

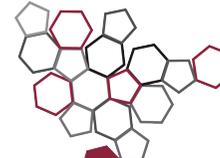


ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente



Circulation of Coronaviruses in wild animals in Northern Italy

Gabriele Vaccari

Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità

Pubblica Veterinaria

Reparto di Zoonosi Emergenti

I laboratori di sanità pubblica veterinaria e la ricerca nella genomica di SARS Cov2:

Esperienze a confronto

26 Novembre, 2020

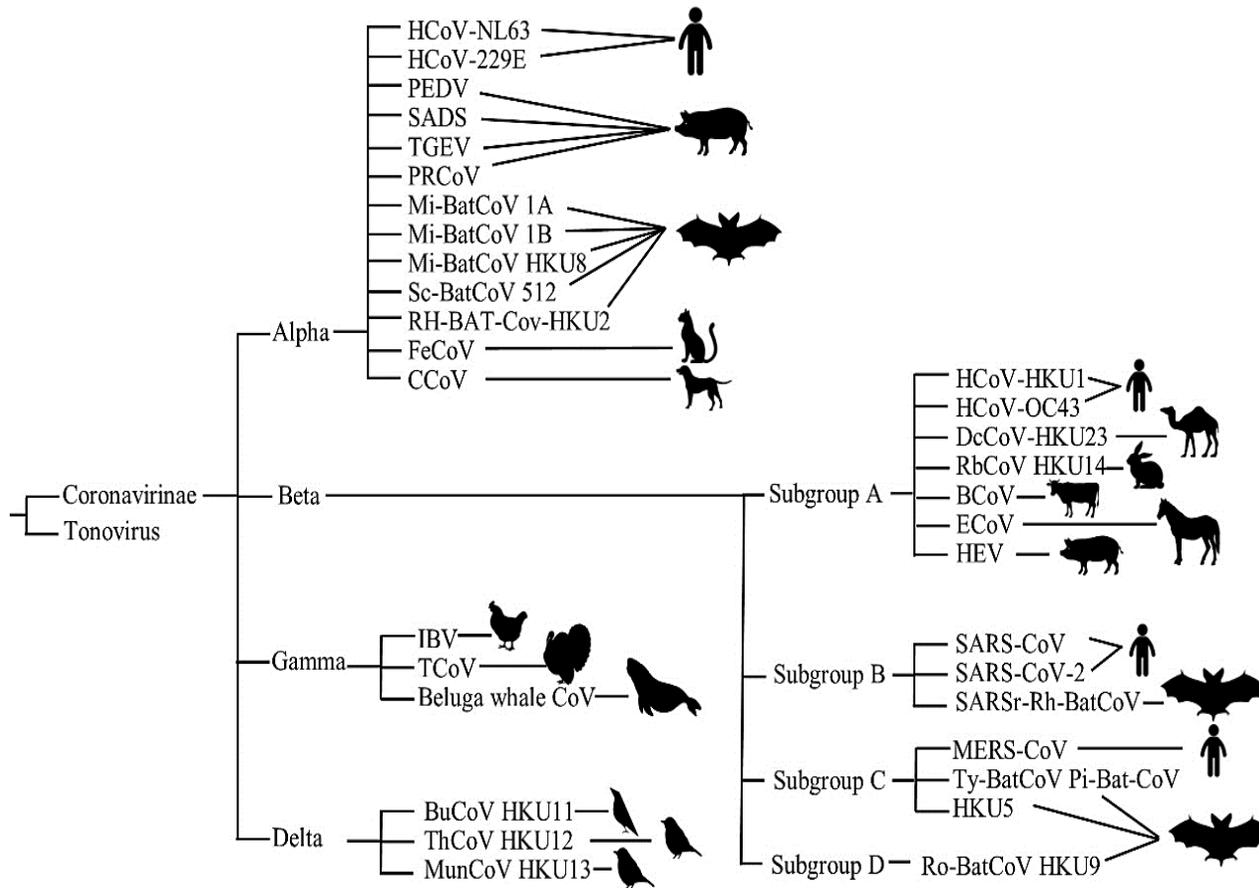
Online Event



Società Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria
Comitato tecnico per la genomica in sanità pubblica Veterinaria



Coronavirus



I Coronavirus (CoV) sono stati classificati filogeneticamente in 4 gruppi: alfa, beta, gamma e delta.

All'interno dei beta CoV nel XXI secolo sono emerse tre zoonosi

2002

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV-1) clade 2b

2012

Middle East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) clade 2c

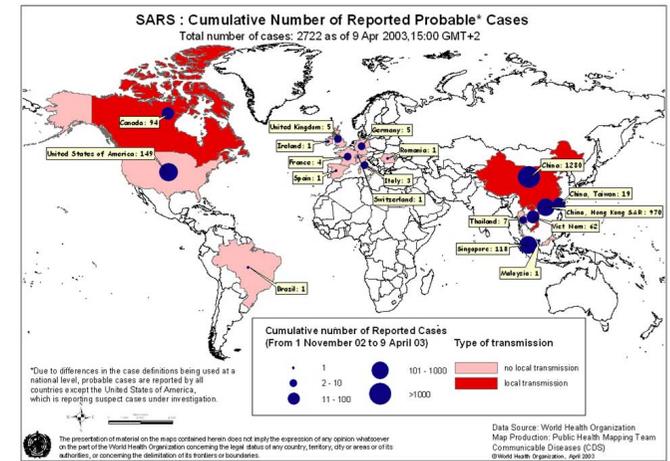
2019

CoronaVirus Disease 19 (SARS-CoV-2)

Virus strettamente correlati filogeneticamente sono stati osservati nei pipistrelli

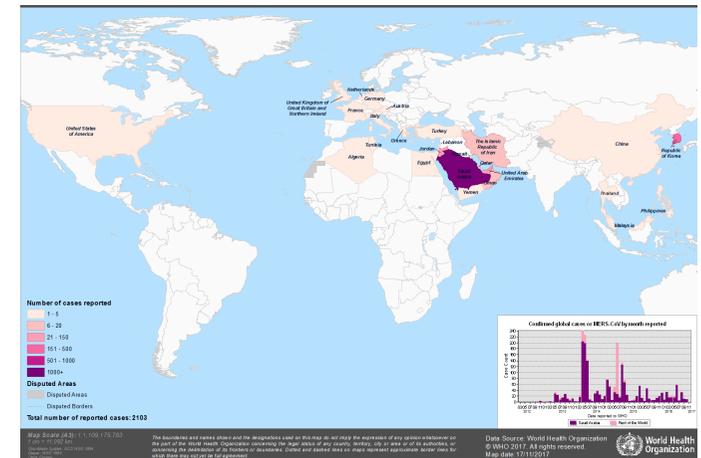
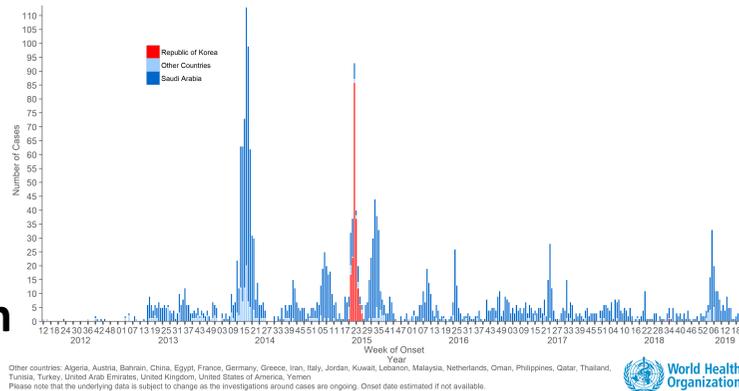
SARS-CoV

Da Novembre 2002 al 2003, sono stati notificati 8 096 casi in una trentina di Paesi, causando 774 decessi, prevalentemente in Cina, Hong Kong, Taiwan ed il Sud-est asiatico.



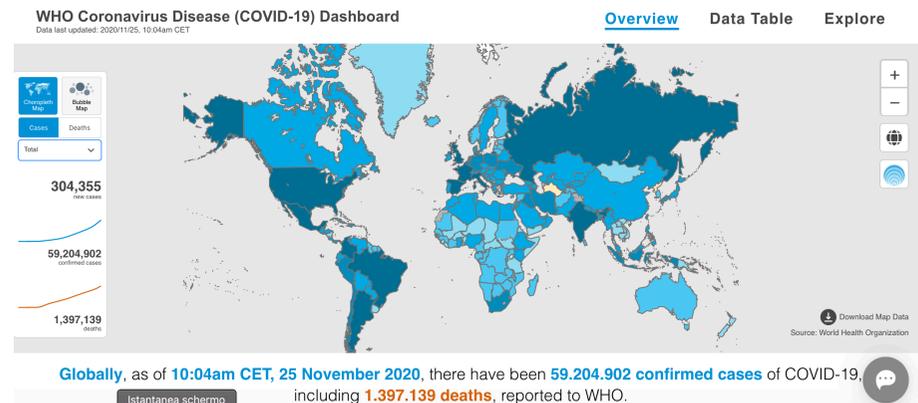
MERS-CoV

Dal 2012 a novembre 2019 sono stati notificati al WHO 2494 casi confermati e 854 decessi. L'epidemia è ancora in corso.

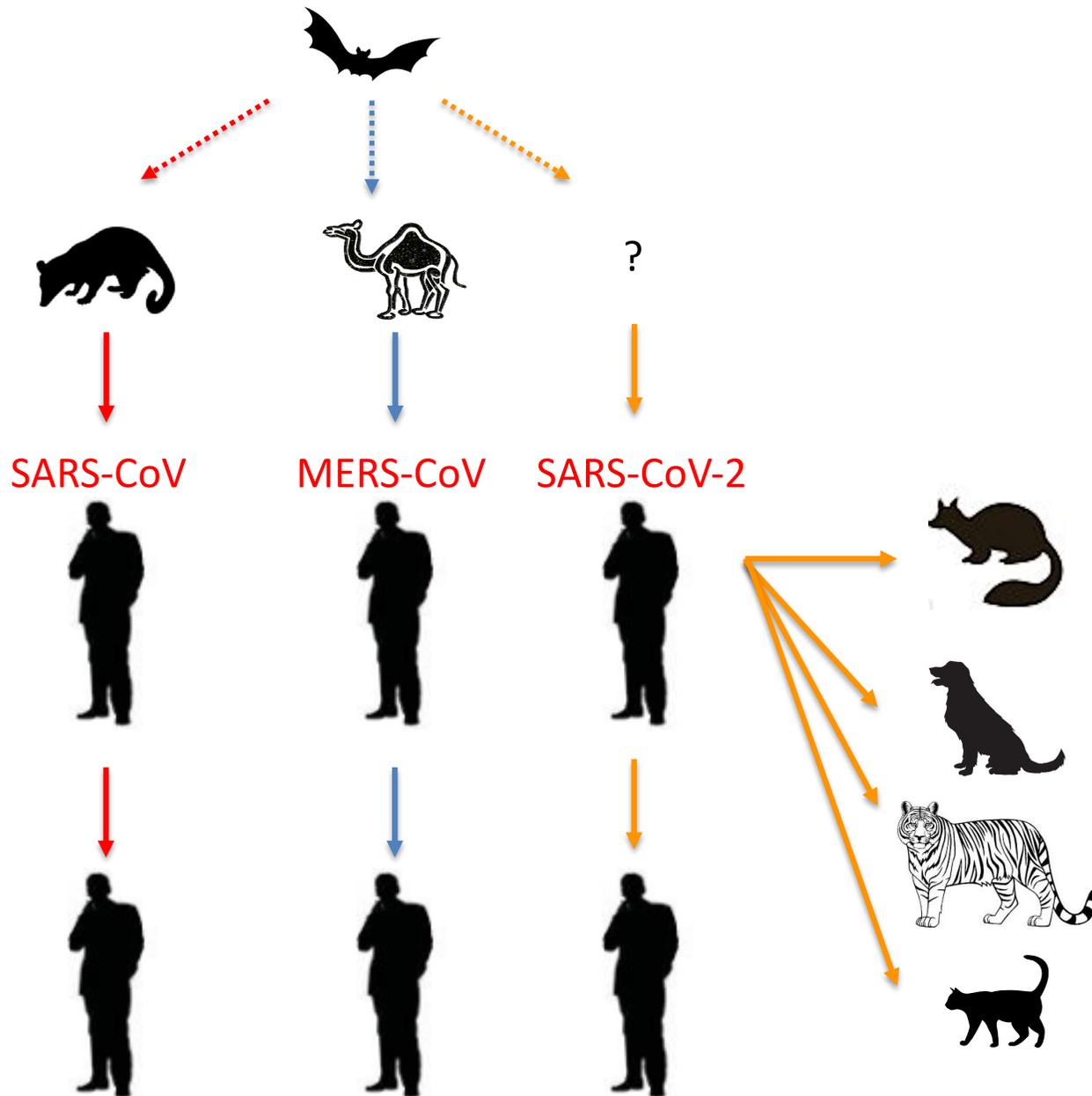


SARS-CoV-2

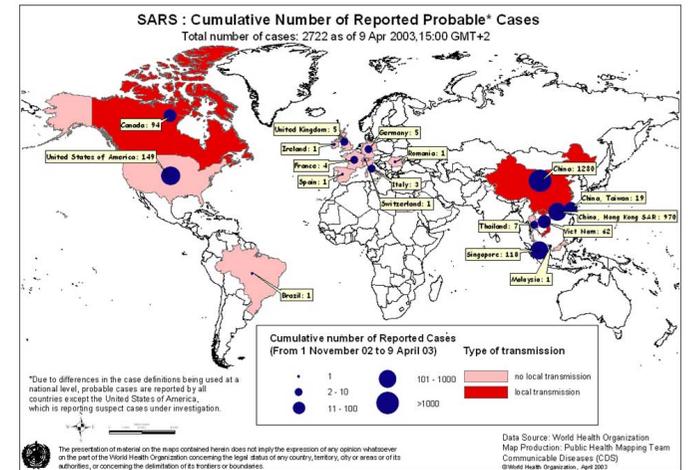
Dal 2019 al 25 Novembre 2020 ci sono stati 59.204.902 di casi notificati di COVID-19 al WHO comprendendo 1.397.139 decessi. L'epidemia è ancora in corso.



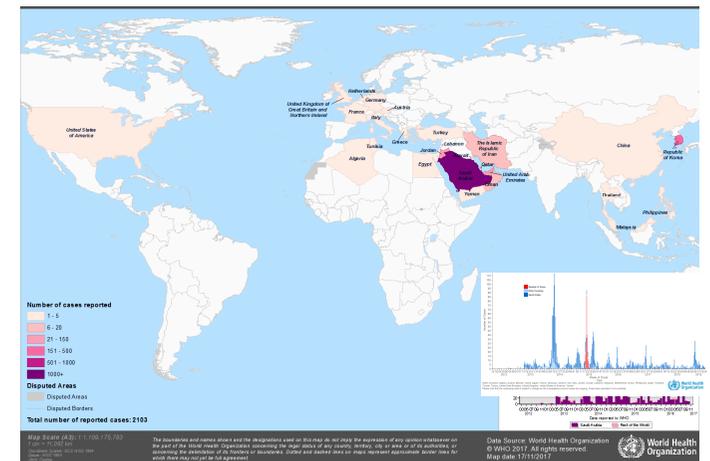
Le 3 zoonosi da CoV del XXI secolo



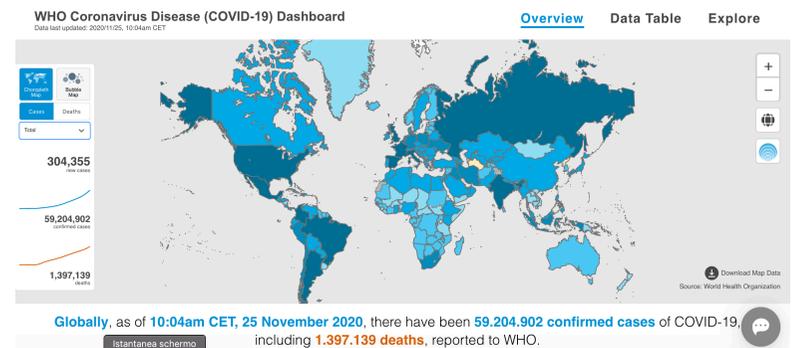
SARS-CoV



MERS-CoV



SARS-CoV-2



Brief Report

Detection of Coronaviruses in Bats of Various Species in Italy

Daive Lelli ^{1,†,*}, Alice Papetti ^{1,†}, Cristiano Sabelli ², Enrica Rosti ³, Ana Moreno ¹ and Maria B. Boniotti ¹

7 su 69 campioni fecali e 9 su 126 campioni da carcasse sono risultati positivi utilizzando RT-PCR per il pan-coronavirus.

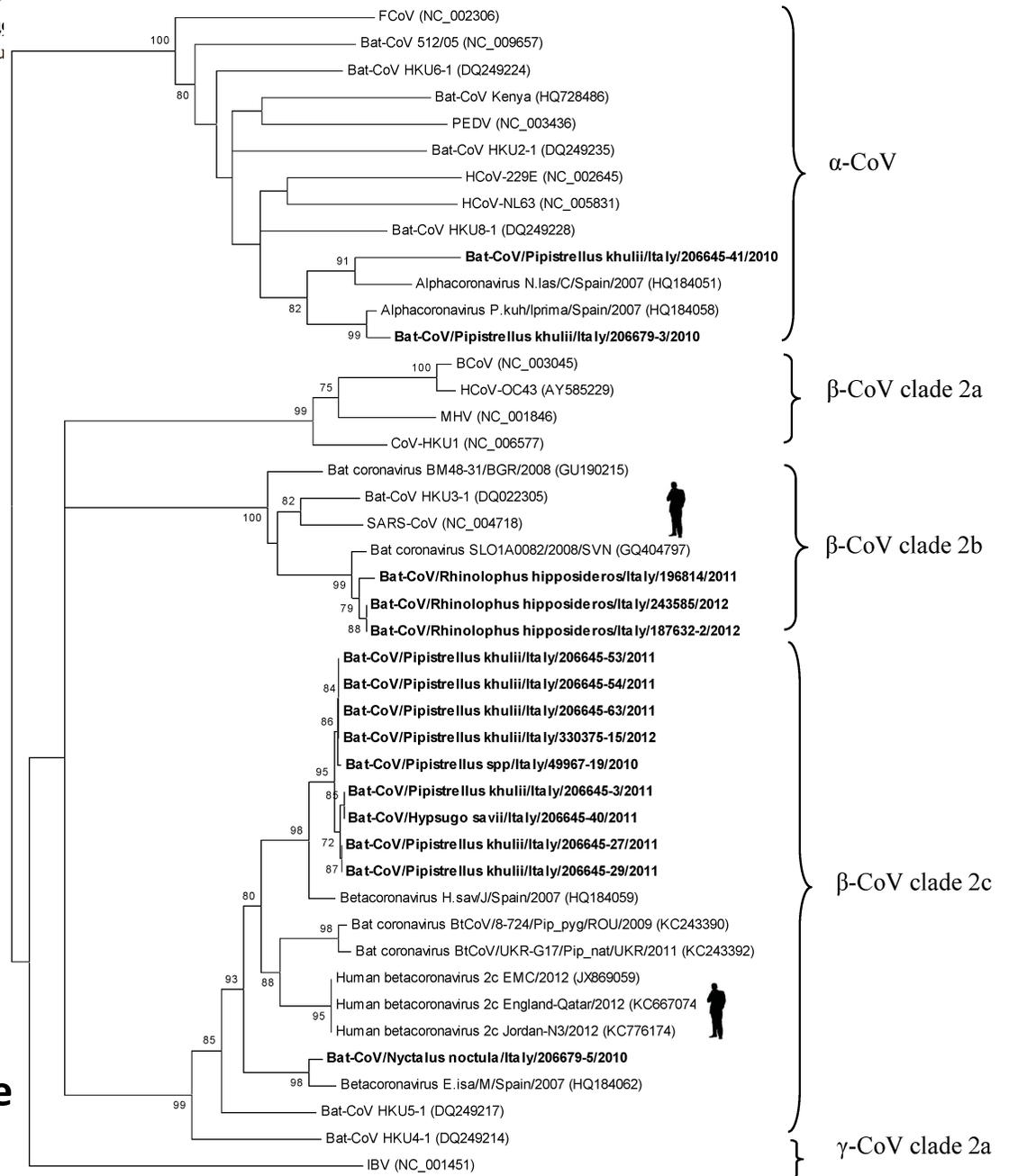
L'analisi filogenetica della RNA polimerasi RNA-dipendenti ha aiutato a identificare

2 alfaCoV nel Pipistrello albolimbato, (*Pipistrellus kuhlii*)

3 betaCoV di clade 2b nei pipistrelli a ferro di cavallo minori (*Rhinolophus hipposideros*)

10 betaCoV 2c nel pipistrello Albolimbato, nella nottola comune (*Nyctalus noctula*) e nel pipistrello di Savi (*Hypsugo savii*).

CoV nei pipistrelli in Italia



RESEARCH

Open Access



Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy

Ana Moreno^{1*}, Davide Lelli¹, Luca de Sabato^{2,3}, Guendalina Zaccaria², Arianna Boni², Enrica Sozzi¹, Alice Prosperi¹, Antonio Lavazza¹, Eleonora Cella⁴, Maria Rita Castrucci², Massimo Cicozzi⁴ and Gabriele Vaccari²

Hypsugo savii

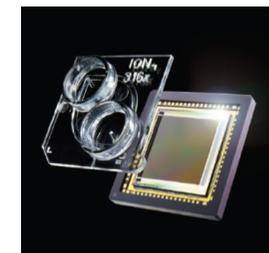
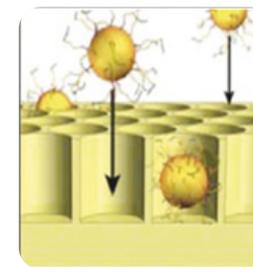
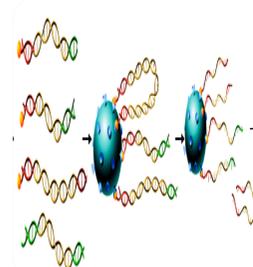
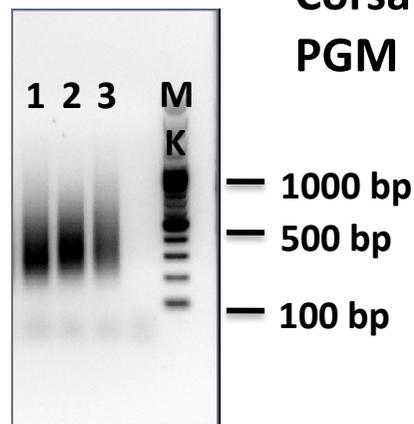
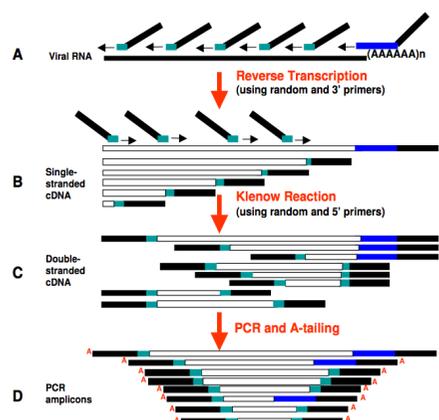
Pipistrellus khulii



Estrazione di RNA dal contenuto intestinale di pipistrelli della famiglia dei Vespertilionidi trovati positivi per beta-CoV con PCR

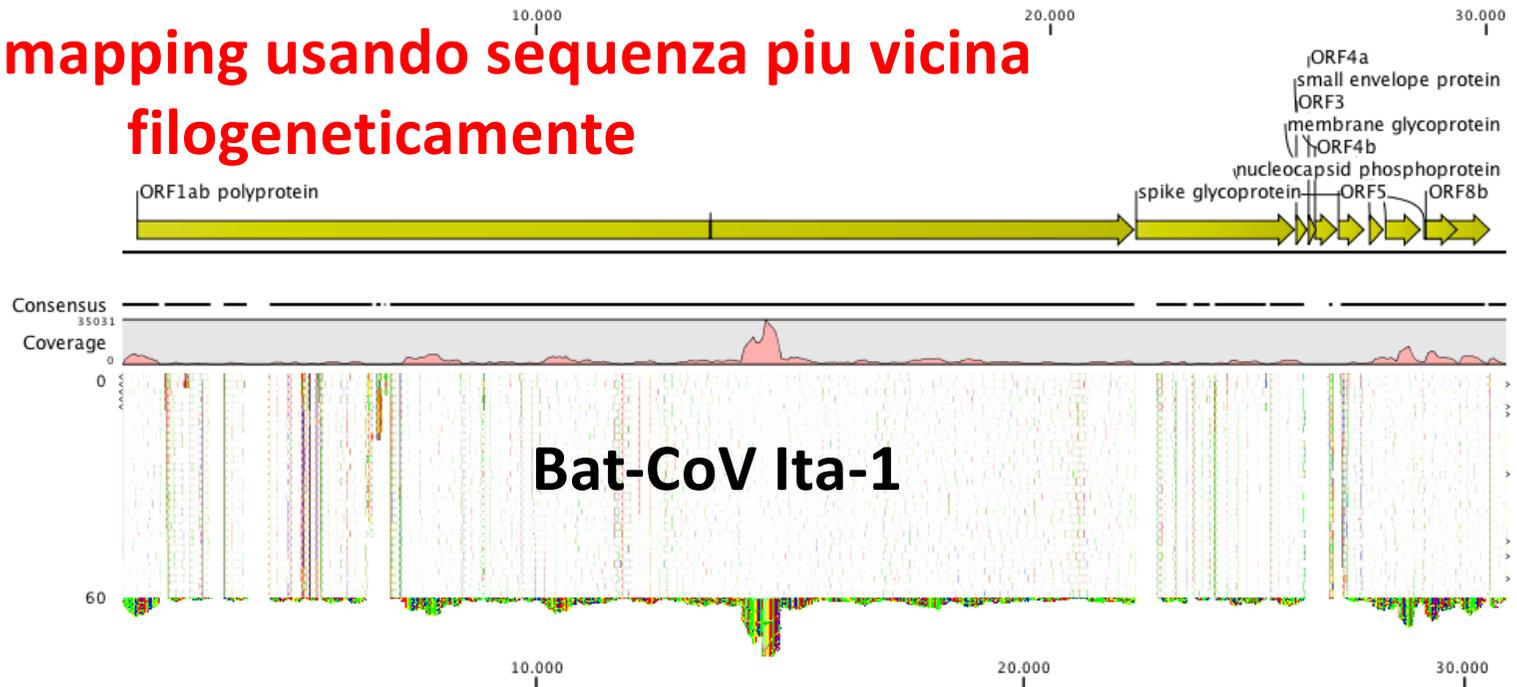
Retrotrascrizione e amplificazione tramite Sequence Independent Single Primer Amplification – SISPA

Corsa di next generation sequencing Ion Torrent PGM

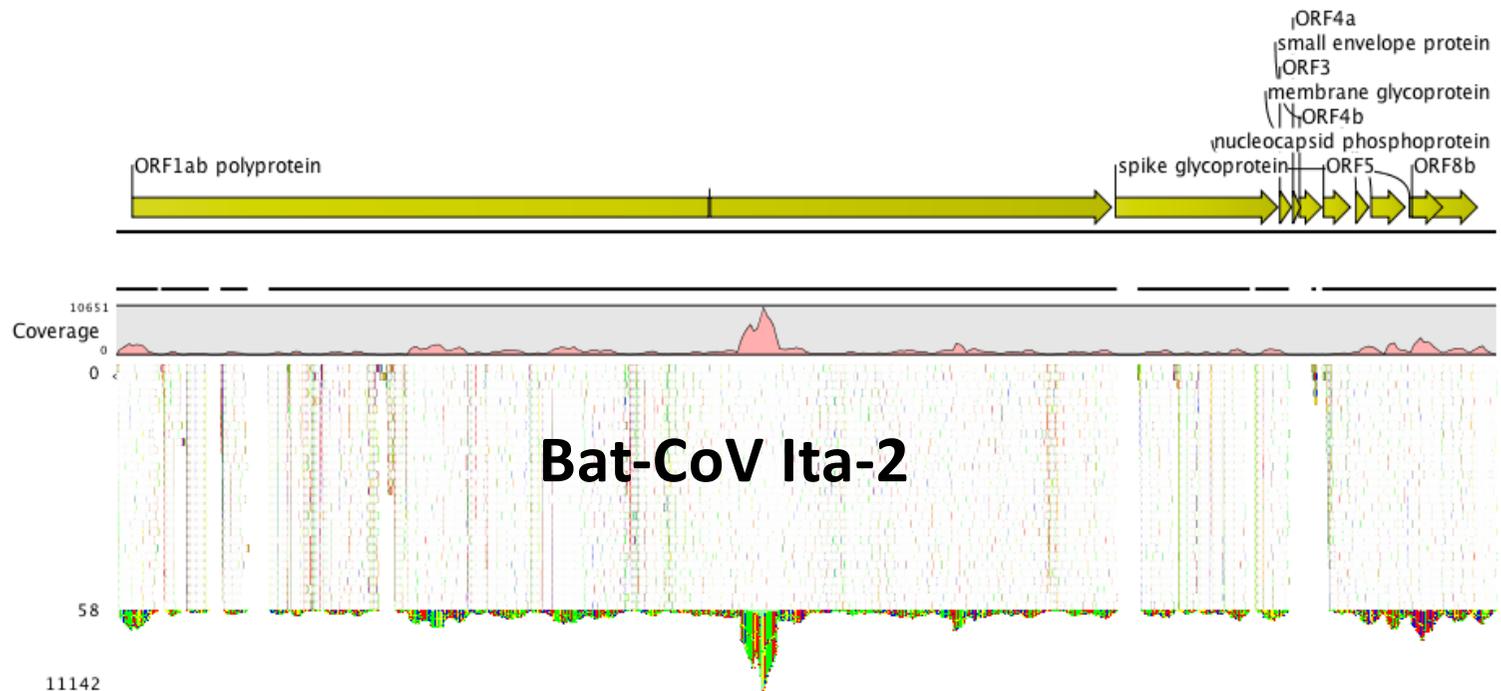


Analisi di mapping usando sequenza piu vicina filogeneticamente

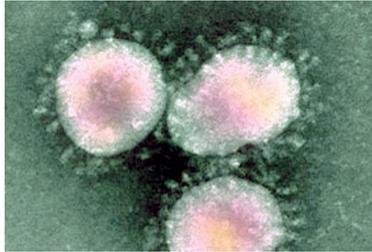
351.804 reads su
2.762.984
Coverage medio
2000x
Reads 187 bp



156.137 reads su
1.159.616
Coverage medio
947 x
Reads 184 bp



E gli altri contigs virali?



CORONAVIRUS
MERS
Bat coronavirus
Betacoronavirus Erinaceus
Bovine coronavirus
Human enteric coronavirus
Avian infectious bronchitis virus
Murine hepatitis virus

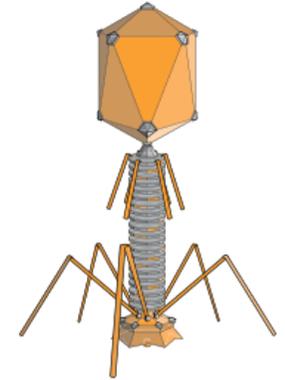


VIRUS degli INSETTI
Choristoneura occidentalis granulovirus
Shamonda virus
Cripavirus
Choristoneura occidentalis granulovirus

Blattella germanica densovirus

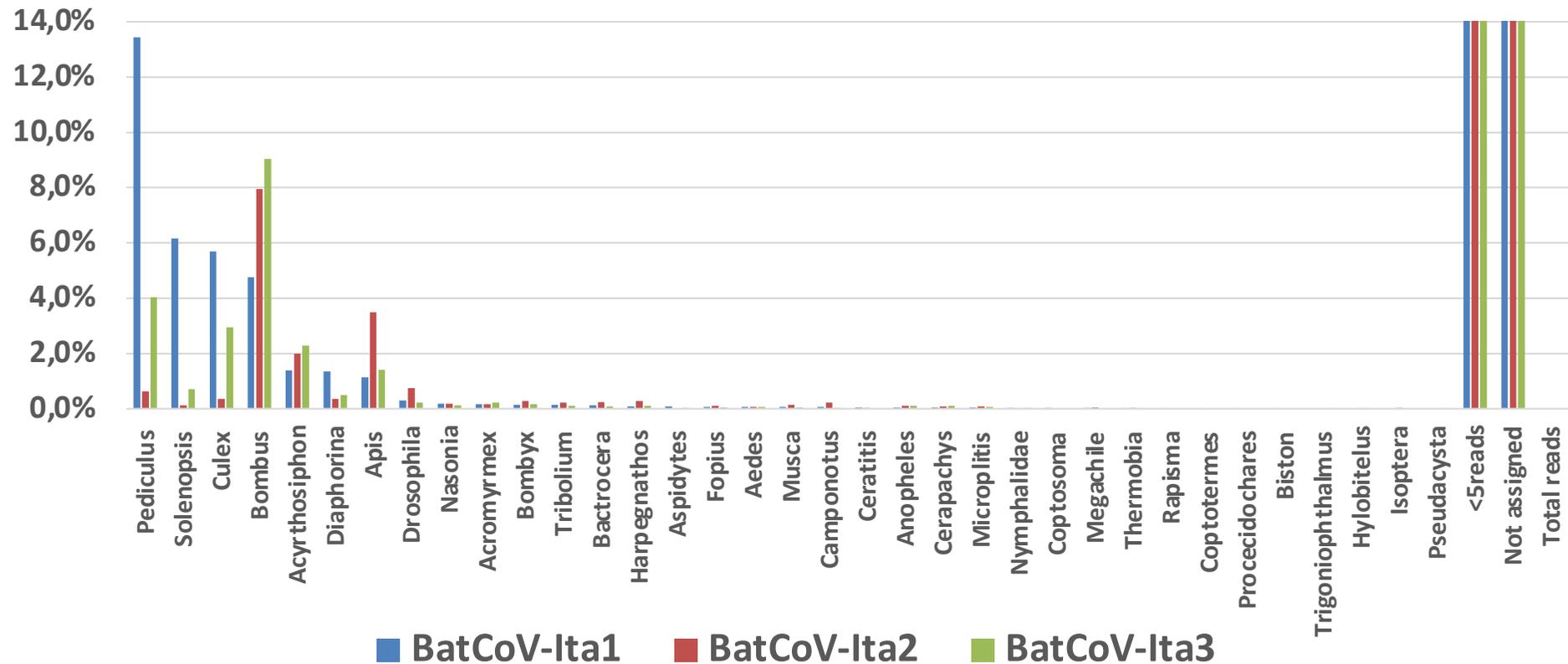
ADENOVIRUS
Human adenovirus
Simian adenovirus
Titi monkey adenovirus

FAGI
Propionibacterium phage
Staphylococcus phage
Pseudomonas phage
Propionibacterium phage
Lactococcus prophage
Staphylococcus prophage
Salmonella enterica bacteriophage
Enterobacteria phage
Shigella phage



Per lo piu virus di
Lepidoptera, Diptera e
Hymenoptera

Diamond contro database insetti



Dalle analisi metagenomiche si possono avere indicazioni sull'alimentazione dei pipistrelli.

La maggior parte dei BetaCoVs classe 2C finora descritti sono stati identificati in animali specie insettivore.

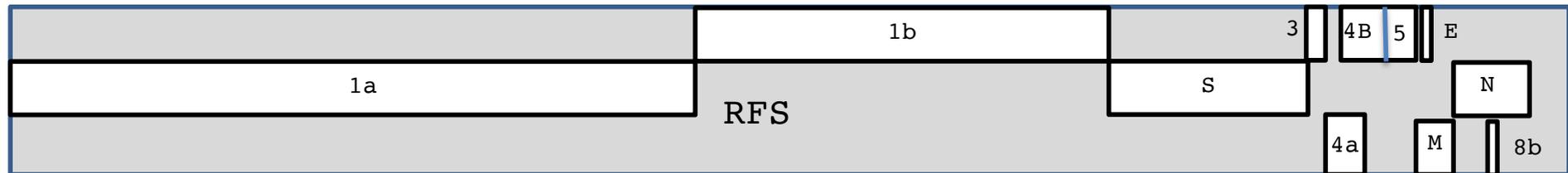
Organizzazione genomica

10 ORF

ORF	nt position (start-end)	No. of amino acids
ORF1ab (TRS-L)	217-21446	7076
Spike	21388-25425	1345
ORF3	25438-25749	103
ORF4a	25758-26045	95
ORF4b	25963-26724	253
ORF5	26731-27414	227
E	27493-27741	82
M	27756-28412	218
N	28460-29749	429
ORF8b	28506-29084	192

Organizzazione genomica (ordine e numero di ORF) tipica dei BetaCov- clade 2C

slippery sequence
 "UUUAAAC" responsabile del ribosomal frameshift
 site RFS tipico dei *nidoviridae*



Organizzazione genomica

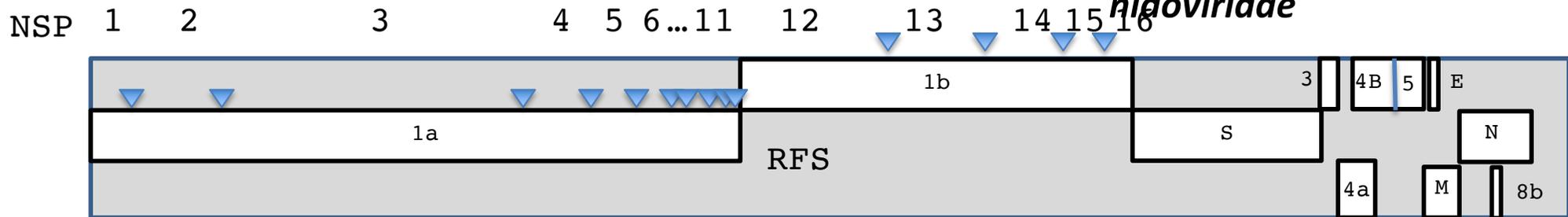
10 ORF

ORF	nt position (start-end)	No. of amino acids
ORF1ab (TRS-L)	217-21446	7076
Spike	21388-25425	1345
ORF3	25438-25749	103
ORF4a	25758-26045	95
ORF4b	25963-26724	253
ORF5	26731-27414	227
E	27493-27741	82
M	27756-28412	218
N	28460-29749	429
ORF8b	28506-29084	192

Organizzazione genomica (ordine e numero di ORF) tipica dei BetaCov- clade 2C

slippery sequence "UUUAAAC" responsabile del ribosomal frameshift site RFS tipico dei

nidoviridae



16 NSP

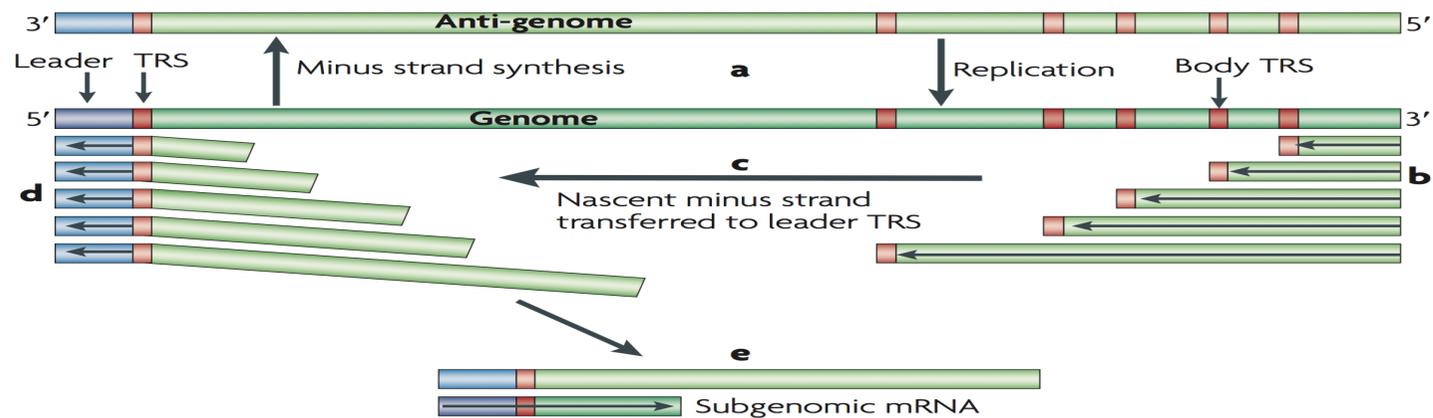
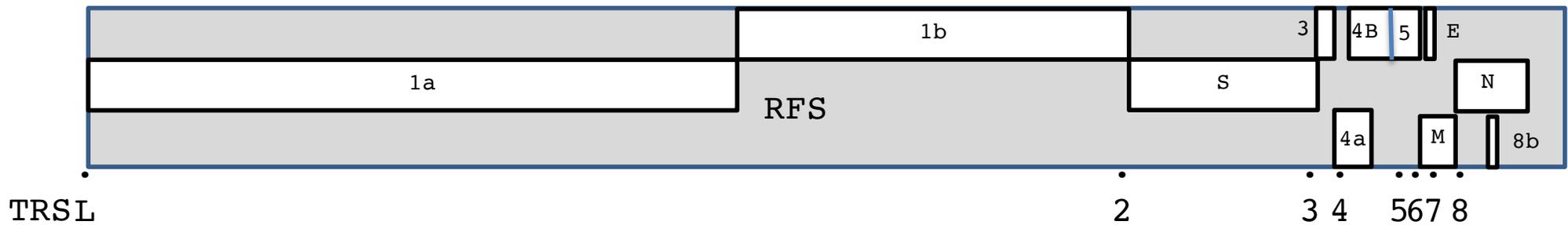
15 Siti di clivaggio

NSP	Position of the putative cleavage sites ^a	Protein size (no. of amino acids)	Putative functional domain(s) ^b
NSP1	Met ¹ -Gly ¹⁹⁵	195	
NSP2	Asn ¹⁹⁶ -Gly ⁸⁵⁵	660	
NSP3	Ala ⁸⁵⁶ -Gly ²⁷³⁸	1883	ADRP, PL2pro
NSP4	Ala ²⁷³⁹ -Gln ³²⁴⁵	507	
NSP5	Ser ³²⁴⁶ -Gln ³⁵⁵¹	306	3CLpro
NSP6	Ser ³⁵⁵² -Gln ³⁸⁴³	292	
NSP7	Ser ³⁸⁴⁴ -Gln ³⁹²⁶	83	
NSP8	Ala ³⁹²⁷ -Gln ⁴¹²⁵	199	Primase
NSP9	Asn ⁴¹²⁶ -Gln ⁴²³⁵	110	
NSP10	Ala ⁴²³⁶ -Gln ⁴³⁷⁵	140	
NSP11	Ser ⁴³⁷⁶ -Ile ⁴³⁸⁹	14	Short peptide at the end of ORF1a
NSP12	Ser ⁴³⁷⁶ -Gln ⁵³⁰⁹	934	RdRp
NSP13	Ala ⁵³¹⁰ -Gln ⁵⁹⁰⁷	598	HEL, NTPase
NSP14	Ser ⁵⁹⁰⁸ -Gln ⁶⁴³¹	524	ExoN, NMT
NSP15	Gly ⁶⁴³² -Gln ⁶⁷⁷³	342	NendoU
NSP16	Ala ⁶⁷⁷⁴ -His ⁷⁰⁷⁶	303	OMT

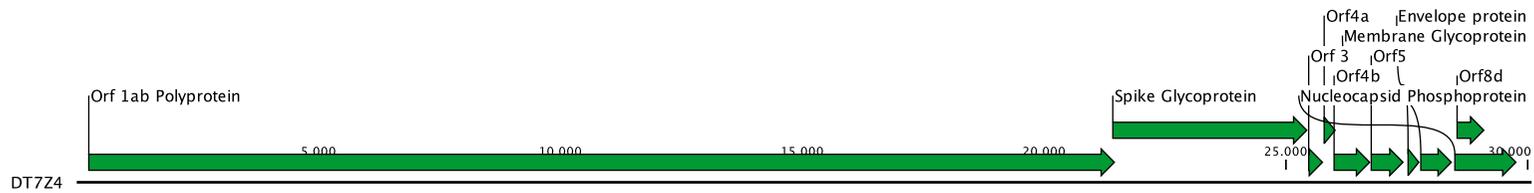
Organizzazione genomica

ORF	TRS
ORF1ab (TRS-L)	00036 GATTTTAACGAACTTAAA ₀₀₀₅₃
Spike	21330 C.AG.....CGTT ₂₁₃₄₇
ORF3	25419 TCAC.A.....T.....T ₂₅₄₃₆
ORF4a	25742 A.AA.....CT.T ₂₅₇₅₉
ORF4b	
ORF5	26717 .G.GG.....ATGG ₂₆₇₃₄
E	27479 TTGGAA.....ATGT ₂₇₄₉₆
M	27734 .GG.....CTCT ₂₇₇₅₁
N	28430TC.TT. ₂₈₄₄₇
ORF8b	

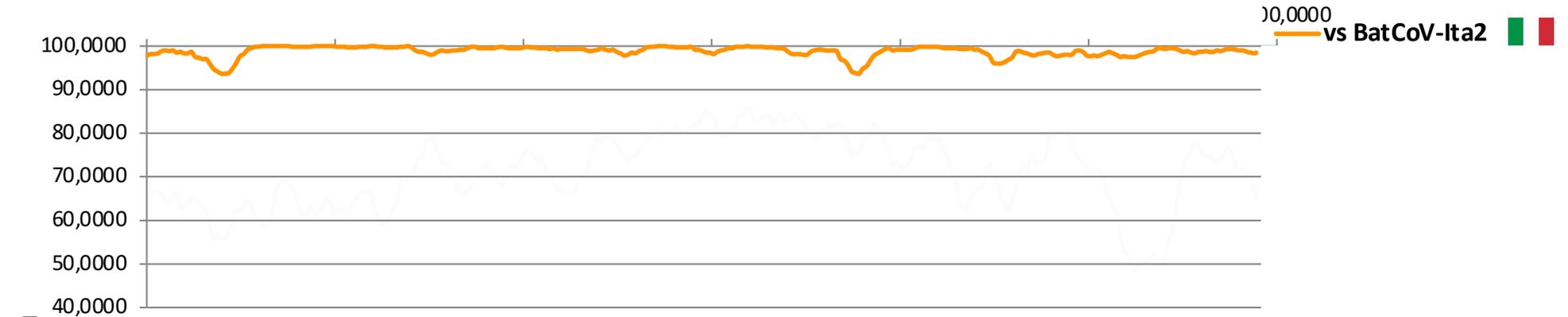
Identificazione di 8
transcription regulatory
sequences (TRS)



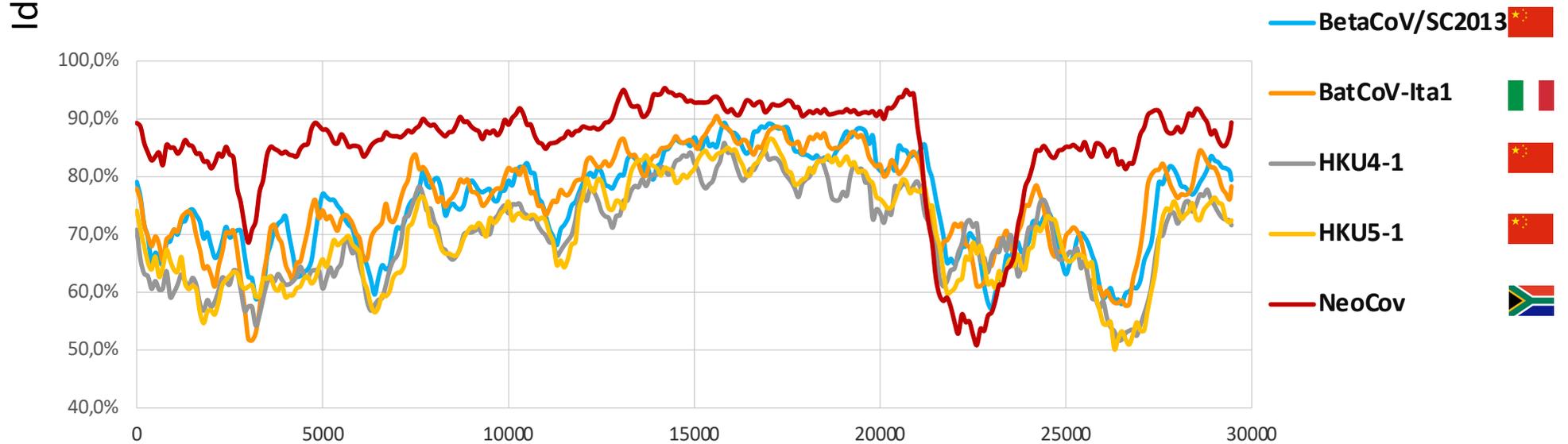
Confronto di identità fra beta-CoV a sequenza completa



Confronto del BatCoV-Ita1 con



Confronto MERS con



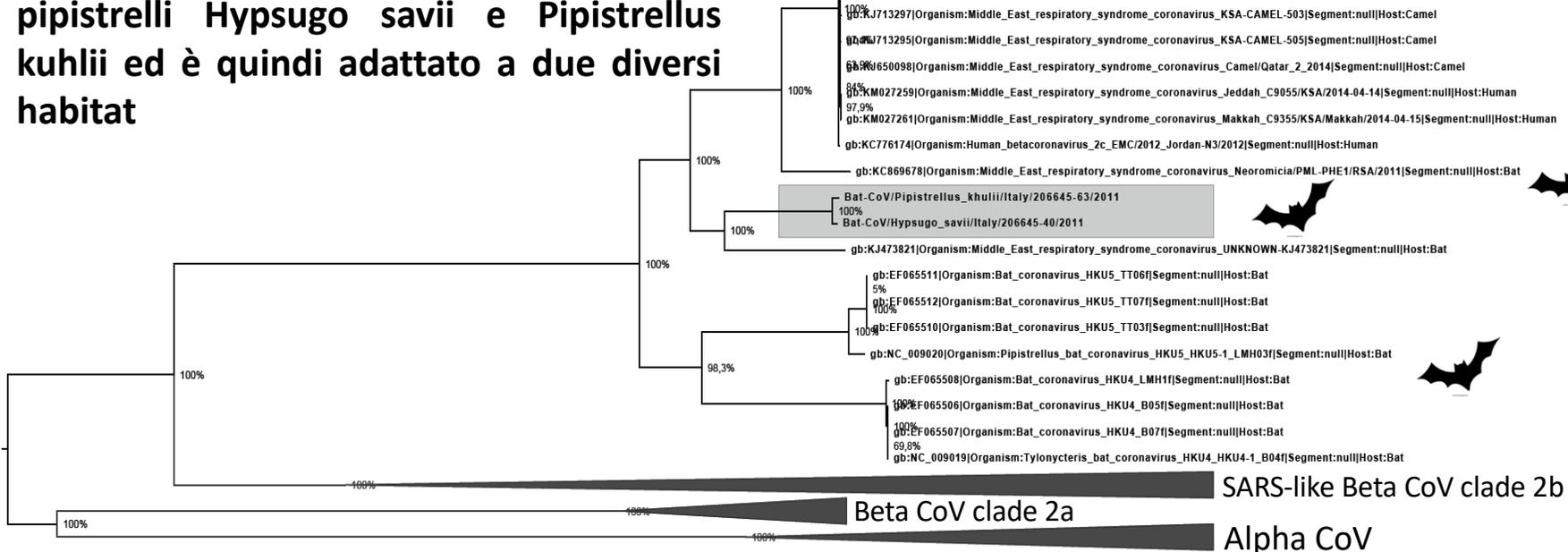
Albero filogenetico

Maximum likelihood

➤ Il metodo NGS ha avuto successo nel sequenziamento completo del genoma

➤ I MERS-CoV like sono stati osservati nei pipistrelli italiani. Ceppi della stessa specie dei MERS-CoV

➤ Lo stesso ceppo di MERS-CoV-like è osservato in due diverse specie di pipistrelli *Hypsugo savii* e *Pipistrellus kuhlii* ed è quindi adattato a due diversi habitat



```

gb:KP719932|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Camel/UAE/D1243.12/2014|Segment:null|Host:Camel
99,9%
gb:KP719931|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Camel/UAE/D1339.2/2014|Segment:null|Host:Camel
86,5%
gb:KP719933|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Camel/UAE/D1209/2014|Segment:null|Host:Camel
97,3%
gb:KP209310|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Abu_Dhabi/Gayathi_UAE_2_2014|Segment:null|Host:Human
42,3%
gb:KJ650297|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KFU-HKU_1|Segment:null|Host:Camel
100%
gb:KJ650295|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KFU-HKU_13|Segment:null|Host:Camel
97,3%
gb:KJ650296|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KFU-HKU_19Dam|Segment:null|Host:Camel
54,5%
gb:KJ361503|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Hu-France_-_FRA2_130569-2013_Isolate_Sanger|Segment:null|Host:Human
40,9%
gb:KT751244|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_D2731.3/14|Segment:null|Host:Camel
70,1%
gb:KF600630|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Buraidah_1_2013|Segment:null|Host:Human
70,1%
gb:KF600652|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Riyadh_2_2012|Segment:null|Host:Human
40,9%
gb:KM027262|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Riyadh_2014KSA_683/KSA/2014|Segment:null|Host:Human
40,9%
gb:KJ156934|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Riyadh_14_2013|Segment:null|Host:Human
40,9%
gb:KT225476|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_MERS-CoV/THA/CU/17_06_2015|Segment:null|Host:Human
100%
gb:KT029139|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_MERS-CoV/KOR/KNH/002_05_2015|Segment:null|Host:Human
98,4%
gb:KT006149|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_ChinaGD01|Segment:null|Host:Human
66,1%
gb:KT374057|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KOREA/Seoul/168-2-2015|Segment:null|Host:Human
98,3%
gb:KF600620|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Bisha_1_2012|Segment:null|Host:Human
98,3%
gb:KF600612|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Riyadh_1_2012|Segment:null|Host:Human
99,5%
gb:KF958702|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_MERS-CoV/Jeddah-human-1|Segment:null|Host:Human
68%
gb:KJ156949|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Taif_1_2013|Segment:null|Host:Human
92,7%
gb:KJ156881|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Wadi-Ad-Dawasir_1_2013|Segment:null|Host:Human
88%
gb:KC164505|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_England_1|Segment:null|Host:Human
94,2%
gb:KC667074|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_England/Qatar/2012|Segment:null|Host:Human
97,9%
gb:KJ713297|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KSA-CAMEL-503|Segment:null|Host:Camel
100%
gb:KJ713295|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_KSA-CAMEL-505|Segment:null|Host:Camel
99,9%
gb:KJ650098|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Camel/Qatar_2_2014|Segment:null|Host:Camel
84%
gb:KM027259|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Jeddah_C9055/KSA/2014-04-14|Segment:null|Host:Human
97,9%
gb:KM027261|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Makkah_C9355/KSA/Makkah/2014-04-15|Segment:null|Host:Human
97,9%
gb:KC776174|Organism:Human_betacoronavirus_2c_EMC/2012_Jordan-N3/2012|Segment:null|Host:Human
100%
gb:KC869678|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_Neoromicia/PML-PHE1/RSA/2011|Segment:null|Host:Bat
100%
Bat-CoV/Pipistrellus_kuhlii/Italy/206645-63/2011
100%
Bat-CoV/Hypsugo_savii/Italy/206645-40/2011
gb:KJ473821|Organism:Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus_UNKNOWN-KJ473821|Segment:null|Host:Bat
5%
gb:EF065511|Organism:Bat_coronavirus_HKU5_TT06f|Segment:null|Host:Bat
100%
gb:EF065512|Organism:Bat_coronavirus_HKU5_TT07f|Segment:null|Host:Bat
100%
gb:EF065510|Organism:Bat_coronavirus_HKU5_TT03f|Segment:null|Host:Bat
98,3%
gb:NC_009020|Organism:Pipistrellus_bat_coronavirus_HKU5_HKU5-1_LMH03f|Segment:null|Host:Bat
100%
gb:EF065508|Organism:Bat_coronavirus_HKU4_LMH1f|Segment:null|Host:Bat
100%
gb:EF065506|Organism:Bat_coronavirus_HKU4_B05f|Segment:null|Host:Bat
100%
gb:EF065507|Organism:Bat_coronavirus_HKU4_B07f|Segment:null|Host:Bat
69,8%
gb:NC_009019|Organism:Tylonycteris_bat_coronavirus_HKU4_HKU4-1_B04f|Segment:null|Host:Bat

```



MERS-like
Beta CoV clade 2c

SARS-like Beta CoV clade 2b

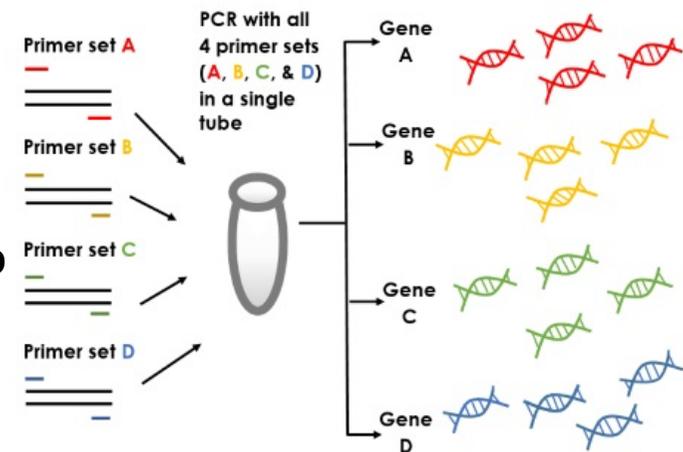
Beta CoV clade 2a

Alpha CoV

AmpliSeq per MERS-CoV

Approccio diagnostico con arricchimento per il sequenziamento del intero genoma di entrambi i MERS-CoV e MERS-CoV-like

La tecnologia AmpliSeq è un metodo di arricchimento basato su amplificazioni multiplex per la generazione di una libreria di ampliconi sovrapposti di 100-400 bp da utilizzare nel NGS



Un ceppo umano di MERS-CoV come ed i CoV-like BatCoV-Ita1 e BatCoV-Ita2

Pannello MERS-CoV:

Le coppie di primer sono state progettate dallo Ion AmpliSeq Designer utilizzando una sequenza di consenso ottenuta dal confronto di 70 genomi completi MERS-CoV umani e cammello generati selezionando per ciascuna posizione il nucleotide più frequente, presente almeno in > 50% della sequenza

AmpliSeq per MERS-CoV

Sono state ottenute le sequenze genomiche complete del ceppo MERS-CoV umano:

749.500 (99,9%) sono stati classificati come Coronavirus e utilizzati per costruire il genoma completo con un tasso di copertura medio di 6.150x.

Lo stesso approccio è stato utilizzato per sequenziare I ceppi di MERS-CoV –like identificati nei pipistrelle italiani

CoV samples	CoV Reads		
	Random Approach	AmpliSeq	design
BatCoV-Ita1	359,827 (18%)	155,463	(78%)
BatCoV-Ita2	150,840 (13.9%)	229,950	(81%)

Il genoma completo ottenuto aveva un'identità nucleotidica al 100% con quello ottenuto mediante approccio SISPA

Il pannello MERS-CoV è utilizzabile per il sequenziamento di virus divergenti (MERS-CoV come 75% nt. Id.)

L'elevata copertura ottenuta ha garantito un'elevata accuratezza delle sequenze di consenso risultanti

Questo approccio migliora il rendimento del metodo di sequenziamento



Full genome characterization of two novel Alpha-coronavirus species from Italian bats

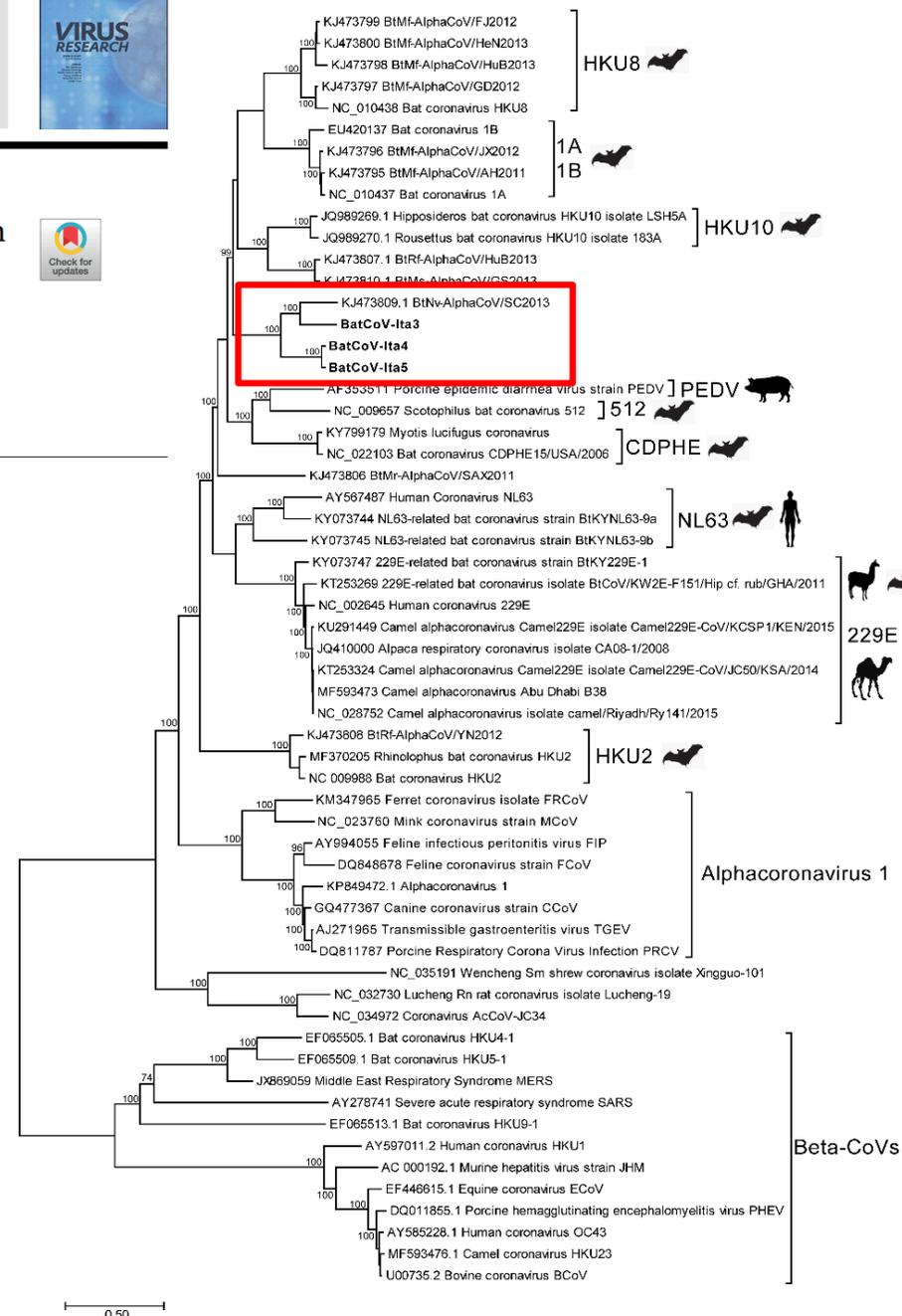
Luca De Sabato^{a,b}, Davide Lelli^c, Francesca Faccin^c, Sabrina Canziani^c, Ilaria Di Bartolo^b, Gabriele Vaccari^{b,*}, Ana Moreno^c

^a Department of Sciences, University Roma Tre, Viale Guglielmo Marconi 446, 00146, Rome, Italy

^b Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161, Rome, Italy

^c Department of Virology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna, Via Antonio Bianchi 9, 25124, Brescia, Italy

- Sequenziamento NGS: 28 kb, ORF1ab, S, ORF3, E, M, N e proteine accessorie
- BatCoV-ITA3, BatCoV-ITA4, BatCoV-ITA5, identificati in *Pipistrellus kuhlii*, hanno mostrato una bassa correlazione evolutiva con i ceppi umani Alpha-CoV (60%)
- Criteri di classificazione: 2 nuove specie Alpha-CoV stabilite: BatCoV-ITA3, BatCoV-ITA4 e BatCoV-ITA5
- Elevata correlazione evolutiva con i ceppi di CoVs pipistrelli europei rilevati nelle specie di pipistrelli *Pipistrellus kuhlii* e *Pipistrellus pipistrellus* (> 95% nt.id.)



Communication

Eco-Virological Preliminary Study of Potentially Emerging Pathogens in Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) Recovered at a Wildlife Treatment and Rehabilitation Center in Northern Italy

Mauro Delogu ¹, Claudia Cotti ¹, Davide Lelli ² , Enrica Sozzi ², Tiziana Trogu ², Antonio Lavazza ² , Giacomo Garuti ¹, Maria Rita Castrucci ³, Gabriele Vaccari ⁴ , Maria Alessandra De Marco ^{5,*}  and Ana Moreno ² 

Analizzando 24 campioni fecali di ricci ricoverati presso centri di recupero abbiamo osservato che il 58,3% era positivo alla PCR per gli Erinaceuscoronavirus (EriCoV)

Non abbiamo evidenziato alcuna malattia clinica correlata all'infezione da EriCoV nei ricci sebbene fossero ricoverati nei centri di recupero

Questi risultati supportano ulteriormente l'ipotesi che i ricci possano essere considerati serbatoi naturali di CoV e possano fungere anche da portatori (shedder) di CoV

Organizzazione genomica dei CoV dei ricci

11 ORF

ORF	nt position (start-end)	No. of amino acids	TRS
ORF1ab	221-21784	7188	41acgaa45
S	21704-25692	1329	21652atgaa21656
ORF3a	25803-26045	81	25698acgaa25702
ORF3b	25827-26240	138	
ORF4a	26004-26246	81	5995acgaa25999
ORF4b	26236-26904	223	
ORF5	26917-27596	226	26907acgaa26911
E	27671-27918	82	27661acgaa27665
M	27934-28589	218	27916acgaa27920
N	28645-29921	425	28622acgaa28626
ORF8b	28691-29251	187	

Organizzazione genomica (ordine e numero di ORF) tipica dei BetaCov- clade 2C

slippery sequence "UUUAAAC" responsabile del ribosomal frameshift site RFS tipico dei *nidoviridae*

Albero filogenetico dei CoV dei ricci

Maximum likelihood

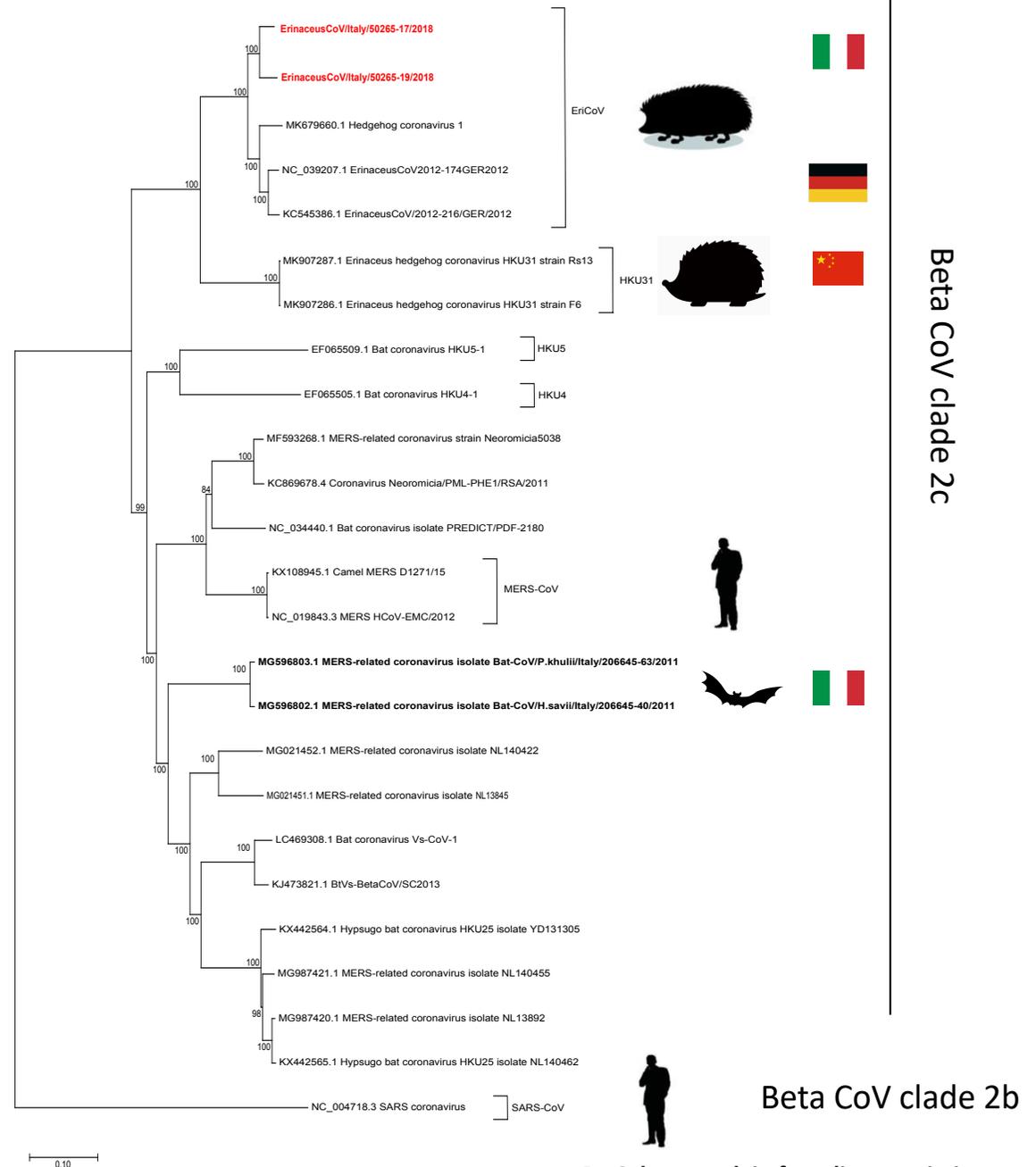
L'analisi filogenetica ha evidenziato una correlazione evolutiva con altri ceppi precedentemente riportati in Germania e in Gran Bretagna nei ricci (*Erinaceus europaeus*).

Questi sono distanti dalla nuova specie CoV HKU31

segnalato solo nei ricci dell'Amur (*Erinaceus amurensis*) in Cina.

Questo risultato suggerisce che, diverse specie di ricci, che occupano aree distanti e non collegate, possono essere serbatoio di diverse specie di CoVs come accade nei pipistrelle

Analisi filodinamiche preliminari identificano la comparsa dei CoV nei ricci a circa 200 anni fa, separandosi dagli altri CoV del clade 2c circa 1400 anni fa





Conclusioni



- I Pipistrelli in Italia si confermano un serbatoio di una grande variabilità di CoV
- Un ceppo MERS-CoV like è stato identificato in due diverse specie di pipistrelli: *Pipistrellus kuhlii* e *Hypsugo savii* quindi si è adattato a due diversi habitat
- Due nuove specie di Alpha-CoV rilevate in *Pipistrellus kuhlii* di cui una era già stata rilevata in *Pipistrellus pipistrellus* in Europa. Anche in questo caso la stessa specie Alpha-CoV si è adattata a due specie di pipistrelli del genere *Pipistrellus*
- Dopo la comparsa delle zoonosi correlate a CoV circolanti nei pipistrelli un impulso importante è stato dato alla ricerca di CoV nei pipistrelli che ci aiuterà a capire le origine e la circolazione dei CoV in questo serbatoio
- I ricci si rappresentano anch'essi un serbatoio di CoV, la cui variabilità è tutta da chiarire vista la recente comparsa degli EriCoV

תודה
 Dankie Gracias
 Спасибо
 شكرًا
 Merci Takk
 Köszönjük Terima kasih
 Grazie Dziękujemy Dèkojame
 Dakujeme Vielen Dank Paldies
 Kiitos Täname teid 谢谢
Thank You Tak
 感谢您 Obrigado Teşekkür Ederiz
 감사합니다
 Σας ευχαριστούμε
 ขอบคุณ
 Bedankt Děkujeme vám
 ありがとうございます
 Tack



De Sabato L.
 Di Bartolo I.
 Cella E.
 Zaccaria G.
 Boni A.
 Lo Presti A.
 Ciccozzi M.
 Castrucci M.R.

De Marco M.A.

De Logu M.
 Cotti C.
 Garuti G.

Lelli D.
 Lavazza A.
 Sozzi E.
 Trogu T.
 Canziani S.
 Faccin F.
 Prospero A.
 Moreno A.