 were positive with a prevalence of 42% (Table 1).

Viral quantities in positive samples ranged from orders of magnitude 10^0 to 10^2 ; a low viral concentration which could also be a consequence of the dilution of the faeces sampled during the extraction procedure. Melting curve analysis showed a single peak between 83° and 84°C for each positive bat sample. The difference in the melting temperature between the standard plasmid (83.3°C , see above) and the faecal samples was a probable consequence of nucleotide mutations in the amplified target sequence (results not shown).

The real-time PCR products were checked on agarose gel stained with ethidium bromide in standard TAE buffer and all replicates of the detected positive samples showed a well-defined specific band of approximately 168 bp (Figure 5).

To confirm that positive samples belonged to SARS-like CoVs, the genome of some detected virus was partially sequenced and analysed by BLAST web interface (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (data not shown).

4. Discussion

The importance of bats as a reservoir of infectious viral agents potentially transmissible to humans and other animals has become more evident with the passage of time. Among the different viral families hosted by the bats, much attention has been paid to the coronaviruses which demonstrate considerable variability in these hosts. This is also associated with the central role of Chiroptera as a source of coronaviruses closely related to the SARS virus which, no more than ten years ago, caused a serious global epidemic in humans.

In view of this, there have been numerous studies in recent years with the goal of finding new species of coronaviruses in bats in order to monitor the world situation, to study the possible origin of human SARS virus, and to predict possible new coronavirus outbreaks in humans.

Until now, the predominance of surveys on coronavirus infection in bats has used a reverse-transcribed PCR (RT-PCR) technique for the initial faecal sample screening. However, since conventional PCRs usually have a relatively higher limit of detection in comparison to other methods of analysis, it is possible that there has been an underestimation of the real prevalence of infection in bats.

This possible underestimation of coronavirus prevalence can affect the evaluation of the real epidemiologic impact of bats in viral ecology, by not considering a population of chronically or persistently infected animals with a low viral load, which may be important for the transmission, maintenance, and evolution of the virus in the environment.

In this paper, the description and validation of an SYBR Green real-time PCR method was carried out to detect the presence of SARS-like-coronaviruses, in order to improve the sensitivity of viral detection and to develop, at the same time, a rapid and robust technique to be used for the initial screening of faecal samples.

The SYBR Green real-time PCR developed in this study was highly sensitive, capable of detecting minimum concentrations of virus. Furthermore, it showed optimal efficiency and linearity of the reaction associated with low intra- and interassay variations.

Therefore, this reliable and rapid technique, given its extreme sensitivity and reproducibility, may represent an important and useful alternative method for SARS-like-coronavirus detection in epidemiological investigations. Real-time PCR could be especially useful in programs of bats screening for the detection of viruses from faecal samples having low amounts of viral copies.

The assay developed was applied to the detection of SARS-like coronaviruses in the faeces of bats sampled in different areas of Italy in 2009. Nineteen of the 45 greater horseshoe bats sampled were positive with a 42% prevalence and viral quantities in positive samples ranged from orders of magnitude 10^0 to 10^2 . Drexler et al. are the only authors that applied a real-time PCR assay to faecal samples of European (Bulgaria) field bats detecting 26% positive animals reaching up to 10^8 copies per gram of faeces [5]. The prevalence of SARS-like coronavirus infection resulted higher in Italian bats than in Bulgarian bats. The Italian bat faeces were

initially diluted and not quantified; therefore it is difficult to compare the difference of copies of virus in tested faeces between our and Drexler et al. studies.

The prevalence detected in this survey is much higher than that reported in the only other study done until now regarding the presence of coronavirus in the Italian bat population [4], which detected (using qualitative RT-PCR) two positives out of 52 bats of the same species. These divergent results may reflect a genuine difference in the prevalence of coronavirus infection among bat populations in Italian areas, but it could also be due to the different detection methods used.

5. Conclusion

The real-time PCR assay which was developed is a reliable, specific, and sensitive tool with potential utility for rapid screening in bat populations. If conventional qualitative RT-PCR is widely applied (since it allows the sequencing of the obtained products and the genomic characterisation of the viruses), a combined approach with a quantitative real-time PCR furnishes relevant information about the epidemiological situation of coronavirus infection in bats, thus obtaining a more realistic vision of the viral prevalence in the population.

Abbreviations

bat-SARS-like CoV:	Bat virus related to SARS-coronavirus
CDV:	Canine distemper virus
CN:	Copy number
CoV:	Coronavirus
Ct:	Threshold cycle
CV:	Coefficient of variation
$-dF/dT$:	Derivative where F = fluorescence and T = time
E :	Reaction efficiency
FCoV:	Feline coronavirus
FPV:	Feline panleukopenia virus
IBV:	Infectious Bronchitis Virus
LOD:	Limit of detection
ORF:	Open reading frame
PCR:	Polymerase chain reaction
R^2 :	Coefficient of determination
RdRp:	RNA-dependent RNA polymerase gene
RT-PCR:	Reverse transcribed-polymerase chain reaction
S :	Slope
SARS:	Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV:	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-like CoV:	Severe acute respiratory syndrome-like coronavirus
SD:	Standard deviation
TAE:	Tris-acetate-EDTA.

Acknowledgment

Financial support was provided by funds RFO (Ricerca Fondamentale Orientata) of the *Alma Mater Studiorum*-University of Bologna.

References

- [1] J. S. M. Peiris, Y. Guan, and K. Y. Yuen, "Severe acute respiratory syndrome," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 12, pp. S88–S97, 2004.
- [2] P. A. Rota, M. S. Oberste, S. S. Monroe et al., "Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome," *Science*, vol. 300, no. 5624, pp. 1394–1399, 2003.
- [3] Z. Shi and Z. Hu, "A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus," *Virus Research*, vol. 133, no. 1, pp. 74–87, 2008.
- [4] A. Balboni, A. Palladini, G. Bogliani, and M. Battilani, "Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats," *Epidemiology and Infection*, vol. 139, no. 2, pp. 216–219, 2011.
- [5] J. F. Drexler, F. Gloza-Rausch, J. Glende et al., "Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences," *Journal of Virology*, vol. 84, no. 21, pp. 11336–11349, 2010.
- [6] W. Li, Z. Shi, M. Yu et al., "Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses," *Science*, vol. 310, no. 5748, pp. 676–679, 2005.
- [7] P. L. Quan, C. Firth, C. Street et al., "Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria," *mBio*, vol. 1, no. 4, article e00208-10, 2010.
- [8] D. Rihtarič, P. Hostnik, A. Steyer, J. Grom, and I. Toplak, "Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia," *Archives of Virology*, vol. 155, no. 4, pp. 507–514, 2010.
- [9] S. Tong, C. Conrardy, S. Ruone et al., "Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 3, pp. 482–485, 2009.
- [10] S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo, K. S. M. Li et al., "Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 39, pp. 14040–14045, 2005.
- [11] S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo, K. S. M. Li et al., "Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome," *Virology*, vol. 367, no. 2, pp. 428–439, 2007.
- [12] S. K. P. Lau, K. S. M. Li, Y. Huang et al., "Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events," *Journal of Virology*, vol. 84, no. 6, pp. 2808–2819, 2010.
- [13] S. Watanabe, J. S. Masangkay, N. Nagata et al., "Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 16, no. 8, pp. 1217–1223, 2010.
- [14] P. C. Y. Woo, S. K. P. Lau, K. S. M. Li et al., "Molecular diversity of coronaviruses in bats," *Virology*, vol. 351, no. 1, pp. 180–187,

- 2006.
- [15] P. C. Y. Woo, M. Wang, S. K. P. Lau et al., "Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features," *Journal of Virology*, vol. 81, no. 4, pp. 1574–1585, 2007.
 - [16] J. Yuan, C. C. Hon, Y. Li et al., "Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans," *Journal of General Virology*, vol. 91, no. 4, pp. 1058–1062, 2010.
 - [17] S. Escutenaire, N. Mohamed, M. Isaksson et al., "SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses," *Archives of Virology*, vol. 152, no. 1, pp. 41–58, 2007.
 - [18] US Environmental Protection Agency, *Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analysis on Environmental Samples*, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2004, http://www.epa.gov/nerlcwww/qa_qc_pcr10_04.pdf.
 - [19] M. Battilani, T. Coradin, A. Scagliarini et al., "Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats," *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 141–147, 2003.
 - [20] M. Battilani, A. Balboni, M. Ustulin, M. Giunti, A. Scagliarini, and S. Prosperi, "Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats," *Veterinary Research*, vol. 42, no. 1, article 43, 2011.

Pubblicazione 3

The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus

Andrea Balboni, Mara Battilani, Santino Prosperi

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

SUMMARY

Bats represent an order of great evolutionary success, with elevated geographical diffusion and species diversity. This order harbors viruses of high variability which have a great possibility of acquiring the capacity of infecting other animals, including humans. Bats are the natural reservoir for several viruses genetically closely related to the SARS-coronavirus which is the etiological agent of severe acute respiratory syndrome (SARS), a human epidemic which emerged in China in 2002-2003. In the last few years, it has been discovered that the association between coronaviruses and bats is a worldwide phenomenon, and it has been hypothesised that all mammalian coronaviruses were derived from ancestral viruses residing in bats. This review analyzes the role of bats as a reservoir of zoonotic viruses focusing more extensively on SARS-related coronaviruses and taking into account the role of African and European strains in the evolutionary history of these viruses.

KEY WORDS: Bat, SARS, Coronavirus

Received April 19, 2011

Accepted October 31, 2011

INTRODUCTION

In mammals, Chiroptera is one of the most important orders involved in the emergence and diffusion of viruses in animals, and between animals and humans. Several characteristics of the bat species, such as the ability to fly, the coexistence of many individuals in large colonies, a diet composed of all types of foods, the ability to cover long distances during migration as well as many others, have allowed bats to be found all over the world (except in Antarctica and a few oceanic islands), occupying the most varied ecological niches. This great evolutionary success underlies the remarkable propensity of these animals to favor, as hosts and reservoirs, the diffusion of a wide variety of viruses.

Corresponding author

Mara Battilani
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie
Facoltà di Medicina Veterinaria
Alma Mater Studiorum-Università di Bologna
Via Tolara di Sopra, 50
40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy
E-mail: mara.battilani@unibo.it

In past years, several viruses infecting humans have been linked to bats: Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Filoviridae and others (Calisher *et al.*, 2006). With some exceptions, the direct transmission of viruses from bats to humans is uncommon. Instead, bats more frequently act like reservoirs of ancestral viruses which, through a species jump, arrive in secondary hosts where they acquire a tropism for the human host.

Due to the elevated geographical diffusion and the elevated species diversity of bats, this order harbors viruses of high variability which have a greater possibility of acquiring the capacity of infecting other animals, including humans.

In recent years, several anthropogenic and natural changes in the environment, due to deforestation, alteration of natural habitats, changes in animal diversity and climatic events, have shifted the ecology of bats and have exposed humans to new pathogens (Wang *et al.*, 2006). In fact, the last twenty years have seen an increase in the number of outbreaks caused by pathogens with bats as the reservoir of infection (Calisher *et al.*, 2006).

Of the human viral epidemics which have emerged in the last ten years, one of the most important is the outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) which emerged in China in 2002-2003, rapidly causing a global epidemic involving humans. In two consecutive events (the main SARS epidemic of 2002-2003 and a series of sporadic infections occurring in the winter of 2003-2004), SARS caused more than 8000 infections and 700 deaths (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003; Peiris *et al.*, 2004; Skowronski *et al.*, 2005).

Several studies have shown that a new coronavirus is the etiological agent of SARS, the SARS-CoV (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003). Successively, it has also been shown that bats might be the natural reservoir for several viruses closely related genetically to the SARS-CoV, known as SARS-like coronaviruses (SARS-like CoVs), and that all mammalian coronaviruses were derived from ancestral viruses residing in bats (Shi *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2009).

Furthermore, the association between coronaviruses and bats is a worldwide phenomenon: after the initial discovery of this virus in Chinese bats (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005), subsequent studies confirmed its presence in North and South America, Europe and Africa (Dominguez *et*

al., 2007; Brandao *et al.*, 2008; Carrington *et al.*, 2008; Gloza-Raush *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2009; Pfefferle *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2010; Reusken *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011).

This review will analyze the role of bats as reservoirs of zoonotic viruses focusing more extensively on SARS-related coronaviruses: the discovery of the coronavirus in bats, the genomic features of the several SARS-like CoVs, and the gradual and ongoing identification of new viral strains in bats in different parts of the world.

In particular, the role of SARS-like CoVs residing in African and European bats will be taken into account in the evolutionary history of these viruses, in the light of the typical genome divergences that these viruses have when compared to Asian SARS-like CoVs.

Bats and their role in viral spread

Bats are one of the longest living mammalian orders, and probably constitute the order with the most diversity between species (Altringham, 1996a). They originated early (50 to 52 million years ago) and the different species have changed relatively little over time compared to mammals of other taxa (Calisher *et al.*, 2006).

Bats constitute the second largest order of mam-

TABLE 1 - Bat classification.

Order	Suborder	Family	Common name
Chiroptera	Megachiroptera	Pteropodidae	Flying foxes and other Old World fruit bats
	Microchiroptera	Vespertilionidae	Vesper bats or evening bats or common bats
		Phyllostomidae	American leaf-nosed bats, including vampire bats
		Rhinolophidae	Horseshoe bats
		Hipposideridae	Old World leaf-nosed bats
		Molossidae	Free-tailed bats
		Emballonuridae	Sheath-tailed bats or sac-winged bats
		Nycteridae	Slit-faced bats or hollow-faced bats
		Mormoopidae	Leaf-chirped bats
		Megadermatidae	False vampire bats
		Natalidae	Funnel-eared bats
		Rhinopomatidae	Mouse-tailed bats
		Thyropteridae	Disk-winged bats
		Mystacinidae	New Zealand short-tailed bats
		Furipteridae	Smoky bats
		Noctilionidae	Bulldog bats or fisherman bats
		Craseonycteridae	Hog-nosed or bumblebee bat
		Myzopodidae	Old World sucker-footed bat

mals and, with approximately 1000 species, make up 20% of the species in the Class *Mammalia*. Bats are classified in the order *Chiroptera*, which is subdivided in two suborders, *Mega-* and *Microchiroptera*, commonly referred to as megabats and microbats.

The suborder *Megachiroptera* contains only one family (Pteropodidae or flying foxes), which includes only plant-eating large bats (20-1500 g), confined to Africa, tropical Asia and Indo-Australasia. Instead, the Suborder *Microchiroptera* contains 17 families which include the majority of small bats (1.5-150 g). They are found on every continent except Antarctica and a few oceanic islands, and are omnivorous (Table 1) (Altringham, 1996a; Calisher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

As regards the geographical distribution of bats, a decrease in species richness is seen with an increase in latitude. Therefore, there is greater species richness in proximity to the equator due to greater major primary biological productivity as there is an increase in light intensity, temperature and the growing season (Altringham, 1996d).

Owing to the diversity of bat species and their unique biological and ecological characteristics (all bats fly, some are abundant and widely distributed, many are highly gregarious, they are predators and are preyed upon at the same time), they can become the hosts for a large number of infectious agents having medical importance (Calisher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Donaldson *et al.*, 2010).

The transmission of viruses from bats to humans can occur in a variety of ways: direct contact (bites and scratches), inhalation of infectious particles by humans (secretions and guano), arthropod vectors, consumption of bat meat in some parts of the world (China, Guam and some parts of Asia) and secondary vertebrate hosts which serve as amplifying hosts (Wang *et al.*, 2006). Therefore, bats represent an important reservoir for many zoonotic viruses which usually cause persistent infections in bats themselves. Furthermore, with some exceptions, the transmission of viruses from bats to humans requires a second intermediate animal host, and direct transfer of the pathogen from bats to humans happens only rarely (Calisher *et al.*, 2006).

As mentioned above, the capability of bats to host

several viral species and transmit viruses to other animals, including humans, is favored by various biological and ecological characteristics; the main ones are:

a) The high population densities and the habit of roosting provides the opportunity for disease-causing pathogens to invade and spread rapidly, with the possibility of intra- and interspecies transmission of infectious agents amongst themselves through direct contact, or aerosol or arthropod vectors (Kunz *et al.*, 2003c; Calisher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006).

The number of bats in each colony varies greatly from less than 10 to over 200,000 individuals (Wang *et al.*, 2006), and many bat species may share the same habitats. Bats exhibit a wide range of fidelity to their roosts. This variation is often reflected in the type of roost, stage of life and form of social organisation. Many species of cavity- and foliage-roosting bats show low fidelity to specific roost size as compared to cave- and building-roosting bats, but they often all exhibit high levels of fidelity to roost areas (Kunz *et al.*, 2003a). The roosting environment ranges from natural structures (caves, rock crevices, nests of birds, ants and termites, hollowed spaces in trees, or exposed on tree branches and trunks) to man-made structures (mines, tombs, buildings and bridges), and they can be temporary or permanent (Kunz *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2006). The occupation of man-made habitats could bring the bats into closer association with humans and their companion animals or livestock with the possible transmission of some pathogens from peridomestic bats to humans and livestock (Wang *et al.*, 2006).

b) The dietary habits of bats can be broadly divided into insectivorous, frugivorous, carnivorous, omnivorous and sanguivorous (Wang *et al.*, 2006). Predatory bats could potentially acquire infectious agents from other animal species, such as birds and insects (Wang *et al.*, 2006) but, on the other hand, bats are also preyed upon and they can transmit infectious agents to their predators.

c) The ability to fly has given bats the opportunity of going almost anywhere, freer from obstacles than land-based mammals (Woo *et al.*, 2006). Some genera migrate between two sites to avoid unfavourable climatic conditions and/or to seek more favourable conditions for growth, covering

distances ranging from 200-300 km to almost 2000 km (Calisher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). There are two types of migration: 1) long seasonal migration generally in a north-south direction and 2) short seasonal migration not necessarily in a north-south direction. Migration is particularly common in tree-roosting bats since tree holes are poor hibernation sites in the colder climates. Furthermore, female migration is more common than male (Altringham, 1996c; Kunz *et al.*, 2003b).

The evolution of migratory behaviour varies with latitude; in fact, migratory behaviour is more intense at higher latitudes than at lower latitudes, and a higher proportion of temperate bats exhibit migratory behaviour than do tropical species (Kunz *et al.*, 2003b).

Therefore, bats have a greater capacity to disperse quickly to new areas, such as islands, than do non-volant mammals, with the exception of humans. The migratory habits of some bats provide an opportunity for pathogens to cover long distances and bridge gaps between various species which might otherwise not be in contact (Kunz *et al.*, 2003c).

d) *Vespertilionidae* and *Rhinolophidae* bats have the ability of entering into daily torpor and seasonal hibernation to conserve energy during cool nights and winter months (Calisher *et al.*, 2006). The term torpor means a state in which an animal allows its body temperature to fall below its active homeothermic level. The fall in body temperature is slow and controlled, and permits conservation of energy. Hibernation is an extended form of torpor which occurs on a seasonal basis, lasting for days, weeks, or months, in response to a prolonged fall in ambient temperature or a reduction in the food supply (Altringham, 1996b). The capability of bats to enter into seasonal hibernation may also facilitate the diffusion of pathogens since it can allow the viruses to overwinter within the bats, thus facilitating their persistence in the environment (Calisher *et al.*, 2006).

Coronavirus

Coronaviruses (CoVs), order *Nidovirales* and family *Coronaviridae*, are a group of enveloped viruses with a linear, non-segmented, positive-sense, single-stranded RNA genome, having a characteristic crown morphology (Fauquet *et al.*, 2005). Until a few years ago, all viruses belonging to the

family *Coronaviridae* were subdivided into only two genera: *Coronavirus* and *Torovirus*, and all viruses included in the genus *Coronavirus* were subdivided into only three antigenic groups. The recent discovery of a large variety of new coronaviruses in several host species has led the Coronavirus Study Group of the International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) to propose a reclassification of the family *Coronaviridae* into two subfamilies: *Coronavirinae* and *Torovirinae*. In particular, the subfamily *Coronavirinae* now includes three genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* and *Gammacoronavirus*, which have replaced the traditional antigenic groups 1, 2, and 3, respectively. All the mammalian CoVs, including all bat coronaviruses detected to date and SARS-CoV, belong to the first and the second genera, *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus*, whereas all avian CoVs belong to the genus *Gammacoronavirus*. Within the *Gammacoronavirus* genus, there is only one exception represented by the Beluga whale coronavirus SW1 strain which has been identified in this aquatic mammal (Fauquet *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>). The viral genome is the largest known non-segmented viral RNA genome (approximately 30 kbp) and is subdivided into a variable number of open reading frames (6 to 9) which encode an ensemble of non-structural proteins with RNA-polymerase function (Pol-1a,b) and four principal structural proteins: Spike (S), Membrane (M), Envelope (E) and Nucleocapsid (N) proteins. In addition to these, some non-structural proteins, which are diverse in number, have uncertain functions and have a group-specific genome position, have been added (Fauquet *et al.*, 2005). Briefly, the Pol-1a,b proteins are encoded from an open reading frame (ORF) which occupies 2/3 of the genome and presents highly conserved regions. The Spike glycoprotein, exposed on the virion surface, is responsible for recognising and binding with the cellular receptor, inducing neutralising antibody response and is encoded from an ORF with a highly variable sequence. The nucleocapsid protein is linked with genomic RNA and induces a cell-mediated immune response (Fauquet *et al.*, 2005).

Coronaviruses have diverse animal hosts ranging from mammalian (including humans) to avian species, and have a high frequency of recombina-

nation which, together with high mutation rates, may allow them to adapt to new hosts and ecological niches. The main targets are epithelial cells, causing mainly enteric and respiratory diseases of varying severity. Transmission occurs through fecal-oral secretions and excretions.

Sars and bat coronaviruses

The severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV or hu-SARS-CoV) is the etiologic agent of the SARS disease (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003) which caused a global epidemic in humans in 2002-2003, resulting in more than 8000 infections and 700 deaths (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003; Peiris *et al.*, 2004; Skowronski *et al.*, 2005).

From the initial investigations conducted in China after the outbreak of SARS, it seemed clear that marketplace animals may have been the source of the virus found in humans (Li *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). Evidence of infection was found in Himalayan palm civets (*Paguma larvata*), Chinese ferret badgers (*Melogale moschata*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) which were found to carry the SARS-CoV.

In particular, it was seen that the viruses collected from masked palm civets in 2003 were different from those of 2004 indicating two separate animal-to-human transmissions: the first in the main SARS outbreak of 2002-2003 and the second in a series of sporadic infections in the winter of 2003-2004 (Song *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2010).

However, subsequent epidemiological studies have shown that Palm civets and other marketplace animals may not be the primary reservoir hosts of SARS-CoV in nature, but merely a secondary amplifying host which increases the viral burden and provides ample contact with humans, thereby facilitating animal-to-human and human-to-human transmission. This hypothesis is supported by the fact that:

- 1) SARS-CoV was present only in market or farmed animals but not in those from the wild;
- 2) SARS-CoV genomes evolved rapidly in marketplace animals, suggesting that the virus was still adapting to these animals rather than persisting in equilibrium, as would be expected in a reservoir species (Wang *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2010).

Nonetheless, the finding of SARS-CoV in marketplace animals in China has provided evidence for interspecies transmission in the genesis of the SARS epidemic (Lau *et al.*, 2005).

The research of the wild animal reservoir of SARS-CoV subsequently led to the discovery of a great variety of coronaviruses belonging to the first two coronavirus genera in several bat species, first in Asia (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2007) and then in all the continents in which bats are found (Dominguez *et al.*, 2007; Brandao *et al.*, 2008; Carrington *et al.*, 2008; Gloza-Raush *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2009; Pfefferle *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2010; Reusken *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011), whereas none of the bat coronaviruses discovered belonged to the third coronavirus genus.

These discoveries, in association with the ancestral nature of bat coronaviruses compared to coronaviruses from other animal species, have led us to assume that all mammalian coronaviruses belonging to *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* were derived from ancestral viruses residing in bats (Vijaykrishna *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2009).

Currently, there is no evidence of SARS-CoV transmission from bats to humans (Stockman *et al.*, 2008), and the exact natural reservoir host for the progenitor virus of SARS-CoV may not have been determined as yet. However, a group of CoVs which are genetically closely related to the SARS-CoV have been identified in various species of horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) and in some other bat genera (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007; Pfefferle *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2009; Drexler *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011). These viruses were called SARS-like CoVs. These SARS-like CoVs together with human and marketplace animal SARS-CoV strains are included in the *Betacoronavirus* genus, in the severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-related CoV) species (<http://www.ictvonline.org/>).

There are at least three hypotheses which explain the origin of the SARS-CoV:

- 1) some unknown intermediate hosts were responsible for the adaptation and transmission of the SARS-CoV from bats to marketplace animals or humans;
- 2) there is a SARS-like CoV closely related to the outbreak SARS-CoV strains in a non-bat animal host which is capable of direct transmission from a reservoir host to humans or marketplace animals;
- 3) a bat yet to be identified could be the direct reservoir of the human or marketplace animal SARS-CoV because it may have an efficient viral receptor (ACE2, see below) (Hou *et al.*, 2010).

With regard to the presence of coronaviruses in bats, there may be a coevolutionary relationship between some bat-CoVs and their hosts. Therefore, with very few exceptions, most bat coronaviruses seem to be species-specific, although one bat genus/species may more than one type of coronavirus (Wang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007).

Bat-CoV seemed to be more closely associated with bat species than with sampling location; indeed, the same bat species living in different geographical locations can contain the same type of coronavirus and, at the same time, different species roosting in the same cave may carry different coronaviruses (Tang *et al.*, 2006; Gloza-Raush *et al.*, 2008; Reusken *et al.*, 2010). Therefore, virus-host associations could be used to predict geographic distributions of reservoir-borne CoVs (Drexler *et al.*, 2010).

Moreover, there seems to be a relationship between coronavirus infection and the age of the bats; in fact, it has been shown that young bats provide a susceptible population for amplifying the coronavirus and transmitting it to lactating females in maternity colonies whereas the virus would replicate less efficiently in adults than in young animals (Gloza-Raush *et al.*, 2008; Rihtaric *et al.*, 2010).

To date, SARS-like coronaviruses have been detected in China, Africa and Europe. With the exception of the African strains, all bat-SARS-like CoVs have been detected in some species of horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) where they cause acute, self-limiting infection of the gastrointestinal tract (Lau *et al.*, 2010). The detection of diverse SARS-like CoV strains in the different *Rhinolophus* species have suggested that

this novel group of coronaviruses is rapidly evolving and may easily cross the species barrier (Lau *et al.*, 2010).

Inside this bat genus, the Chinese horseshoe bat (*Rhinolophus sinicus*) probably plays an important role in the SARS-like CoV epidemiology. First, the highest virus prevalence detected until now was in *R. sinicus* (Shi *et al.*, 2008) and, in addition, two SARS-like-CoVs, Rs672 and Rp3, identified in this bat species (Li *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2010) tightly clustered together and showed a potential recombinant breakpoint estimated at the nucleotide immediately after the start codon of the S gene, with the major parental regions phylogenetically closer to human-SARS-CoVs than to bat-SARS-like-CoVs and the minor parental region phylogenetically closer to bat-SARS-like-CoVs than to human-SARS-CoVs (Yuan *et al.*, 2010). It is possible that the recombination insertion of variant RBDs (Receptor-Binding Domains) may have mediated the initial cross-species transmission event from bats into other mammals (Graham *et al.*, 2010).

SARS-like-CoV genome

All bat-SARS-like CoV full genomes have a gene organization similar to human and civet SARS-CoVs; the genome is composed of a 5' non-coding leader sequence, polymerase complex ORF1ab, S, ORF3 (formed to ORF3a,b,c in Rf1 strain), E, M, ORF6, ORF7a,b, ORF8, ORF9a(N),b,c and 3' terminal non-coding region with a stem loop II-like motif (s2m) and a polyA tail (Figure 1a). Another genome characteristic shared by SARS and SARS-like coronaviruses is the presence of a conserved nucleotide sequence (5'-ACGAAC-3') functioning as a transcription regulatory sequence (TRS) located at the 3' end of the putative 5' leader sequence of each predicted gene start site (Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003). This motif is indispensable for the production of the subgenomic mRNAs and is identical in all SARS-CoV ORFs and in most bat-SARS-like CoV ORFs (Li *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2007).

Nevertheless, there are considerable diversities within the genome organisation of SARS-like CoVs and between these and human and civet SARS-CoVs (Fig.1b) (Shi *et al.*, 2008; Quan *et al.*, 2010). Major differences have been observed in nsp3 (third non-structural protein codified by ORF 1a,b), S, ORF3 and ORF8 regions which

showed the lowest nucleotide and amino acid identities in comparison to the rest of the genome (Lau *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2010). The principal genome differences between SARS and SARS-like viruses are located in ORF8 which is a frequent site for deletion. All Bat-SARS-like CoVs (except the HKU3-8 strains, GQ153543), civet-SARS-CoVs (except one strain) and early-phase SARS-CoVs harbor a 29-nts sequence which fuses ORF8a and ORF8b into a single ORF8. Instead, in successive-phase SARS-CoVs, this 29-nts does not exist and ORF 8 is subdivided into two distinct ORF8s (a and b), disrupting the functional expression of this open reading frame (Lau *et al.*, 2005; Oostra *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010). The bat-SARS-like CoV strain HKU3-8 is an exception, having a short deletion of 26 bp which subdivides this ORF into three smaller ORFs (Lau *et al.*, 2010).

The S gene of bat-SARS-like CoVs presents a low percentage of sequence identity compared to hu-

man and civet SARS-CoVs, especially localized in the putative S1 domain. In the bat-SARS-like CoVs S1 domain, there are several insertions and deletions, mainly in the RBD region, which is critical for host-receptor binding and for immunity response (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

The nsp3 region of ORF1a is relatively variable in the genome of bat-SARS-like CoVs and, in particular, a deletion of 579nt in the nsp3 of the Rs672 strain has been identified, only found in a human-SARS-CoV (AY463060) strain of the late phase of the 2003 epidemic. Yuan *et al.* (2010) observed that this deletion probably occurred independently in Rs672 and Human-SARS-CoV, and was not acquired through homologous recombination (Ren *et al.*, 2006).

Spike protein and its role in host tropism

The S protein is the largest structural protein encoded by all coronaviruses; it mediates receptor association and fusion of the viral and cellular membranes, and is the major antigenic determi-

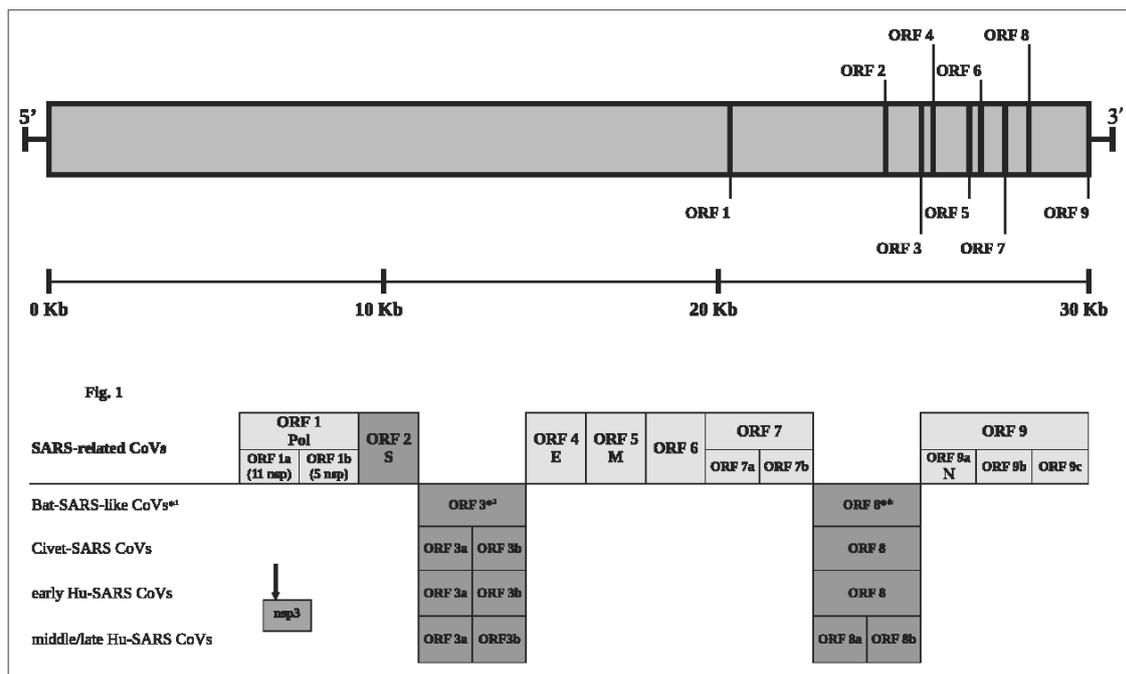


FIGURE 1A, B - Typical genome organisation of human and civet SARS-CoVs and bat SARS-like-CoVs. 1a (upper panel) is a schematic diagram of SARS-related CoV genome organisation. 1b (lower panel) is a schematic representation of the diversities within the genome organisation of SARS-related CoVs. Light gray: little variable genome tracts, dark gray: highly variable genome tracts. ^a1: does not include African and European bat-SARS-like CoVs. [‡]2: Rf1 strain presents ORF3a,b,c. [‡]3: HKU3-8 strain presents ORF8a,b,c.

nant of coronaviruses. The host range of a specific coronavirus is largely determined by its S protein which is composed of an N-terminal extremity (S1) for receptor binding and a C-terminal extremity (S2) for virus-cell fusion and entrance. (Li *et al.*, 2006).

The Receptor-Binding Domain (RBD) is a tract of about 200 amino acids of the S1 extremity with the function of linking to the cellular host receptor; the major immunodominant and potent neutralising epitope of the S protein. The RBD is composed of two sub-domains: a core and an extended loop. In the extended loop, there is the Receptor-Binding Motif (RBM) which directly contacts the cellular host receptor:

The S1 extremity of bat-SARS-like CoVs has a low degree of similarity to that of the SARS-CoV, especially in the RBD, whereas the S2 extremity has a high degree of similarity between the two viral groups. These differences imply that bat-SARS-like CoVs and the SARS-CoV made use of different molecules as entry receptors but have the same entry mechanism (Ren *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008).

Human and civet angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) was identified as a functional cellular receptor for the SARS-CoV (expressed in the lung and the gastrointestinal tract of the hosts) whereas the SARS-like viruses found in bats are unable to use any of the human, civet and bat ACE2 molecules as their receptors and utilize another unknown receptor (Li *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). This capability of SARS-CoVs to bind with human ACE2 is due to a minimal variation in the RBD sequence, and it is therefore possible that bat-SARS-like CoVs may attain this ability to infect human cells through the acquisition of an S sequence capable of binding to human ACE2. This event could occur by recombination with other CoVs if the same bat cells carry receptors for both types of viruses, one capable and one not capable of binding with ACE2 (Ren *et al.*, 2008).

This possibility is favoured by the greater genetic diversity of ACE2 among bats as opposed to that observed among known SARS-CoV-susceptible mammals (Hou *et al.*, 2010). This diversity has also pointed that many uncharacterized bat species may be able to act as reservoirs of the SARS-CoV or its progenitor viruses. Indeed, it has

already been shown that *Rhinolophus sinicus* and *Myotis daubentonii* ACE2s are also capable of supporting SARS-CoV entry, albeit with a different efficiency in comparison to that of human ACE2 (Hou *et al.*, 2010).

Possible African origin of the SARS-like CoV

To date, SARS-like CoVs have been detected in Asia, Europe and Africa. In Asia and Europe, the SARS-like CoVs are strictly related to some species of the *Rhinolophus* bat genus (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007; Drexler *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011;) whereas, in Africa, the SARS-like CoVs have been detected in several species of the *Hipposideros* and *Chaerophon* bat genera, indicating the lack of a strict species-specific host restriction in this geographical area (Pfefferle *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2010).

The absence of a species-specific host restriction, which bat-SARS-like CoVs have shown only in the African area, is also supported by the previous detection of reactive antibodies against SARS-CoV antigens in sera belonging to seven different bat genera (*Hypsignathus*, *Lyssonycteris*, *Miniopterus*, *Mops*, *Myonycteris*, *Rhinolophus* and *Rousettus*) (Muller *et al.*, 2007)

Of considerable interest is ZBCoV (HQ166910), the SARS-like CoV strain detected by Quan *et al.* (2010) in Nigeria which presents several genome peculiarities in comparison to other SARS-like CoVs; the principal peculiarities are:

- 1) the TRS motif is not present in ORF6;
- 2) the putative S protein presents greater sequence differences as compared to other SARS- and SARS-like CoVs, especially in the S1 domain involved in receptor binding;
- 3) a short ORF3;
- 4) a significantly shorter region between the M and N genes, caused by a large deletion, with ORF6 which overlaps with the M gene, ORF7 which overlaps with ORF6 and is not subdivided into a and b, ORF8 which overlaps with ORF7 and the N gene;
- 5) the presence of two conserved s2m (instead of one) downstream from the N gene.

The ZBCoV is most closely related to the GhanaBt-CoVs detected by Pfefferle *et al.* (2009) in Ghana. Phylogenetically, these African strains

cluster together and could be considered a separate subgroup within the *Betacoronavirus*, in an ancestral position to the SARS-related CoV subgroup, which includes SARS-CoVs and the other Asian and European *Rhinolophus* SARS-like CoVs (Pfefferle *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2010).

These findings could support the possible origin of the SARS-like CoVs in Africa rather than in Asia, and it is therefore possible to hypothesise that a subsequent migration occurred from Africa to Asia which may have led to the origin of the SARS-related coronavirus subgroup (Quan *et al.*, 2010).

The european scenario

Despite the large size and mild climate of the Mediterranean area, the European bat population is composed of a small number of species (Table 2), which contrasts with the high species diversity characterising the order *Chiroptera*. Bats are still present in all European countries, with the Mediterranean area having a major diversity. At present, there is still little information on the presence of coronaviruses in the European bat population.

Not many studies have been carried out and they have focused, for the most part, on central-east Europe, investigating only some of the species which make up the diversity of the European bat population.

Due to its characteristic climatic conditions and geographical position, the Mediterranean area is characterized by remarkable biodiversity and represents a strategic bridge for the viruses from the Middle East and Africa to cross to Europe. Nevertheless, with the exception of one preliminary study (Balboni *et al.*, 2011), the Mediterranean area has been ignored by most other studies.

The first investigation on the presence of coronaviruses in European bats was carried out in 2008 by Gloza-Rausch *et al.* (2008) in Northern Germany. Gloza-Rausch *et al.* tested faeces sampled from more than 300 bats by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); a high conservative tract was amplified for all the coronaviruses of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, the 12th non structural protein codified to ORF1a,b) which is frequently used for the phylogenetic comparison of coronaviruses. Bat-CoVs belonging to the *Alphacoronavirus* were detected with an overall prevalence of 9.8%. All

the positive bats belonged to the *Myotis* and *Pipistrellus* bat genera, but no samples from the *Rhinolophus* spp. were included in the study. This study did not identify the coronavirus correlated with the SARS-CoV but hypothesised a close association of bat-CoVs with bat species rather than with sampling locations, and a central role of juvenile bats in virus amplification and transmission to adult females in maternity colonies.

In 2010, Reusken *et al.* (2010) carried out a study on the presence of coronaviruses in the Dutch bat population. More than 200 bats representing 13 different bat species were tested using RT-PCR for the presence of coronaviruses; a high percentage of infection (16,9%) was detected. This study found no SARS-related CoV but coronaviruses belonging to the *Alpha-* and *Betacoronavirus* were detected in some species of *Myotis*, *Nyctalus* and *Pipistrellus* bat genera and a closer association of the viruses with bat species than with sample location was observed. The 16.9% prevalence of coronavirus infection detected in the Netherlands was almost double that found in Northern Germany (9.8%), although some species tested were the same. These data might suggest a variation in the geographic distribution of bat-CoVs which could be influenced by several factors, such as the latitude and climate of the sampling area, the composition and density of the population, and different bat behavior and ecology.

Furthermore, both studies sampled two bat species belonging to the *Myotis* genus (*M. daubentonii* and *M. dasycneme*) more than the other species and, whereas *M. dasycneme* had approximately the same prevalence of infection in both studies, *M. daubentonii* had a far greater prevalence of infection in the Netherlands than in Northern Germany. Therefore, to confirm what has already been hypothesized, the divergence of the prevalence of infection between different European areas may be more related to the single species than to general environmental and geographical factors.

In 2010-2011, three other studies on coronaviruses in bats in different European countries were published (Drexler *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011). In these studies, the study sample also included faeces belonging to bats of the *Rhinolophus* spp. which, in Europe, is represented by five different species having dif-

ferent territorial distributions (Table 2 and Fig. 2a-e) (www.faunaeur.org). These studies demonstrated a strict correlation between SARS-like CoVs and *Rhinolophus* spp. bats in Europe as has also been shown in Asia.

Rihtaric *et al.* (2010) carried out a study on the presence of CoVs in bats in Slovenia, amplifying a highly conservative fragment of the RdRp by RT-PCR. Fourteen of the 106 bats analyzed were positive and all belonged to the 36 *Rhinolophus*

TABLE 2 - Bat species present in Europe

European bat species (www.faunaeur.org)										
Suborder	Family	Genus and species	IT	ES	FR	GE	GB	NL	BG	SL
Macrochiroptera	Pteropodidae	<i>Rousettus aegyptiacus</i>								
Microchiroptera	Molossidae	<i>Tadarida teniotis</i>	X	X	X				X	
	Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Rhinolophus hipposideros</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Rhinolophus euryale</i>	X	X	X				X	X
		<i>Rhinolophus blasii</i>	X	X	X				X	
		<i>Rhinolophus mehelyi</i>	X	X	X				X	
	Vespertilionidae	<i>Barbastella barbastellus</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Eptesicus botae</i>								
		<i>Eptesicus nilssonii</i>	X		X	X			X	X
		<i>Eptesicus serotinus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Hypsugo savii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Miniopterus schreibersii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis alcathoe</i>		X	X					
		<i>Myotis aurascens</i>	X						X	
		<i>Myotis bechsteini</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis blythii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis brandtii</i>	X		X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis capaccinii</i>	X	X	X				X	X
		<i>Myotis dasycneme</i>	X		X	X		X	X	
		<i>Myotis daubentonii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis emarginatus</i>	X	X	X	X		X	X	X
		<i>Myotis myotis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis mystacinus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis nattereri</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Myotis punicus</i>	X		X					
		<i>Nyctalus azoreum</i>								
		<i>Nyctalus lasiopterus</i>	X	X	X				X	
		<i>Nyctalus leisleri</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Nyctalus noctula</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus kuhlii</i>	X	X	X	X			X	X
		<i>Pipistrellus maderensis</i>		X						
		<i>Pipistrellus nathusii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	X	X	X	X	X		X	X
		<i>Plecotus auritus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Plecotus austriacus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
		<i>Plecotus kolombatovici</i>								
		<i>Plecotus macrobullaris</i>	X	X	X					X
		<i>Plecotus sardus</i>	X							
		<i>Plecotus teneriffae</i>		X						
		<i>Vespertilio murinus</i>	X		X	X	X	X	X	X

IT=Italy; FR=France; GB=United Kingdom; ES=Spain; GE=Germany; NL=Netherlands; BG=Bulgaria; SL=Slovenia.

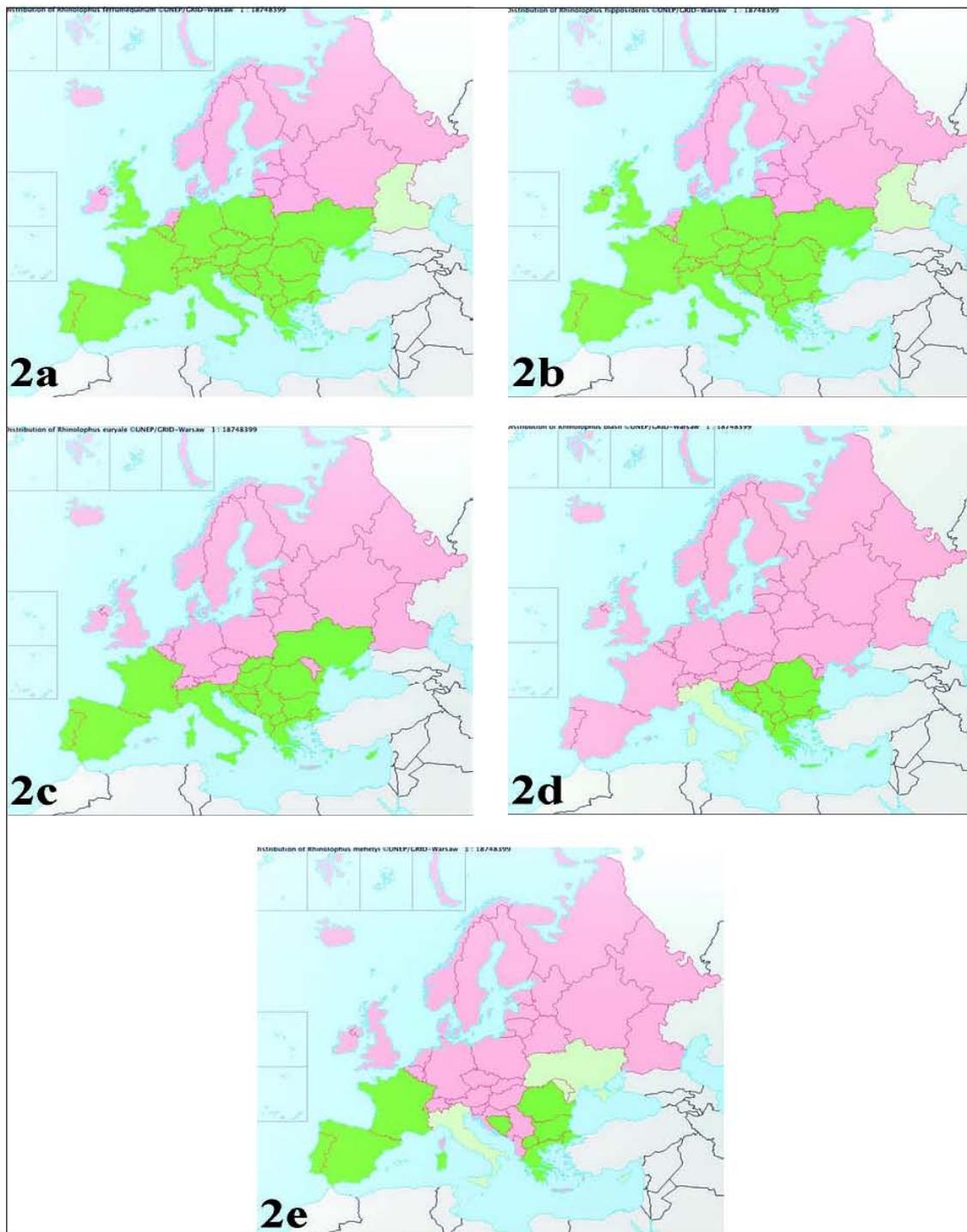


FIGURE 2 - European distribution of the *Rhinolophus* bat species (www.faunaeur.org): 2a: *R. ferrumequinum*; 2b: *R. hipposideros*; 2c: *R. euryale*; 2d: *R. blasii*; 2e: *R. mehelyi*. GREEN: present. PALE GREEN: doubtful. RED: absent.

hipposideros bats included in the population sample. Only the *Rhinolophus* spp. was positive to coronavirus infection, and bioinformatic analysis showed that the Slovenian bat coronaviruses belonged to the *Betacoronaviruses* and that the most closely related virus sequence in GenBank was SARS bat Rp3 isolated from *Rhinolophus sinicus* in China in 2004 (Li *et al.*, 2005; Rihtaric *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010). As in the first German study, the positive bats were young bats or lactating females, corroborating the hypothesis that the virus replicates more efficiently in young bats than in adults, and that young bats transmit the virus to adult females in maternity colonies.

In Rihtaric *et al.*'s study, 26 *Myotis daubentonii* bats were tested and were all negative.

Considering what had already been seen in the Netherlands and Northern Germany for this species, there may be a progressive increase in the prevalence of coronavirus infection proceeding from southeast to northwest Europe.

The research of Balboni *et al.* (2011) on bat CoVs involved only one species of the *Rhinolophus* genus found in the Italian peninsula, the *R. ferrumequinum*.

They utilized the same method as that used in preceding studies, an RT-PCR amplifying a highly conserved fragment of RdRp, detecting two positives of the 52 bats sampled, with a virus prevalence of 3.8%. Sequence analysis of one strain showed that it was genetically closely related to SARS- and other SARS-like coronaviruses belonging to the *Betacoronavirus*.

Furthermore, the Italian strain showed a close correlation to the Slovenian strains whereas the similarities with the African strain were low.

Drexler *et al.* (2010) conducted an evaluation of CoVs in rhinolophid and vespertilionid bat species in Bulgaria, in an area in which all five European *Rhinolophidae* species coexist. Two hundred and two of the 499 bats were positive with RT-PCR or nested RT-PCR when amplifying a highly conserved fragment of RdRp. The viruses detected were either *Alpha-* and *Betacoronavirus*, but all the SARS-like CoVs occurred exclusively in *Rhinolophus* (101 positives out of 389 *Rhinolophus* bats sampled).

A Bulgarian SARS-like virus was fully sequenced and its genome showed some special features in comparison with other known SARS-like CoVs, namely:

- 1) the high divergence of predicted proteins 3b and 6;
- 2) the absence of ORF8;
- 3) a greater similarity of the Bulgarian SARS-like virus spikes RBD to SARS-CoVs than to the other bat-SARS-like CoVs.

From the research carried out to date, it can be hypothesized that CoVs are widely diffused in European bats and that SARS-like CoVs are present in close correlation to bat species belonging to the *Rhinolophus* genus, as has been noted in Asia (Tang *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008).

The full genome sequence obtained in one Bulgarian bat-SARS-like CoV (GU190215) (Drexler *et al.*, 2010) also has some special features which distinguish it from the Asian and the African strains.

The total absence of ORF8 is an unexpected deletion for a bat-SARS-like-CoV genome since almost all SARS-related coronavirus strains detected in the *Rhinolophus* spp were characterized by a single ORF8, with the insertion of an 29-nts sequence which fuses together the ORF8a and 8b distinctive for Human-SARS-CoV. If it were hypothesized that the 29 nts deletion in the ORF8 of the Human-SARS-CoV represented a greater functional hallmark in the transition of the SARS-CoV to humans (Lau *et al.*, 2005; Oostra *et al.*, 2007), the absence of this ORF in the European SARS-like CoV would suggest that protein 8 may not, in general, be essential for the maintenance of the SARS-like CoV in bats (Drexler *et al.*, 2010).

This peculiar deletion in the Bulgarian SARS-like CoV, in association with the high nucleotide variability of some genes and the greater similarity of spikes RBD with the SARS-CoV than with other bat-SARS-like CoVs, suggests a possible divergence between the Asian bat SARS-like CoVs and the European bat SARS-like CoVs.

This assumption requires more extensive investigation on the European bat population to acquire more information on the epidemiology of bat-SARS-like CoVs on this continent.

The studies should also focus more closely on the bat species belonging to the *Rhinolophus* spp. and on the epidemiological situation in the Mediterranean area which could play an important role in the evolution of these viruses.

DISCUSSION

In recent decades, with the emergence of several zoonoses which have had bats as animal reservoirs, numerous studies together on the central role of bats in the dissemination of zoonotic agents have been carried out. Among these, a high variability of coronavirus strains has been discovered in several species of bats in Asia, North and South America, Africa and Europe after the SARS epidemic in the past ten years.

All coronaviruses found in bats belong to two of the three coronavirus genera: *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus*. Of particular importance, with regard to the epidemiology of SARS-CoV, is a group of coronaviruses found in some species of bats and belonging to the *Betacoronavirus*, the bat-SARS-like coronaviruses. These viruses are genetically closely related to the SARS-CoV and are probably the ancestral viruses of the marketplace animal- and human- SARS-CoVs which caused the human epidemic in 2002-2003. To date, bat-SARS-like CoVs have been discovered in Asia, Africa and Europe. Taking into account that there have been many more studies carried out on the Asian region than in Africa and Europe, some differences can be pointed out regarding these three continents.

First, the host range of bat-SARS-like CoVs is limited to the *Rhinolophus* bat genus in both Asia and Europe, suggesting a close species-specific relationship. Instead, bat-SARS-like CoVs were found in numerous different bat species belonging to several genera.

Second, numerous genomic features differentiating the coronaviruses belonging to the three continents have been added to the host differences. Thus, if it is reasonable to think that the SARS-CoV causing the human epidemic derived from the SARS-like CoVs found in Asian bats, the theories regarding the area of origin and the phylogenetic evolution of these viruses are more controversial.

A possible origin of the SARS-like CoVs in Africa was hypothesized by Quan *et al.* (2010) in the light of the characteristics of some strains, such as the ZBCoV and GhanaBt-CoVs (Pfefferle *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2010) identified in Nigeria and Ghana, respectively, which could form a separate subgroup distinct from Asian and European *Rhinolophus* SARS-related CoVs and could be

traced back to a common ancestor with the SARS-related CoV subgroup.

The African origin may have been followed by a migration which brought the bat-SARS-like CoVs to adapt to bats belonging to the *Rhinolophus* spp., thus arriving in Asia and Europe.

It is unclear whether the arrival of the bat-SARS-like CoVs in Europe followed the viral adaptation in Asian bats, or whether these viruses were first colonized in Europe, via the Mediterranean area, and from there were then passed on to Asia. On the other hand, the arrival of SARS-like CoVs from Africa to European and Asian bats could also have been the result of two independent events, with the origin of distinct viral populations, rather than two consecutive events.

Some special features of the Bulgarian SARS-like CoV distinguish it from the Asian and African strains (Drexler *et al.*, 2010), but only one completely sequenced European strain is not sufficient to clarify the evolution and the migratory events which could have characterized these viruses in Europe.

More detailed studies on the European bat population with particular reference to the Mediterranean area are required to clarify these aspects of the bat-SARS-like CoV evolution and the ramifications concerning public health as regards the potential of coronaviruses to cross species barriers and thus infect humans, as people come into closer contact with wild animals.

In this regard, and to better assess the prevalence of infection of coronaviruses in bats, the development and use of diagnostic techniques with high sensitivity is important. Indeed, the principal diagnostic method used by various researchers, especially during the initial screening phase of the population sample, is a reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplifying a fragment of variable size of the RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp, the 12th non structural protein codified to ORF1a, b), which is a genome tract frequently used for the molecular detection and phylogenetic analysis of bat coronaviruses (Lau *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010; Balboni *et al.*, 2011). However, this method may not have optimal sensitivity, causing an underestimation of the true prevalence of infection. This may be due to two main factors: first, bats are reservoirs of coronaviruses and may shed on

a small amount of viruses in faeces, too low to be detected by traditional PCR methods; second, the RdRp, although highly conserved in coronaviruses, has a moderate degree of nucleotide variability which can result in a sub-optimal match of the primers used.

In the near future, the tactics used by humans to prevent the spread of bat-associated zoonosis, should be based on two main lines of action: on the one hand systematic surveillance with appropriate techniques aimed at controlling known pathogens, such as the bat-SARS-like CoV, and discovering possible new zoonotic agents; on the other hand, the conservation of the natural habitats of bats, thus avoiding direct contact with humans and livestock.

REFERENCES

- ALTRINGHAM J.D. (1996a). Bats, biology and behaviour. New York: *Oxford university press*. Introduction, 1-4.
- ALTRINGHAM J.D. (1996b). Bats, biology and behaviour. New York: *Oxford university press*. Chapter 4, 115-132.
- ALTRINGHAM J.D. (1996c). Bats, biology and behaviour. New York: *Oxford university press*. Chapter 6, 155-198.
- ALTRINGHAM J.D. (1996d). Bats, biology and behaviour. New York: *Oxford university press*. Chapter 7, 199-229.
- BALBONI A., PALLADINI A., BOGLIANI G., BATTILANI M. (2011). Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* **139** (2), 216-219.
- BRANDÃO P.E., SCHEFFER K., VILLARREAL L.Y., ACHKAR S., OLIVEIRA RDE N., FAHL WDE O., CASTILHO J.G., KOTAIT I., RICHTZENHAIN L.J. (2008). A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Braz. J. Infect. Dis.* **12** (6), 466-458.
- CALISHER C.H., CHILDS J.E., FIELD H.E., HOLMES K.V., SCHOUNTZ T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (3), 531-545.
- CARRINGTON C.V., FOSTER J.E., ZHU H.C., ZHANG J.X., SMITH G.J., THOMPSON N., AUGUSTE A.J., RAMKISSOON V., ADESIYUN A.A., GUAN Y. (2008). Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats. *Emerg. Infect. Dis.* **14** (12), 1890-1893.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2003). Outbreak of severe acute respiratory syndrome-worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003 Mar 21. **52** (11), 226-228. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003 Apr 4. **52** (13), 284.
- CHU D.K., POON L.L., CHAN K.H., CHEN H., GUAN Y., YUEN K.Y., PEIRIS J.S. (2006). Coronaviruses in bent-winged bats (*Miniopterus* spp.). *J. Gen. Virol.* **87** (Pt 9), 2461-2466.
- CUI J., HAN N., STREICKER D., LI G., TANG X., SHI Z., HU Z., ZHAO G., FONTANET A., GUAN Y., WANG L., JONES G., FIELD H.E., DASZAK P., ZHANG S. (2007). Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerg. Infect. Dis.* **13** (10), 1526-1532.
- DOMINGUEZ S.R., O'SHEA T.J., OKO L.M., HOLMES K.V. (2007). Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **13** (9), 1295-1300.
- DONALDSON E.F., HASKEW A.N., GATES J.E., HUYNH J., MOORE C.J., FRIEMAN M.B. (2010). Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J. Virol.* **84** (24), 13004-13018.
- DREXLER J.F., GLOZA-RAUSCH F., GLENDE J., CORMAN V.M., MUTH D., GOETTSCHHE M., SEEBENS A., NIEDRIG M., PFEFFERLE S., YORDANOV S., ZHELYAZKOV L., HERMANN S., VALLO P., LUKASHEV A., MÜLLER M.A., DENG H., HERRLER G., DROSTEN C. (2010). Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* **84** (21), 11336-11349.
- DROSTEN C., GÜNTHER S., PREISER W., VAN DER WERF S., BRODT H.R., BECKER S., RABENAU H., PANNING M., KOLESNIKOVA L., FOUCHIER R.A., BERGER A., BURGUIÈRE A.M., CINATL J., EICKMANN M., ESCRIOU N., GRYWNA K., KRAMME S., MANUGUERRA J.C., MÜLLER S., RICKERTS V., STÜRMER M., VIETH S., KLENK H.D., OSTERHAUS A.D., SCHMITZ H., DOERR H.W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348** (20), 1967-1976.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U., BALL L.A. (2005). *Virus Taxonomy* ed.VIII. Amsterdam: *Elsevier academic press*, 937-955.
- GLOZA-RAUSCH F., IPSEN A., SEEBENS A., GÖTTSCHE M., PANNING M., FELIX DREXLER J., 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. *Emerg. Infect. Dis.* **14** (4), 626-631.
- GRAHAM R.L., BARIC R.S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* **84** (7), 3134-3146.
- HOU Y., PENG C., YU M., LI Y., HAN Z., LI F., WANG L.F., SHI Z. (2010). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry. *Arch. Virol.* **155** (10), 1563-1569.

- KSIAZEK T.G., ERDMAN D., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., PERET T., EMERY S., TONG S., URBANI C., COMER J.A., LIM W., ROLLIN P.E., DOWELL S.F., LING A.E., HUMPHREY C.D., SHIEH W.J., GUARNER J., PADDOCK C.D., ROTA P., FIELDS B., DERISI J., YANG J.Y., COX N., HUGHES J.M., LEDUC J.W., BELLINI W.J., ANDERSON L.J.; SARS WORKING GROUP. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348** (20), 1953-1966.
- KUNZ T.H., FENTON M.B. (2003a). Bat ecology. Chicago: *The University of Chicago Press*. Chapter 1, 3-89.
- KUNZ T.H., FENTON M.B. (2003b). Bat ecology. Chicago: *The University of Chicago Press*. **4**, 156-208.
- KUNZ T.H., FENTON M.B. (2003c). Bat ecology. Chicago: *The University of Chicago Press*. **14**, 622-679.
- LAU S.K., WOO P.C., LI K.S., HUANG Y., TSOI H.W., WONG B.H., WONG S.S., LEUNG S.Y., CHAN K.H., YUEN K.Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **102** (39), 14040-14045.
- LAU S.K., WOO P.C., LI K.S., HUANG Y., WANG M., LAM C.S., XU H., GUO R., CHAN K.H., ZHENG B.J., YUEN K.Y. (2007). Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome. *Virology*. **367** (2), 428-439.
- LAU S.K., LI K.S., HUANG Y., SHEK C.T., TSE H., WANG M., CHOI G.K., XU H., LAM C.S., GUO R., CHAN K.H., ZHENG B.J., WOO P.C., YUEN K.Y. (2010). Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *J. Virol.* **84** (6), 2808-2819.
- LI W., SHI Z., YU M., REN W., SMITH C., EPSTEIN J.H., WANG H., CRAMERI G., HU Z., ZHANG H., ZHANG J., MCEACHERN J., FIELD H., DASZAK P., EATON B.T., ZHANG S., WANG L.F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. **310** (5748), 676-679.
- LI W., WONG S.K., LI F., KUHN J.H., HUANG L.C., CHOE H., FARZAN M. (2006). Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions. *J. Virol.* **80** (9), 4211-4219.
- MARRA M.A., JONES S.J., ASTELL C.R., HOLT R.A., BROOKS-WILSON A., BUTTERFIELD Y.S., KHATTRA J., ASANO J.K., BARBER S.A., CHAN S.Y., CLOUTIER A., COUGHLIN S.M., FREEMAN D., GIRN N., GRIFFITH O.L., LEACH S.R., MAYO M., McDONALD H., MONTGOMERY S.B., PANDOH P.K., PETRESCU A.S., ROBERTSON A.G., SCHEIN J.E., SIDDIQUI A., SMAILUS D.E., STOTT J.M., YANG G.S., PLUMMER F., ANDONOV A., ARTSOB H., BASTIEN N., BERNARD K., BOOTH T.F., BOWNESS D., CZUB M., DREBOT M., FERNANDO L., FLICK R., GARBUTT M., GRAY M., GROLLO A., JONES S., FELDMANN H., MEYERS A., KABANI A., LI Y., NORMAND S., STROHER U., TIPPLES G.A., TYLER S., VOGRIG R., WARD D., WATSON B., BRUNHAM R.C., KRAJEN M., PETRIC M., SKOWRONSKI D.M., UPTON C., ROPER R.L. (2003). The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. **300** (5624), 1399-1404.
- MISRA V., DUMONCEAUX T., DUBOIS J., WILLIS C., NADIN-DAVIS S., SEVERINI A., WANDELER A., LINDSAY R., ARTSOB H. (2009). Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J. Gen. Virol.* **90** (Pt 8), 2015-2022.
- MÜLLER M.A., PAWESKA J.T., LEMAN P.A., DROSTEN C., GRYWNA K., KEMP A., BRAACK L., SONNENBERG K., NIEDRIG M., SWANEPOEL R. (2007). Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* **13** (9), 1367-1370.
- OOSTRA M., DE HAAN C.A., ROTTIER P.J. (2007). The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8. *J. Virol.* **81** (24), 13876-13888.
- PEIRIS J.S., LAI S.T., POON L.L., GUAN Y., YAM L.Y., LIM W., NICHOLLS J., YEE W.K., YAN W.W., CHEUNG M.T., CHENG V.C., CHAN K.H., TSANG D.N., YUNG R.W., NG T.K., YUEN K.Y.; SARS STUDY GROUP. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. **361** (9366), 1319-1325.
- Peiris J.S., Guan Y., Yuen K.Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.* **10**, S88-97.
- PFEFFERLE S., OPPONG S., DREXLER J.F., GLOZA-RAUSCH F., IPSEN A., SEEBENS A., MÜLLER M.A., ANNAN A., VALLO P., ADU-SARKODIE Y., KRUPPA T.F., DROSTEN C. (2009). Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg. Infect. Dis.* **15** (9), 1377-1384.
- POON L.L., CHU D.K., CHAN K.H., WONG O.K., ELLIS T.M., LEUNG Y.H., LAU S.K., WOO P.C., SUEN K.Y., YUEN K.Y., GUAN Y., PEIRIS J.S. (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* **79** (4), 2001-2009.
- QUAN P.L., FIRTH C., STREET C., HENRIQUEZ J.A., PEIROSOV A., TASHMUKHAMEDOVA A., HUTCHISON S.K., EGHOLM M., OSINUBI M.O., NIEZGODA M., OGUNKOYA A.B., BRIESE T., RUPPRECHT C.E., LIPKIN W.I. (2010). Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio*. **1** (4), e00208-00210.
- REN W., LI W., YU M., HAO P., ZHANG Y., ZHOU P., ZHANG S., ZHAO G., ZHONG Y., WANG S., WANG L.F., SHI Z. (2006). Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J. Gen. Virol.* **87** (Pt 11), 3355-3359.
- REN W., QU X., LI W., HAN Z., YU M., ZHOU P., ZHANG S.Y., WANG L.F., DENG H., SHI Z. (2008). Difference in receptor usage between severe acute respiratory

- syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* **82** (4), 1899-1907.
- REUSKEN C.B., LINA P.H., PIELAAT A., DE VRIES A., DAM-DEISZ C., ADEMA J., DREXLER J.F., DROSTEN C., KOOL E.A. (2010). Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in Western Europe. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* **10** (8), 785-791.
- RIHTARIC D., HOSTNIK P., STEYER A., GROM J., TOPLAK I. (2010). Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Arch. Virol.* **155** (4), 507-514.
- ROTA P.A., OBERSTE M.S., MONROE S.S., NIX W.A., CAMPAGNOLI R., ICENOGLE J.P., PEÑARANDA S., BANKAMP B., MAHER K., CHEN M.H., TONG S., TAMIN A., LOWE L., FRACE M., DERISI J.L., CHEN Q., WANG D., ERDMAN D.D., PERET T.C., BURNS C., KSIAZEK T.G., ROLLIN P.E., SANCHEZ A., LIFFICK S., HOLLOWAY B., LIMOR J., MCCAUSTLAND K., OLSEN-RASMUSSEN M., FOUCHIER R., GÜNTHER S., OSTERHAUS A.D., DROSTEN C., PALLANSCH M.A., ANDERSON L.J., BELLINI W.J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science.* **300** (5624), 1394-1399.
- SHI Z., HU Z. (2008). A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus. Res.* **133** (1), 74-87.
- Skowronski D.M., Astell C., Brunham R.C., Low D.E., Petric M., Roper R.L., Talbot P.J., Tam T., Babiuk L. (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review. *Annu. Rev. Med.* **56**, 357-381.
- SONG H.D., TU C.C., ZHANG G.W., WANG S.Y., ZHENG K., LEI L.C., CHEN Q.X., GAO Y.W., ZHOU H.Q., XIANG H., ZHENG H.J., CHERN S.W., CHENG F., PAN C.M., XUAN H., CHEN S.J., LUO H.M., ZHOU D.H., LIU Y.F., HE J.F., QIN P.Z., LI L.H., REN Y.Q., LIANG W.J., YU Y.D., ANDERSON L., WANG M., XU R.H., WU X.W., ZHENG H.Y., CHEN J.D., LIANG G., GAO Y., LIAO M., FANG L., JIANG L.Y., LI H., CHEN F., DI B., HE L.J., LIN J.Y., TONG S., KONG X., DU L., HAO P., TANG H., BERNINI A., YU X.J., SPIGA O., GUO Z.M., PAN H.Y., HE W.Z., MANUGUERRA J.C., FONTANET A., DANCHIN A., NICCOLAI N., LI Y.X., WU C.I., ZHAO G.P. (2005). Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102** (7), 2430-2435.
- STOCKMAN L.J., HAYNES L.M., MIAO C., HARCOURT J.L., RUPPRECHT C.E., KSIAZEK T.G., HYDE T.B., FRY A.M., ANDERSON L.J. (2008). Coronavirus antibodies in bat biologists. *Emerg. Infect. Dis.* **14** (6), 999-1000.
- TANG X.C., ZHANG J.X., ZHANG S.Y., WANG P., FAN X.H., LI L.F., LI G., DONG B.Q., LIU W., CHEUNG C.L., XU K.M., SONG W.J., VIJAYKRISHNA D., POON L.L., PEIRIS J.S., SMITH G.J., CHEN H., GUAN Y. (2006). Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* **80** (15), 7481-7490.
- TONG S., CONRARDY C., RUONE S., KUZMIN I.V., GUO X., TAO Y., NIEZGODA M., HAYNES L., AGWANDA B., BREIMAN R.F., ANDERSON L.J., RUPPRECHT C.E. (2009). Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **15** (3), 482-485.
- VIJAYKRISHNA D., SMITH G.J., ZHANG J.X., PEIRIS J.S., CHEN H., GUAN Y. (2007). Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* **81** (8), 4012-4020.
- WANG L.F., SHI Z., ZHANG S., FIELD H., DASZAK P., EATON B.T. (2006). Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* **12** (12), 1834-1840.
- WATANABE S., MASANGKAY J.S., NAGATA N., MORIKAWA S., MIZUTANI T., FUKUSHI S., ALVIOLA P., OMATSU T., UEDA N., IHA K., TANIGUCHI S., FUJII H., TSUDA S., ENDOH M., KATO K., TOHYA Y., KYUWA S., YOSHIKAWA Y., AKASHI H. (2010). Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* **16** (8), 1217-1223.
- WOO P.C., LAU S.K., LI K.S., POON R.W., WONG B.H., TSOI H.W., YIP B.C., HUANG Y., CHAN K.H., YUEN K.Y. (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology.* **351** (1), 180-187.
- WOO P.C., WANG M., LAU S.K., XU H., POON R.W., GUO R., WONG B.H., GAO K., TSOI H.W., HUANG Y., LI K.S., LAM C.S., CHAN K.H., ZHENG B.J., YUEN K.Y. (2007). Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* **81** (4), 1574-1585.
- WOO P.C., LAU S.K., HUANG Y., YUEN K.Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* **234** (10), 1117-1127.
- YU M., TACHEDJIAN M., CRAMERI G., SHI Z., WANG L.F. (2010). Identification of key amino acid residues required for horseshoe bat angiotensin-I converting enzyme 2 to function as a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Gen. Virol.* **91** (Pt 7), 1708-1712.
- YUAN J., HON C.C., LI Y., WANG D., XU G., ZHANG H., ZHOU P., POON L.L., LAM T.T., LEUNG F.C., SHI Z. (2010). Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *J. Gen. Virol.* **91** (Pt 4), 1058-1062.

Pubblicazione 4

RESEARCH

Open Access

Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats

Mara Battilani*, Andrea Balboni, Martina Ustulin, Massimo Giunti, Alessandra Scagliarini, Santino Proserpi

Abstract

Parvoviruses of carnivores include three closely related autonomous parvoviruses: canine parvovirus (CPV), feline panleukopenia virus (FPV) and mink enteritis virus (MEV). These viruses cause a variety of serious diseases, especially in young patients, since they have a remarkable predilection for replication in rapidly dividing cells. FPV is not the only parvovirus species which infects cats; in addition to MEV, the new variants of canine parvovirus, CPV-2a, 2b and 2c have also penetrated the feline host-range, and they are able to infect and replicate in cats, causing diseases indistinguishable from feline panleukopenia. Furthermore, as cats are susceptible to both CPV-2 and FPV viruses, superinfection and co-infection with multiple parvovirus strains may occur, potentially facilitating recombination and high genetic heterogeneity. In the light of the importance of cats as a potential source of genetic diversity for parvoviruses and, since feline panleukopenia virus has re-emerged as a major cause of mortality in felines, the present study has explored the molecular characteristics of parvovirus strains circulating in cat populations. The most significant findings reported in this study were (a) the detection of mixed infection FPV/CPV with the presence of one parvovirus variant which is a true intermediate between FPV/CPV and (b) the quasispecies cloud size of one CPV sample variant 2c. In conclusion, this study provides new important results about the evolutionary dynamics of CPV infections in cats, showing that CPV has presumably started a new process of readaptation in feline hosts.

Background

Parvoviruses are non-enveloped single-stranded DNA viruses which infect a wide range of mammalian species, including several members of the order Carnivora. Parvoviruses of carnivores include three closely related autonomous parvoviruses: canine parvovirus (CPV), feline panleukopenia virus (FPV) and mink enteritis virus (MEV). These viruses cause a variety of serious diseases, especially in young patients, since they have a remarkable predilection for replication in rapidly dividing cells, such as bone marrow, enteric epithelium and the foetus. Feline panleukopenia virus (FPV), the prototype parvovirus of carnivores, is responsible for a homonymous disease, a highly contagious sickness occurring in cats, characterized by severe leukopenia, gastroenteritis, reproductive disorders and nervous signs [1].

FPV is not the only parvovirus species affecting cats; in addition to MEV, the new variants of canine

parvovirus, CPV-2a, 2b [2] and 2c [3] have also penetrated the feline host-range, and they are able to infect and replicate in cats, causing diseases indistinguishable from feline panleukopenia.

In consequence of the host range shift of CPV-2 from dog to cats, natural infections of cats and wild felines with CPV-2 have been reported [4], but FPV remains the more prevalent species of parvoviruses causing disease in cats [5].

Recent investigations carried out by characterization at the molecular level of the parvovirus strains detected in cats with gastroenteritis have also shown a clear prevalence of FPV over CPV-2 in naturally infected cats [3,6]. On the contrary, in some Asian countries, more than 80% of the isolates from cats and wild felines were CPV types, but the precise mechanism of the predominance of CPV-2 in cats in these areas remains obscure [7].

Furthermore, since cats are susceptible to both CPV-2 and FPV viruses, superinfection and co-infection with multiple parvovirus strains may occur, potentially facilitating recombination and high genetic heterogeneity [8-11].

* Correspondence: mbattilani@vet.unibo.it
Department of Veterinary Medical Sciences, *Alma Mater Studiorum*, University of Bologna, Italy



In the light of the importance of cats as a potential source of genetic diversity for parvoviruses and, since feline panleukopenia virus has re-emerged as a major cause of mortality in felines, parvovirus strains detected in cats with clinical signs of panleukopenia were analyzed, and molecular characterization, sequence diversity and genetic complexity were evaluated on the VP2 capsid gene.

The detection of an FPV/CPV mixed infection in one infected cat with the presence of a parvovirus variant which is a true intermediate between CPV and FPV and the quasispecies cloud size of one CPV sample variant 2c were the most significant findings reported in this study.

Materials and methods

Samples

The sample population included 24 cats, under 15 months of age, with a clinical diagnosis of parvovirus infection and at least one biological specimen (fecal or gut samples) sent to the Laboratory of Virology of the Department of Veterinary Medical Sciences (DVMS - University of Bologna, Italy) for diagnostic purposes between March 2000 and November 2009. The biological samples collected were frozen and stored at -80°C for later analysis. Confirmation of parvovirus infection was carried out by PCR amplification as previously described [12]. The characteristics of the samples examined are summarized in Table 1.

In most cases, cats had a history of incomplete or no vaccinations. The clinical symptoms most frequently observed in our population included fever, anorexia, gastro-intestinal signs (diarrhea, vomiting), depression, weakness and leukopenia. In most of the subjects, the clinical course was mild and chronic while two patients (829/03 and 1035/09) were clinically healthy. However, 8 cats included in the study showed a more severe manifestation of the disease: 3 of them (828/03, 1033/09 and 1034/09), actually died suddenly without showing any clinical signs; the other 5 were referred to the Veterinary Teaching Hospital of the University of Bologna (VTH-UB) for a severe and acute manifestation of the disease and died shortly after admission, despite intensive therapy.

Fourteen cats came from feline colonies where recurrent cases of parvovirus infections occurred with a seasonal cadence.

Molecular characterisation of viral strains

Extraction of viral DNA, Polymerase Chain Reaction (PCR) of the VP2 gene and consensus sequencing

Viral DNA was extracted from specimens using a Nucleospin Tissue mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The entire VP2 gene was amplified with a set of primers designed for both feline and canine parvovirus (P1 forward 5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTC-3' and VP reverse 5'-TTCTAGGTGCTAGTTGAG-3'). Reactions of amplification were carried out using the Klen Taq LA Polymerase Mix (Clontech-TAKARA Bio Company, Mountain View, CA, USA) which contains KlenTaq-1 DNA polymerase as the primary polymerase and a small amount of a 3' → 5' proofreading polymerase for high fidelity PCR. The temperature cycling protocol consisted of 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C for 2 min, and extension at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. A 5 µL aliquot of each PCR product was analyzed by electrophoresis using a 1% agarose gel and ethidium bromide staining.

The targeted DNA fragments were purified using a PCR product purification kit (Roche, Mannheim, Germany) and sequenced in both orientations, sense and antisense, using standard dideoxy sequencing with fluorescence-labelled nucleotides (Applied Biosystem-PerkinElmer, Carlsbad, CA, USA).

Direct sequencing of the PCR products of two viral strains, 1469/02 and 998/08, showed an unusually high number of ambiguities; although a proofreading Taq was used, these results suggested mixed viral populations; therefore, the amplification products were cloned into the PCR 4/TOPO vector using the TOPO cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and were transformed into *Escherichia coli* DH5α-competent cells according to the manufacturer's protocol. Eight and ten recombinant clones for the strains 1469/02 and 998/08, respectively, were purified with Turbo Kit (QBIogene-MP Biomedicals, Montreal, Canada) and were sequenced.

Sequence data

The complete VP2 nucleotide sequences obtained were compared to sequences available from the GenBank and alignment of the sequences was carried out using the CLUSTAL W web interface. The alignments are available from the authors on request.

Translation of the nucleotide sequences into amino acid sequences and the degree of similarity among the sequences at both the nucleotide and the amino acid levels was determined using the BIOEDIT sequence alignment editor version 7.0.9.

A variety of statistical analyses regarding nucleotide diversity and sequence variability were carried out on the sequence data set using the versatile program DNASP version 5.10.00 [13]. Statistical analysis was carried out on the subpopulations, grouping the sequence data on the basis of the parvovirus species and the antigenic types.

The following parameters were considered: the number of polymorphic sites *S*, the nucleotide diversity

Table 1 Summary of biological specimens examined in this study

Virus	Specimen	Year of collection	Age	Clinical presentation	Vaccination status	Origin
702	Faeces	2000	2M	Gastroenteritis	none	Owner
713	Gut	2001	2M	Gastroenteritis	none	Owner
671	Gut	2002	2M	Gastroenteritis	none	Pet's store
1076	Rectal swab	2002	15M	Gastroenteritis	none	Shelter
1469	Rectal swab	2002	2M	Gastroenteritis	none	Owner
828	Gut	2003	2M	Sudden death	none	Shelter
829	Rectal swab	2003	2A	none	Complete	Shelter
1759	Gut	2003	2M	Gastroenteritis	none	Owner
1306	Gut	2004	2M	Gastroenteritis	none	Shelter
339	Gut	2006	1A	Gastroenteritis	none	Shelter
1897	Rectal swab	2006	nd	Gastroenteritis	none	Owner
159	Rectal swab	2007	9M	Gastroenteritis	Complete	Owner
173	Rectal swab	2007	7M	Gastroenteritis	Complete	Owner
239	Rectal swab	2007	7M	Gastroenteritis	Complete	Owner
398	Rectal swab	2007	3A	Gastroenteritis	Complete	Owner
998	Faeces	2008	3M	Gastroenteritis	none	Shelter
1033	Gut	2009	40D	Sudden death	none	Shelter
1034	Gut	2009	40D	Sudden death	none	Shelter
1035	Gut	2009	40D	none	none	Shelter
1036	Gut	2009	40D	Gastroenteritis	Incomplete	Shelter
1037	Gut	2009	40D	Gastroenteritis	none	Shelter
1038	Gut	2009	3M	Gastroenteritis	Incomplete	Shelter
1039	Gut	2009	40D	Gastroenteritis	none	Shelter
1040	Gut	2009	40D	Gastroenteritis	none	Shelter

Age of the cat at presentation: Y = year, M = months, D = days.
 Feline panleukopenia modified-live vaccines.

Pi (π) [14] which is the average number of substitutions between any two sequences and its standard deviation (standard error), and the total number of synonymous and non-synonymous differences.

Mutation frequency (total number of changes/total number of bases sequenced) and the percentage of mutated clones were used as indicators of genetic diversity of the viral population of strains 1469/02 and 998/08.

To examine the evolutionary pressures influencing the parvovirus evolution inside the host over time, the ratio of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (dN) to synonymous substitutions per synonymous site (dS) were estimated using the Datamonkey web interface, a maximum likelihood-based tool for the identification of sites subject to positive or negative selection. Datamonkey implements three complementary methods: single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL) and random effects likelihood (REL). The HKY85 model was employed for the entire data set and for sample 998/08 whereas, for sample 1469/02, the F81 substitution model was applied.

Since genetic recombination has been assessed as a factor in parvovirus evolution [10,11], and recombination

events could affect phylogenetic and pressure analyses, a sequence dataset was screened for recombination using Genetic Algorithms for Recombination Detection (GARD) [15].

Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were estimated using PAUP* version 4.0, with the best-fit model of nucleotide substitution determined using Modeltest [16]. The TrN + I + Γ substitution model was optimal for all the sequence data (including reference strains), whereas the GTR + I + Γ substitution model was used for the sequences analyzed in this study; the key parameter values (the TrN and GTR substitution matrix, the proportion of invariant sites I and the gamma distribution Γ of rate variation with eight categories) were estimated from the data given. To assess support for individual nodes, bootstrap resampling values were estimated with 1000 neighbor-joining trees, again employing PAUP*.

The following reference FPV strains detected in various parts of the world were obtained from GenBank and included in the phylogenetic analysis: Asia (accession numbers: AB000052; AB000054; AB000056; AB000059; AB000061; AB000064; AB000066; AB000068; AB000070; AB054225; AB054226; AB054227; AF015223;

D78584; D88286; D88287; DQ474236; DQ474237; EF988660; EU252145; EU252146; EU252147; EU697383; EU697384; EU697386; EU697387; FJ231389; FJ405225; FJ93617); Australia (accession number: X55115); Europe (accession numbers: AY665655; EF418569; DQ474238; EU145593; EU221279; EU221280; EU360958; EU360959; EU498713; EU498714; EU498716; EU498717; EU498719; FPU22188); Italy (accession numbers: EU498682; EU498683; EU498684; EU498685; EU498690; EU468692; EU498693; EU498694; EU498695; EU498697; EU498698; EU498699; EU498700; EU498701; EU498704; EU498705; EU498706; EU498707; EU498708; EU498709; EU498710; EU498711; EU498712; EU498715; EU498720); South America (accession numbers: FJ440712; EU018142; EU018143; EU018144; EU018145; FJ440714); USA (accession numbers: EU659111; EU659112; EU659113; EU659114; EU659115; M10824; M24002; M24004; U22187; U22189).

Results

In this study we analyzed 24 parvovirus strains detected in domestic cats. Molecular detection of the parvoviruses was carried out on biological specimens by applying PCR, and the VP2 gene sequences were determined.

The nucleotide sequences of the VP2 gene obtained were 1745 bp in length. Analysis of the deduced amino acid residues at critical positions allowed the identification of the parvovirus species: 22 viral strains were FPV while, for two strains, 1469/02 and 998/08, it was necessary to proceed with the cloning of the amplicons, since the direct sequencing of PCR products showed an unusually high number of ambiguities, suggesting the presence of mixed viral populations. The amplification products of 1745 bp of strains 1469/02 and 998/08 were cloned, and 8 and 10 clones respectively, were chosen for sequencing.

Comparison of the nucleotide sequences of the 1469/02 clones evidenced 8 different viral populations with a sequence similarity at the nucleotide level which varied from 99.8 to 99.9%. At the amino acid level, clones 2-6-7 were identical while the remaining clones differed in identity by 99.5 to 99.8%. Analysing the amino acid positions which distinguish the feline and canine parvovirus species and the antigenic types of CPV, it was seen that all clones of 1469/02 belonged to the new variant CPV-2c.

Sequence analysis of 10 clones of strain 998/08 showed complete identity between clone 6 and clone 20 as well as between clones 1, 3, 4 and 7 at the nucleotide level; the other clones showed a sequence similarity which varied from 98.3 to 99.9%. On the basis of the deduced amino acid sequences, clones 1-3-4-7-12-13 were identical; the remaining clones showed a sequence similarity which varied from 97.6 to 99.8%. Analysis of the critical residues which affect the host-range and

antigenic properties of parvoviruses of carnivores, showed that clones 6, 15 and 20 were CPV-2a; instead, clones 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13 were FPV, with evidence of a mixed infection involving two species of parvovirus in the same patient.

Regarding the 22 FPV strains, comparison of the nucleotide sequences showed a 100% similarity between the following strains: 828/03 and 829/03; 159/07, 239/07 and 398/07; 1033/09, 1034/09, 1035/09, 1036/09, 1037/09, 1038/09, 1039/09 and 1040/09. In the remaining strains, the similarity ranged from 99.1 to 99.8%. At the amino acid level, strains 828/03, 713/01, 239/07, 398/07, 173/07, 1897/06 and clones 1, 3, 4, 7, 12, 13 of strain 998/08, as well as strains 339/06 and 1076/02 were identical; the other strains showed a sequence of similarity which varied from 99.6 to 99.8.

Several synonymous and non-synonymous substitutions were detected by comparing the sequences. The predicted amino acid sequence substitutions are summarized in Table 2. The sequences obtained were compared to parvovirus reference strains retrieved from the GenBank database; the alignments showed that, of the 6 non-synonymous changes, at least 2 were very common since the reference strains also showed them and they are the coding change in residue 13 (Pro→Ser) and residue 91 (Ala→Ser). The VP2 Asn 426-to-Ser, Lys 501-to-Arg, Asn 517-to-Ser changes were unique and characteristic of our strains.

Sample 1469/02 showed unusually high genetic diversity generated within the infected host; six of the 10 (60%) mutations were non-synonymous. Coding changes located in residues 46 (Asn→Asp), 98 (Leu→Ser), 340 (Ala→Val), 373 (Asp→Val) and 511 (Asp→Asn) have not previously been reported while the mutation affecting position 282 (Asn→Asp) has already been reported [17].

The 998/08 sample also displayed very high genetic complexity; on the basis of the VP2 amino acid sequences, we were able to detect four main viral populations: clones 1, 3, 4, 7, 12 and 13 resemble the predominant FPV strains circulating in our area since these clones are identical to the majority of the FPV strains analyzed in this study while clone 9 is an FPV strain with unique characteristics, and is distinguishable from the other clones due to the presence of coding change VP2 Leu 498-to-Ser. Clones 6 and 20 are typical CPV-2a with a coding change located at position 482 (Leu→Pro), and finally clone 15, is a true intermediate between CPV and FPV, since analyzing the 10 important host-specific amino acids of FPV and CPV, showed that there were eight residues identical to CPV-2a and two amino acids identical to FPV (Table 2).

Summaries of sample sequence variability are presented in Table 3. The sequence data are analyzed

Table 2 Change of amino acids in the sequence of VP2 of the viral strains

SAMPLES	Amino acid position																												TYPE
	13	46	80	87	91	93	98	103	110	232	282	297	300	305	323	340	373	415	426	440	482	498	501	511	517	564	568		
FPV ^a	Pro	Asn	Lys	Met	Ala	Lys	Leu	Val	Ser	Val	Asn	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Ile	Asn	Thr	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Asn	Ala		
CPV-2 ^b	-	-	Arg	-	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2a ^b	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2b ^b	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2a ^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2b ^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2c ^c	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	-	-	-		
702/00	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-		
713/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
671/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1759/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1306/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
339/06	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1034/09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_1	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_2	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_3	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_4	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_8	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1469/02_10	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
998/08_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
998/08_6	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Ile	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
998/08_9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
998/08_15	-	-	Arg	Leu	-	Asn	-	Ala	-	Pro	-	-	Ala	Gly	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

In order to simplify the presentation of results, the identical sequences at the amino acid level have not been included in the table. The host-specific amino acids which distinguish the FPV and CPV strains are represented by grey dashes.

^aDeduced amino acid sequences of the VP2 gene were obtained from the GenBank.

^bPrototype FPV; reference strain FPV-b accession number: M38246.

^cPrototypes CPV: type 2: CPV-b (M38245), type 2a: CPV-15 (M74003), type 2b: CPV-39 (M74849).

^dReference strains: type 2a: CPV-677 (AF306445), type 2b: CPV-637 (AF306450), type 2c: CPV-695 (AF01519).

Table 3 Summaries of sample sequence variability

Sample	S ^b	π ^c	SynDif ^d	NSynDif (a) ^e	NSyn fraction ^f
FPV (n ^a = 22)	37	0.00551 (SE 0.00049)	31	6	0.16
1469/02 (n = 8)	10	0.00153 (SE 0.00018)	4	6	0.60
998/08 (n = 10)	34	0.00913 (SE 0.00266)	19	15	0.44
116/05 (n = 14)	19	0.00156 (SE 0.00036)	7	12	0.63
231/03 (n = 3)	6	0.00229 (SE 0.00108)	4	2	0.33

^an, sample size.

^bS, polymorphic sites.

^cπ, nucleotide diversity.

^dSynDif: total number of synonymous differences.

^eNSynDif: total number of non-synonymous differences.

^fNSyn fraction: non-synonymous fraction.

separately on the basis of viral typing, grouping the sequences into three different subpopulations: FPV (all typical FPV strains), 1469/02 (all clones of sample 1469/02) and 998/08 (all clones of sample 998/08). The data are compared to samples showing analogous characteristics of genetic diversity and previously analyzed in our laboratory [8,18]. The sequence variability of the 998/08 sample was higher than the variability of the other sequence data analyzed, as was seen by the values of parameter π. A total of 34 polymorphic sites were found scattered within the sequence data of sample 998/08. The non-synonymous fraction was greater for sample 1469/02, indicating a clear prevalence of the number of non-synonymous mutations in this sample. In fact, in the clones of 1469/02, there were 6 non-synonymous mutations out of a total of 10 mutations.

For samples 1469/02 and 998/08, the mutation frequency and the percentage of mutated viral clones were used as indicators of population diversity. The mutation frequency was of the order of one mutation every 7.2×10^{-4} nt to 2×10^{-3} nt (Table 4).

To evaluate the selection pressure which acts on the VP2 gene, the ratio of synonymous (dS) and non-synonymous substitutions (dN) per site was calculated for the entire gene; the values of the dN/dS ratio were estimated as 0.27 for the entire sequence data set, 0.04 for the FPV dataset, 0.33 for sample 1469/02 and 0.18 for

Table 4 Quasispecies variation in the viral populations detected within infected hosts

Sample	% Mutated clones	Total mutations/bases sequenced	Mutation frequency
1469/02	100 (8/8)	10/13960	7.2×10^{-4}
998/08	60 (6/10)	34/17450	2×10^{-3}
116/05	57 (8/14)	19/24430	7.8×10^{-4}
231/03	67 (2/3)	6/5235	1.1×10^{-3}

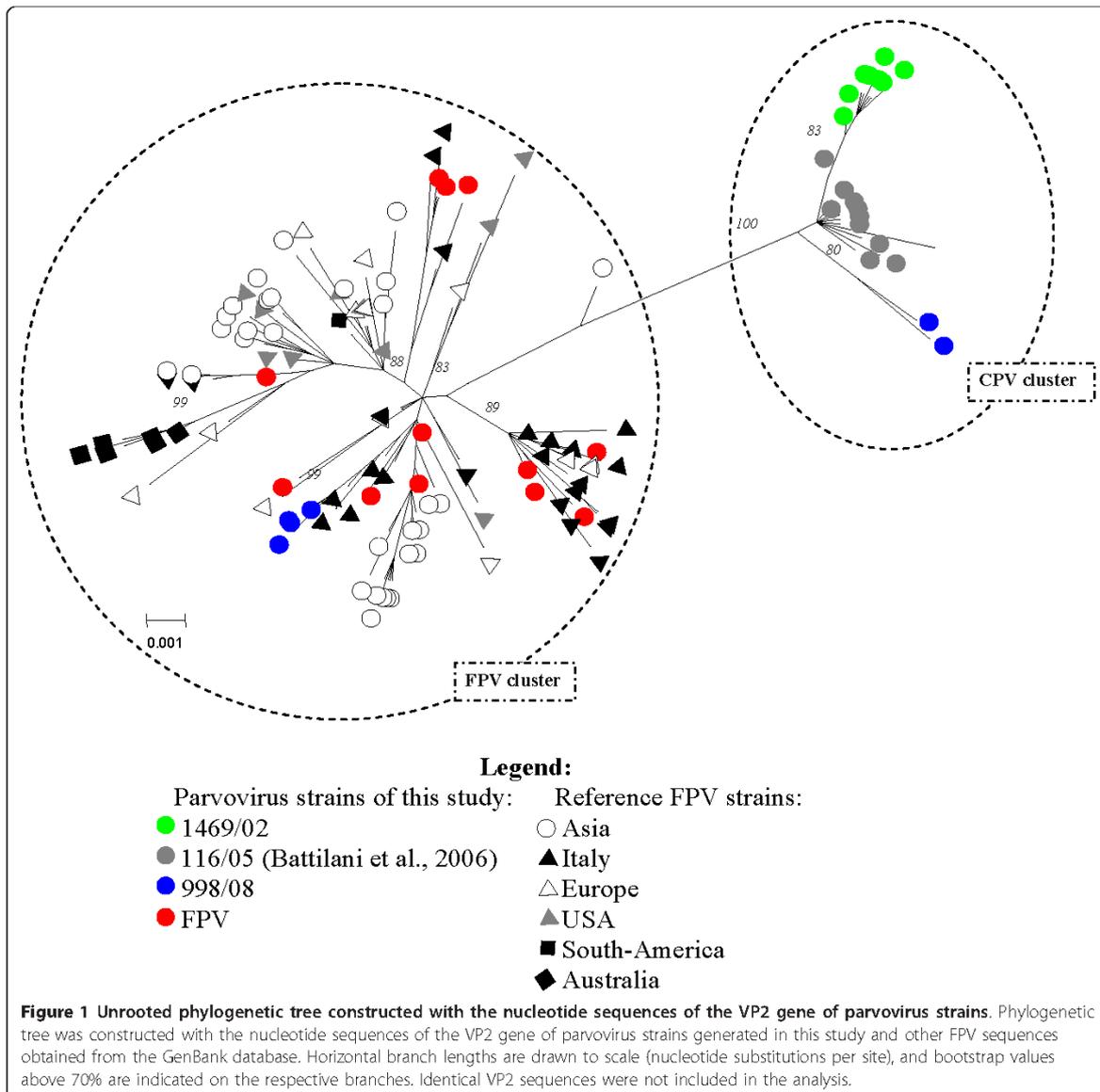
sample 998/08. A maximum likelihood approach was used for detecting the sites under selection in the viral clones. All methods implemented in the Datamonkey web interface were run and a comparative analysis integration was carried out. When the entire sequence data set was analyzed, the SLAC and FEL methods did not detect sites subject to positive selection but they found 8 and 32 sites under negative selections. The only REL analysis has detected 3 positively selected sites when the value of the Bayes factor was 100 (codons 13, 426, 564). The pressure analyses were carried out separately on the clone data sets, with the aim of investigating which selective forces acted during intra-host infection. All methods pointed out several sites under negative selection for samples 998/08 and 1469/02, and the REL method showed that all sites were under purifying selection for sample 1469/02. No potential recombination events were detected in the data set of the viral clones.

A phylogenetic tree was constructed from the VP2 nucleotide sequences obtained in this study and additional sequences were retrieved from the GenBank database. Unrooted tree showed two main clusters supported by elevated bootstrap values: FPV clade one and CPV clade one. The CPV cluster included all clones of sample 1469/02 and the CPV-2a clones of sample 998/08, with clone 15 of sample 998/08 forming a monophyletic branch. Inside the FPV cluster, a clear clustering on a temporal or geographical basis was not noted (Figure 1). Many FPV strains analyzed in this study clustered with Italian, European and Asian FPV strains. A recent FPV strain isolated from diarrhoeic monkeys [19] forms a separate lineage between the two clusters.

Discussion

FPV infections of cats

The present study explored the molecular characteristics of parvovirus strains circulating in cat populations and, although limited in the number of sequences analyzed, provides important new findings about the evolutionary dynamics of parvoviruses in cats and the host-virus relationships. Current results have demonstrated that the majority of feline panleukopenia outbreaks are caused by classic FPV strains and that FPV varies at a slow rate by random genetic drift, without a clear temporal or geographical distribution, as has already been reported in a recent study [6]. Considering all the nucleotide changes encountered in the VP2 sequences of FPV, synonymous substitutions predominated over non-synonymous substitutions, and the majority of FPV strains are identical at the amino acidic level. In spite of the low level of variability evidenced in the capsid gene, among the non-synonymous mutations of FPV sequences, one change involving an important epitope



for CPV, residue 426, should be noted. Changes in residue 426 have modified the antigenic profile of CPV since it is located in the major antigenic region over the three-fold spike of the CPV capsid, and molecular epidemiological studies have demonstrated that complicated selection dynamics act on this residue [20]. Residue 426 has undergone two mutations since the emergence of CPV, first from asparagine to aspartate and, more recently, to glutamate, amino acid changes which constitute an important genetic marker for the new variants of CPV, and the only coding changes capable of distinguishing the CPV-2a strains from CPV-2b/2c strains

[21]. The biological consequences of these mutations are not clear, although it has been observed that the new variants have acquired definite advantages over the original CPV-2. Mutations involving residue 426 have not previously been reported for FPV in the literature; therefore, the exact consequences of the change Asn-426 to Ser detected in FPV strain 1306/04 are not known but, analogously to CPV, it may be hypothesised that this change could affect the antigenic profile of FPV and confer an evolutive advantage to the virus. Further studies and investigations on other FPV strains detected from other parts of the world are needed to

clarify whether this mutation is fixed in the FPV population as a consequence of the mechanisms of antigenic escape or further adaptation to the feline host.

Multiple CPV infections of cats and evidence for coinfection

The diffusion of CPV in domestic cats and the pathogenic potential of CPV in causing infection or disease in cats have not been systematically investigated. Our report confirms that feline CPV infections are rare in Europe, since CPV is found only sporadically in feline biological samples [5].

A particularly significant finding in this study was the unusual genetic complexity reported for sample 1469/02, with 8 different viral populations belonging to type 2c of the CPV which coexisted in an infected cat, a phenomenon which resembles the quasispecies distribution found in RNA virus populations.

It is interesting to note that, in sample 1469/02, only the antigenic CPV variant 2c was detected, and this variant has already been reported in multiple infections of high genetic complexity. The genetic diversity displayed by sample 1469/02 was analogous to the high levels of sequence variation observed for a CPV sample (116/05) analyzed in our previous report, where a coinfection with two antigenically CPV variants 2a and 2c in a domestic cat was detected (Table 3) [8]; in that case, superinfection with many CPV variants was the source of such genetic diversity. In addition, we reported a coinfection in a dog with CPV variants 2a and 2c [18].

Experimental data and field observations reported a more severe clinical course and higher mortality rates associated with CPV-2c infection as well as an ability to infect and cause diseases in adult dogs, even if repeatedly vaccinated, suggesting that the Glu-426 mutation could provide a certain advantage in viral replication [22].

The unique antigenic pattern exhibited by CPV-2c could confer biological advantages on this variant, such as the possibility of escaping the adaptive immune system and the chance of increasing the complexity and diversity of the quasispecies. Diversity in viral quasispecies has been described as a mechanism for avoiding host resistance responses or a reservoir for maintaining variants with a selective advantage in other environments, and it has been correlated with the ability of infecting numerous hosts [23], having relevant biological implications for viral evolution and pathogenesis.

Furthermore, it is necessary to point out the genetic complexity observed in another sample (998/08), analyzed in this study. Sample 998/08 contained two distinct species of parvovirus, FPV and CPV type 2a, with the presence of one parvovirus variant, clone 15, that showed intermediate characteristics between FPV and CPV-2a. Clone 15 presented at positions 80, 93, 103 and 323, the

same residues as typical CPV-2a, but residue 564 and 568 displayed amino acids Asn and Ala which are typical of FPV sequences. Since Datamonkey analysis excluded the fact that recombination events took place, it has been hypothesized that these coding changes are the result of de novo mutations arising during in vivo infection as an adaptation of CPV into the new environment. Since cats constitute a relatively new host for CPV, the changes in positions 564 and 568 could increase viral fitness and be the result of virus adaptation on the new host species. Furthermore, the mutation frequency detected in sample 998/08 was of the order of 2×10^{-3} , a value analogous to the RNA virus, and higher when compared to the annual substitution rate of the order of 10^{-4} to 10^{-5} nt. estimates of carnivore parvovirus. This result supports the importance of coinfection as a potential source of genetic diversity, confirming previous reports about the intrahost diversity of parvoviruses [9]. On the other hand, the higher genetic heterogeneity detected in sample 998/08 points out the predominant epidemiological role of cats as (a) carriers of carnivore parvovirus since it is susceptible to both viruses and (b) sources of new variants of parvoviruses [24]. Although coinfection with CPV and FPV would be a plausible event, to the author's knowledge, it has not previously been reported in the natural state. Our study demonstrated that CPV-FPV coinfection in cats has generated more variants for both species and, in particular, a CPV variant which is a true intermediate between the two species has been identified. A previous study demonstrated that CPV has emerged as a host range variant of FPV and this variant has acquired the ability to infect dogs through multistep changes in its capsid protein controlling critical molecular interaction with host cell receptor TfR binding [25]. This type of multistep adaptation has already been seen for other viruses, such as the influenza virus, and it is favoured when viable intermediate viruses can be selected [26]. The emergence of CPV has also involved the interspecies transmission between wild and domestic carnivores, a hypothesis confirmed by the detection of FPV-like strains with intermediate characteristics between CPV/FPV [27]. The report of clone 15 in sample 998/08 which contained FPV- and CPV-specific epitopes stresses the importance of this mechanism of multistep mutation in the production of new variants and in the emergence of new viruses.

In conclusion, this study provides new important results about the evolutionary dynamics of CPV infections in cats, showing that CPV has presumably started a new process of readaptation in the feline host and confirming the importance of viral host switching as a mechanism for the emergence of new viruses. The detection of mixed FPV/CPV infections in cats, associated with the report of the high genetic diversity of CPV-2 when it infects and replicates in cats, indicates the need to conduct additional

studies in order to clarify the epidemiological role of cats in parvovirus infection, and it emphasizes the possible role of cats as a source of new variants of parvoviruses.

Furthermore, the introduction of CPV into the feline population raises some concerns about the efficacy of FPV-based vaccines in preventing CPV infection, and points out the necessity for intensifying surveillance of parvovirus infection in cats.

List of Abbreviations

CPV: Canine Parvovirus; FPV: Feline Parvovirus; MEV: Mink Enteritis Virus; PCR: Polymerase Chain Reaction; SLAC: Single Likelihood Ancestor Containing; FEL: Fixed Effects Likelihood; REL: Random Effects Likelihood.

Authors' contributions

MB: design of the study, carried out the molecular genetic studies, performed the statistical and phylogenetic analysis, and drafted the manuscript.

AB: carried out the molecular analysis of the biological specimens, participated to the drafting of the manuscript.

MU: carried out the molecular analysis of the biological specimens.

MG: performed clinical diagnosis, collected the samples and helped to draft the manuscript.

AS: participated to the statistical analysis and to the drafting of the manuscript.

SP: coordinated and participated to design of the study.

All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 1 June 2010 Accepted: 14 September 2010

Published: 2 March 2011

References

1. Verge J, Christoforoni N: **La gastroenterite infectieuse des chats; est-elle due à un virus filtrable?** *CR Seances Soc Biol Fil* 1928, **99**:312.
2. Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR: **Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo.** *J Virol* 1995, **63**:4702-4710.
3. Battilani M, Bassani M, Forti D, Morganti L: **Analysis on the evolution of feline parvovirus (FPV).** *Vet Res Commun* 2006, **30**(Suppl 1):223-226.
4. Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U: **Parvovirus infections in wild carnivores.** *J Wildlife Dis* 2001, **37**(3):594-607.
5. Truyen U, Addie A, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC: **Feline Panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management.** *JFMS* 2009, **11**:538-546.
6. Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza A, Buonavoglia C: **Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis.** *J Gen Virol* 2008, **89**(Pt 9):2290-2298.
7. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E: **Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats.** *Virology* 2000, **278**:13-19.
8. Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S: **High genetic diversity of the VP2 of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat.** *Virology* 2006, **352**(1):22-26.
9. Hoelzer K, Shalckelton L, Holmes EC, Parrish CR: **Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats.** *J Virol* 2008, **82**(22):11096-11105.
10. Mochizuki M, Ohshima T, Une Y, Yachi A: **Recombination between vaccine and field strains of Canine Parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures.** *J Vet Med Sci* 2008, **70**(12):1305-1314.

11. Ohshima T, Ohshima T, Mochizuki M: **Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2.** *J Vet Med Sci* 2009, **71**(4):403-408.
12. Schunck B, Kraft W, Truyen U: **A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces.** *J Virol Methods* 1995, **55**:427-33.
13. Librado P, Rozas J: **A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**:1451-1452.
14. Nei M, Miller JC: **A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data.** *Genetics* 1990, **125**(4):873-879.
15. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD: **Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm.** *Mol Biol Evol* 2006, **23**:1891-1901.
16. Posada D, Crandall KA: **MODELTEST: testing the model of DNA substitution.** *Bioinformatics* 1998, **14**:817-818.
17. Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mara V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C: **Genetic analysis of canine parvovirus type 2c.** *Virology* 2009, **385**(1):5-10.
18. Battilani M, Gallina L, Vaccari F, Morganti L: **Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2).** *Vet Res Commun* 2007, **31**(Suppl 1):209-212.
19. Yang S, Wang S, Feng H, Zeng L, Xia Z, Zhang R, Zou X, Wang C, Liu Q, Xia X: **Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey.** *Vet Microbiol* 2009, **143**(2-4):155-159.
20. Hoelzer K, Shalckelton LA, Parrish CR, Holmes EC: **Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses.** *J Gen Virol* 2008, **89**:2280-2289.
21. Martella V, Decaro N, Buonavoglia C: **Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization.** *Virus Genes* 2006, **33**:11-13.
22. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C: **Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c.** *New Microbiol* 2008, **31**:125-130.
23. Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E: **Memory in viral quasispecies.** *J Virol* 2000, **74**:3543-3547.
24. Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mochizuki M: **Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:341-346.
25. Hueffer K, Parker JSL, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY, Parrish CR: **The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor.** *J Virol* 2003, **77**(3):1718-1726.
26. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park EC, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P: **Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases.** *Microbiol Mol Biol R* 2008, **72**(3):457-470.
27. Truyen U, Muller T, Heidrich R, Tackmann K, Carmichael LE: **Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus.** *Epidemiol Infect* 1998, **121**:433-440.

doi:10.1186/1297-9716-42-43

Cite this article as: Battilani et al: Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Veterinary Research* 2011 **42**:43.

APPENDICE 1: Tabella dei campionamenti di *Rhinolophus ferrumequinum* in Italia

n° accettazioe MIPAV	Matrice	Data campionamento	Provenienza	Sesso	Età	Estratto QIAGEN RNeasy	RT-PCR RdRp in6-in7	Estratto QIAGEN viral	Real Time- PCR	N° campioni (positivi)
771/09	1	TR	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
	2	TR	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
	3	TR	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
	4	FE	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
	5	FE	05/07/2009	1: Palagano, MO	M	ad			P	
	6	TR	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
	7	FE	05/07/2009	1: Palagano, MO	F	ad			N	
			Tot 1: Palagano, MO							7 (1)
893/09	1	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	M	juv			N	
	2	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	3	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	4	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	5	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	6	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	7	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	M	juv			N	
	8	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	juv			N	
	9	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	10	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	M	juv			N	
	11	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			P	
	12	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	13	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad			N	
	14	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	M	juv			N	

15	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad		N
16	FE	01/08/2009	2: S. Nicola Imbuti, FG	F	ad		N
Tot: 2: S. Nicola Imbuti, FG							16 (1)
17	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
18	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
19	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
20	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
21	FE	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	F	ad		N
22	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	F	ad		N
23	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
24	TR	01/08/2009	3: Foresta Umbra, Forestale, FG	M	ad		N
Tot: 3: Foresta Umbra, Forestale, FG							8 (0)
25	FE	22/07/2009	4: Gravedona, CO	F	ad		N
26	FE	22/07/2009	4: Gravedona, CO	F	ad		N
Tot: 4: Gravedona, CO							2 (0)
34	FE	20/07/2009	5: Terra del Sole, FC	F	ad		N
35	FE	20/07/2009	5: Terra del Sole, FC	M	juv		N
36	FE	20/07/2009	5: Terra del Sole, FC	F	ad		N
37	FE	20/07/2009	5: Terra del Sole, FC	M	juv		N
Tot: 5: Terra del Sole, FC							4 (0)
42	FE	31/07/2009	6: Foresta Umbra, Caserma, FG	M	ad		N
43	FE	31/07/2009	6: Foresta Umbra, Caserma, FG	F	ad		N
44	FE	31/07/2009	6: Foresta Umbra, Caserma, FG	M	ad		N
Tot: 6: Foresta Umbra, Caserma, FG							3 (0)
50	FE	18/07/2009	7: Cormons, GO	F	ad		N
51	FE	18/07/2009	7: Cormons, GO	F	ad		N
Tot: 7: Cormons, GO							2 (0)

52	FE	12/08/2009	8: Esanatoglia, MC	M	juv		N	
53	FE	12/08/2009	8: Esanatoglia, MC	F	juv		N	
54	FE	12/08/2009	8: Esanatoglia, MC	F	ad		N	
Tot: 8: Esanatoglia, MC								3 (0)
55	FE	27/07/2009	9: Jazzo di Pandora, MT	F	ad		N	
Tot: 9: Jazzo di Pandora, MT								1 (0)
56	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	F	ad		N	
57	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	F	ad		N	
58	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	F	juv		N	
59	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	F	ad		N	
60	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	M	juv		N	
61	FE	28/07/2009	10: Annunziatella, MT	F	ad		N	
Tot: 10: Annunziatella, MT								6 (0)
66	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
68	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
70	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
71	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	juv			P
72	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
74	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
75	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	juv			P
77	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			N
78	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
79	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	juv			P
80	FE	16/08/2009	A: San Cesario s/ Panaro, MO	F	ad			P
Tot: A: San Cesario s/ Panaro, MO								11 (10)
1028/09	1	FE	05/10/2009	C: Monte Croara, S. Lazzaro, BO	F	ad		N
	2	FE	05/10/2009	C: Monte Croara, S. Lazzaro, BO	F	ad		N

Tot: C: Monte Croara, S. Lazzaro, BO							2 (0)
3	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
4	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
5	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
6	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	M	ad		N
7	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
8	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
9	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	ad		N
10	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	M	ad		N
11	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	M	ad		N
12	FE	11/10/2009	D: Piobesi d'Alba, CN	F	juv		N
Tot: D: Piobesi d'Alba, CN							10 (0)
13	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		P
14	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		N
15	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		N
16	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		N
17	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	M	ad		N
18	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	M	ad		N
19	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		N
20	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		P
21	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	M	ad		P
22	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	M	ad		N
23	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	M	ad		N
24	FE	11/10/2009	E: Rossana, CN	F	ad		N
Tot: E: Rossana, CN							12 (3)
26	FE	18/09/2009	B: Sigillo, PG	F	ad		N
Tot: B: Sigillo, PG							1 (0)

1103/09	1	FE	20/10/2009	G: Val di Trebbia, PC	F	\	[REDACTED]	N
	2	FE	20/10/2009	G: Val di Trebbia, PC	F	\		P
	3	FE	20/10/2009	G: Val di Trebbia, PC	F	ad		N
Tot: G: Val di Trebbia, PC								3 (1)
	4	FE	19/10/2009	F: Giovo, SV	M	ad	[REDACTED]	P
	5	FE	19/10/2009	F: Giovo, SV	F	\		P
	6	FE	19/10/2009	F: Giovo, SV	M	ad		P
Tot: F: Giovo, SV								3 (3)
88/10	4	FE	04/11/2009	H: Castell'arquato, PC	F	ad	[REDACTED]	P
	5	FE	04/11/2009	H: Castell'arquato, PC	F	ad		P
	6	FE	04/11/2009	H: Castell'arquato, PC	F	ad		N
Tot: H: Castell'arquato, PC								3 (2)

FE: feci. TR: tampone rettale.

M: maschio. F: femmina.

ad: adulto. juv: giovane.

N: negativo. P: positivo.

APPENDICE 2: Primer utilizzati

Nome	Sequenza nucleotidica
IN-6 (forward)	5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'
IN-7 (reverse)	5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3'
11-FW modified (forward)	5'-TGA TGA TGC CGT CGT GTG CTA CAA-3'
13-RV modified (reverse)	5'- TGT GAG CAA AAT TCG TGA GGT CC-3'
CoV2a-F (forward)	5'-CTT ATG GGT TGG GAT TAT CC-3'
CoV2a-R (reverse)	5'-TTA TAA CAG ACA ACG CCA TCA TC-3'
CoV2a-Rnest a (reverse)	5'-CCA TCA TCA CTC AGA ATC ATC A-3'
CoV2a-Rnest b (reverse)	5'-CCA TCA TCA GAA AGA ATC ATC A-3'
PanCoV GrII F (forward)	5'-CAG TGA TGT TGA AAC TCC TAA CCT-3'
PanCoV GrII R (reverse)	5'-AGC AAA CAA CAG CAT CAT CAG A-3'
PanCoV GrII Fnest (forward)	5'-GTT GAA ACT CCT AAC CTY ATG G-3'
PanCoV GrII Rnest (reverse)	5'-CAG CAT CAT CAG AGA GAA TCA TCA-3'
CoV GrII F3080 (forward)	5'-CTT CTT CTT TGC TCA GGA TGG CAA TGC TGC-3'
CoV-RhiFerPol IT-R (reverse)	5'-CTA ACC TGT AGA AAC GGT GTG-3'
CoV-RhiFerPol IT-Rnest (reverse)	5'-CAA GTA CTA TGT TTG CGA GCA AG-3'
CoVARS-RhiSpike-F2315 (forward)	5'-TCT TGG AAT GCC GAT CTT TAT AAG CT-3'
CoVARS-RhiSpike-F2342 (forward)	5'-ATG GGA TAT TTC TCA TGG TGG AC-3'
CoVARS-RhiSpike-R2643 (reverse)	5'-TCT CTA ATG ATA AGT CTA CCC TTT TC-3'
CoVARS-RhiSpike-F6287 (forward)	5'-TGG CCK TGG TAT GTK TGG CTY GG-3'
CoVARS-RhiSpike-R6635 (reverse)	5'-GCA ACG CCA AYA AYA AGC CAT CSG AAA G-3'
CoVARS-RhiSpike-R6658 (reverse)	5'-CGC TYT GAA AAA CAG CAA GAA RTG CAA C-3'
CoVARS-RhiSpike-F6608 (forward)	5'-CTT TCG GAT GGC TTG TTG TTG GCG TTG C-3'
CoVARS-RhiSpike-F6634 (forward)	5'-GCA TTT CTT GCT GTT TTT CAG AGC GCT-3'
CoVARS-RhiSpike-R6883 (reverse)	5'-TGC ATT TCC AGC ACA GCC AGC ATC T-3'
CoVARS-RhiSpike-F27815 (forward)	5'-TGG TTC ACA GCT CTC ACT CAG CAT GG-3'
CoVARS-RhiSpike-R27955 (reverse)	5'-TCA CCA CCA CGA ACT CGT CGG GTA G-3'
CoVARS-RhiSpike-R28008 (reverse)	5'-CCA GTT CCT AGR TAR TAG AAR TAC CA-3'
CoV-RhiFerIT-25140 R (reverse)	5'-GCA AGA ACC ACA AGA GCA CAA G-3'
CoV-RhiFerIT-27530 R (reverse)	5'-TTG GTC ATC TTT GGT ACT ATT GGT-3'
CoV-RF21000IT 1-2-17-18 F (forward)	5'-CCT TGG TAA ACA GAA AGA GTC C-3'
CoV-RhiFer21000IT-Fnest (forward)	5'-GCT AAC TAC ATA TTT TGG AGG AAC AC-3'
CoV-RF25100IT 1-2-17-18 Rnest (reverse)	5'-ACT ACA ACA ACT GGT CAT GCA AC-3'
CoV-RF21000IT 15-9-13 F (forward)	5'-CAT TGA TGG TTA CAC CAT GCA TG-3'
CoV-RF25100IT 15-9-13 Rnest (reverse)	5'-CAG CTA CAA CAA CTA GTC ATA CAG-3'
CoV-RF25350IT-1-2-17 F (forward)	5'-GCG TTG TCT TTA CAG AAG CTT C-3'
CoV-RhiFer IT-25500 Fnest (forward)	5'-GTT CTT ATC TAC TTC TTG CAA TGT ATT G-3'
CoV-RhiFerIT-27500 Rnest (reverse)	5'-CCC TCT TGG AAA GGA GAG AC-3'
CoV-RF25350IT 13-15-18 F (forward)	5'-GTT GCA GCT GGA CTG GAA GCA-3'
CoVARS-RhiSpike-R3780 (reverse)	5'-GAR TTG TAR AGM ACW GWG TAR TCH GCA ACA CAA T-3'
CoVARS-RhiSpike-R4236 (reverse)	5'-GGY CCA CAA ACY GTD GCM GGT GCR TT-3'
CoV-RhiFerIT-25100 F	5'-GCT TGT GCT CTT GTG GTT CTT G-3'
CoV-RhiFerIT-25200 Fnest	5'-CAA CAT TTT CAC TTT AGG CTC TAT TG-3'

CoV-RhiFerIT-25400 R	5'-CAA AGC AGC TGG AAG CTT CTG-3'
3'-RACE oligo dt (reverse)	5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
CoV-RhiFerIT-27530 F (forward)	5'-CTC CTT TCC AAG AGG GCA AG-3'
3'-RACE primer (reverse)	5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'
CoV-RhiFerIT-27530 Fnest (forward)	5'-TAC CAA TAG TAC CAA AGA TGA CCA-3'
3'-RACE nest primer (reverse)	5'-CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG-3'
P1 (forward)	5'-ATG AGT GAT GGA GCA GTT C-3'
VPR (reverse)	5'-TTC TAG GTG CTA GTT GAG-3'
NS1 (forward)	5'-ACC TCT CTT ACT CTG ACT AAC CA-3'
NS2 (reverse)	5'-TAA TCC AAG TCG TCT CGA AAA TCT-3'
