

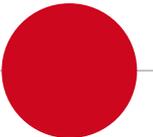
Sviluppo di metodi diagnostici per la ricerca di Mammalian orthoreovirus

Lara Cavicchio

*Laboratorio di virologia diagnostica SCT3, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle
Venezie, Viale dell'Università 10, Legnaro (PD) 35020*

Webinar SIPAS: PRRSV e sequenziamento: criteri, opportunità e corretto impiego

3 Dicembre 2020



Famiglia: Reoviridae – Sottofamiglia: Spinareovirinae – Genere: Orthoreovirus



Baboon orthoreovirus

Reptilian orthoreovirus



Mammalian orthoreovirus



3 serotypes – prototype strains:

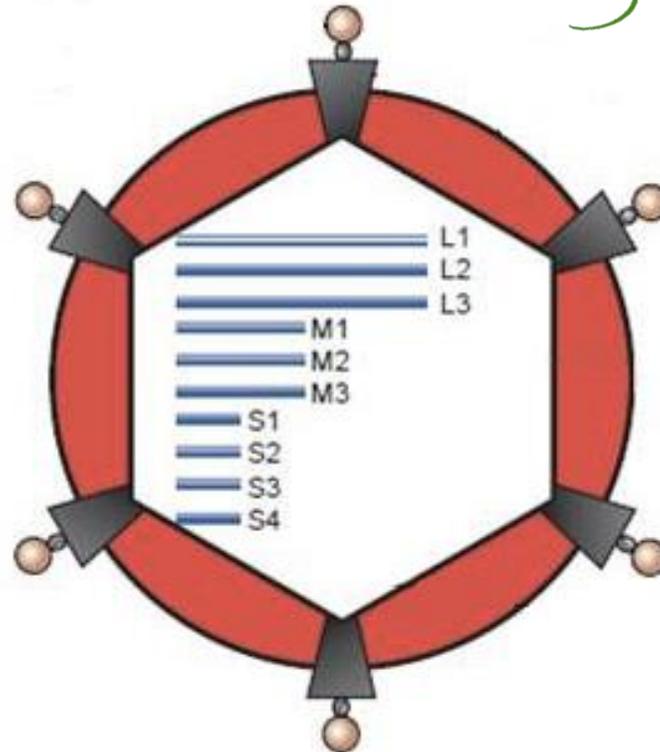
- MRV1: T1L Type 1 (Lang)
- MRV2: T2J (Jones)
- MRV3: TD3 and TA3 (Dearing and Abney)
- MRV4: 4Nd (Ndelle)



Neoavian orthoreovirus



Avian orthoreovirus



Piscine orthoreovirus



Pteorine orthoreovirus

Tortoise orthoreovirus

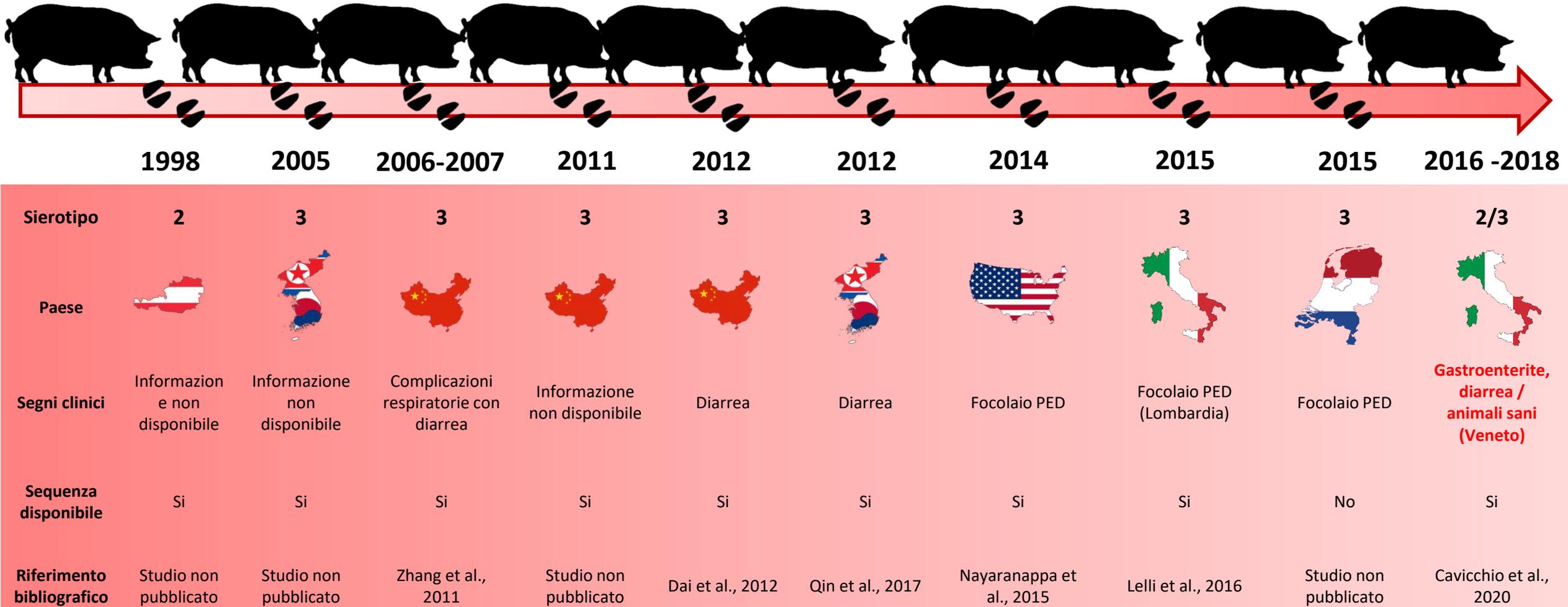


Broome orthoreovirus

Mahlaptisi orthoreovirus



MRV riscontrati in suino



RC IZSVE 17/16 "Mammalian orthoreovirus: circolazione nella popolazione suina e di chirotteri"

Campionamento 2017 - 2019



4 Aziende idonee

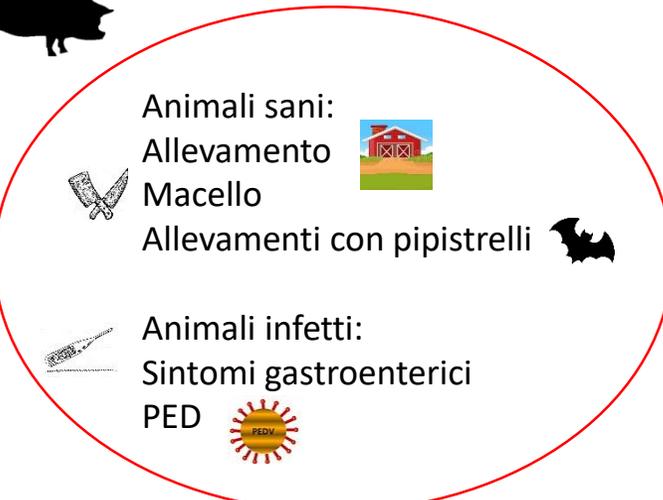


18 campioni
 - Da 4 pipistrelli: 3 feci e 1 tampone rettale
 - 14 ambientali

Presenti 13 specie. Prevalenti:
 Hypsugo savii, Pipistrellus kuhlii e Pipistrellus pipistrellus.



+ 1 campione = MRV2



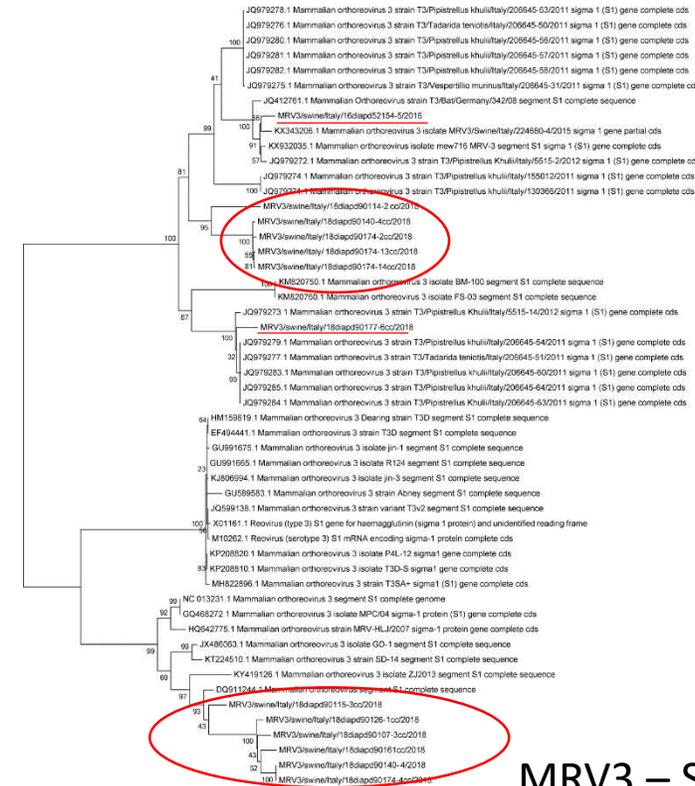
Animali sani:
 Allevamento
 Macello
 Allevamenti con pipistrelli

Animali infetti:
 Sintomi gastroenterici
 PED

516 Feci

+ 208 feci
40.31%

40 + isolamento/79:
 26 MRV2
 9 MRV3
 5 coinfezioni MRV2-MRV3.



MRV3 – Segmento S1

● Borsa di Studio SIPAS – Wageningen University and Research

Attività svolte:

- Analisi in silico delle sequenze
- Valutazione dei metodi presenti in bibliografia
- Test dei metodi risultati migliori dall'analisi in silico → Real time RT PCR → target gene L1
- Sviluppo di metodi 'in house' per i metodi non idonei presenti in letteratura → end point RT PCR → target gene S1 tipo 1 e tipo 2



Risultati ottenuti:

- Test metodica Real time RT PCR → target L1 → non idonea
- Sviluppo in silico e test metodica end point RT PCR → target S1 tipo 1 → idonea
- Sviluppo in silico metodica end point RT PCR → target S1 tipo 2 → idonea

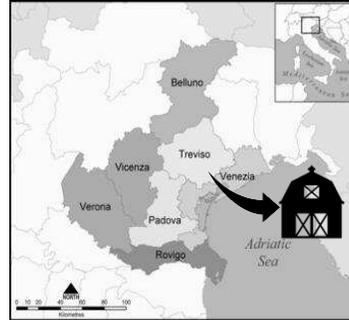


Campionamento

Dove: Veneto – Treviso

Tipo allevamento: Riproduzione ciclo chiuso

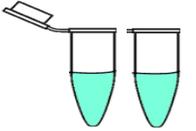
Numero di suini nell'allevamento: 180



	I campionamento	II campionamento
Quando	Febbraio 2016	Ottobre 2018
Segni clinici	Gastroenterite, diarrea per 5-6 giorni, nessuna mortalità	Nessun segno clinico
Numero feci campionate	6	8
ID campioni	52154	90178

Test di Laboratorio

1. Estrazione dell'RNA con il kit Viral (QIAGEN)



2. End point RT-PCR per lo screening e la caratterizzazione di MRV basate rispettivamente sui geni L1 ed S1



3. Isolamento virale in cellule Vero



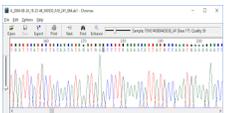
4. TEM sulle colture con CPE



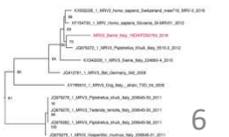
5. NGS sui campioni positivi



6. Sequenziamento Sanger per completare sequenze parziali

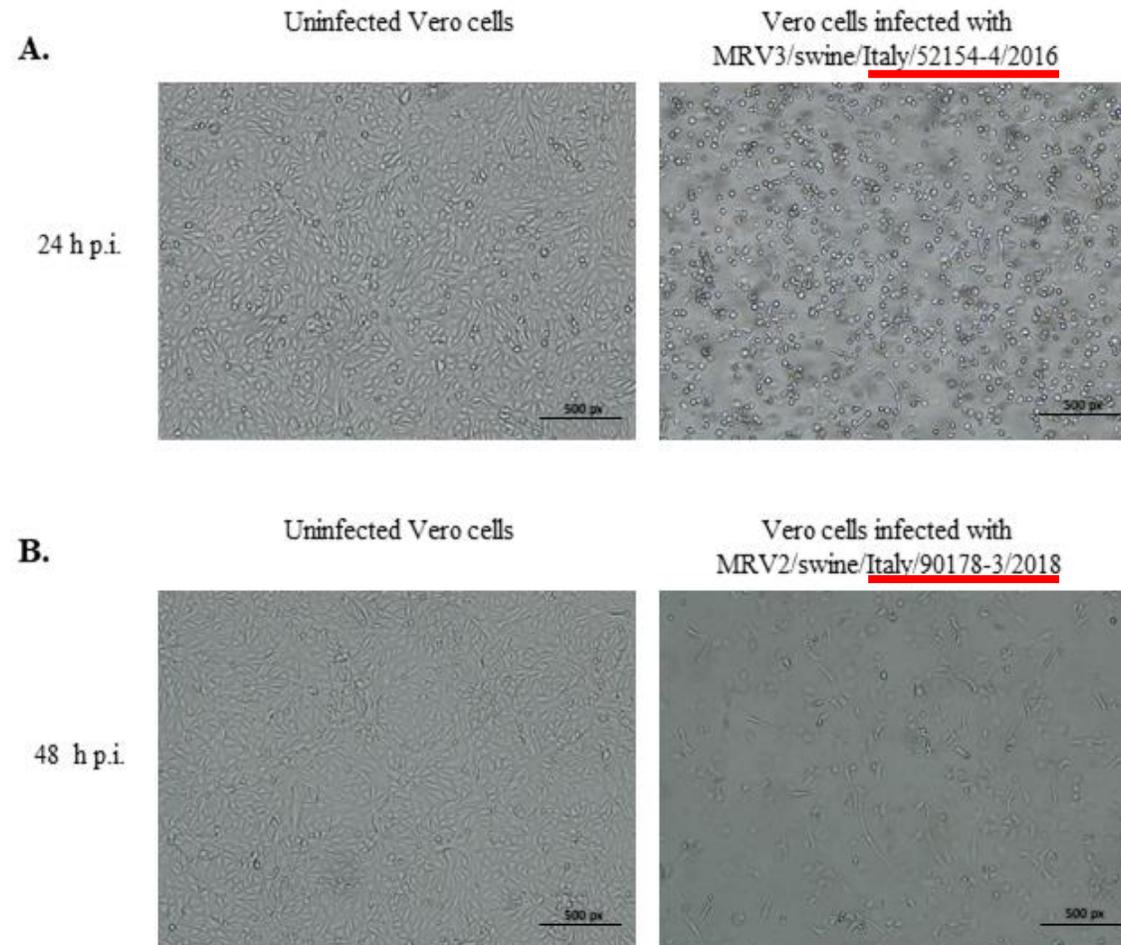


7. Analisi filogenetiche e bioinformatiche



Identificazione di due Novel MRV nello stesso allevamento

ID campioni	52154	90178
Anno	2016	2018
Numero campioni positivi L1	5/6	5/8
Tipizzazione gene S1	MRV3 (5/5)	MRV2 (2/5)
Ceppi isolati	5/5	5/8

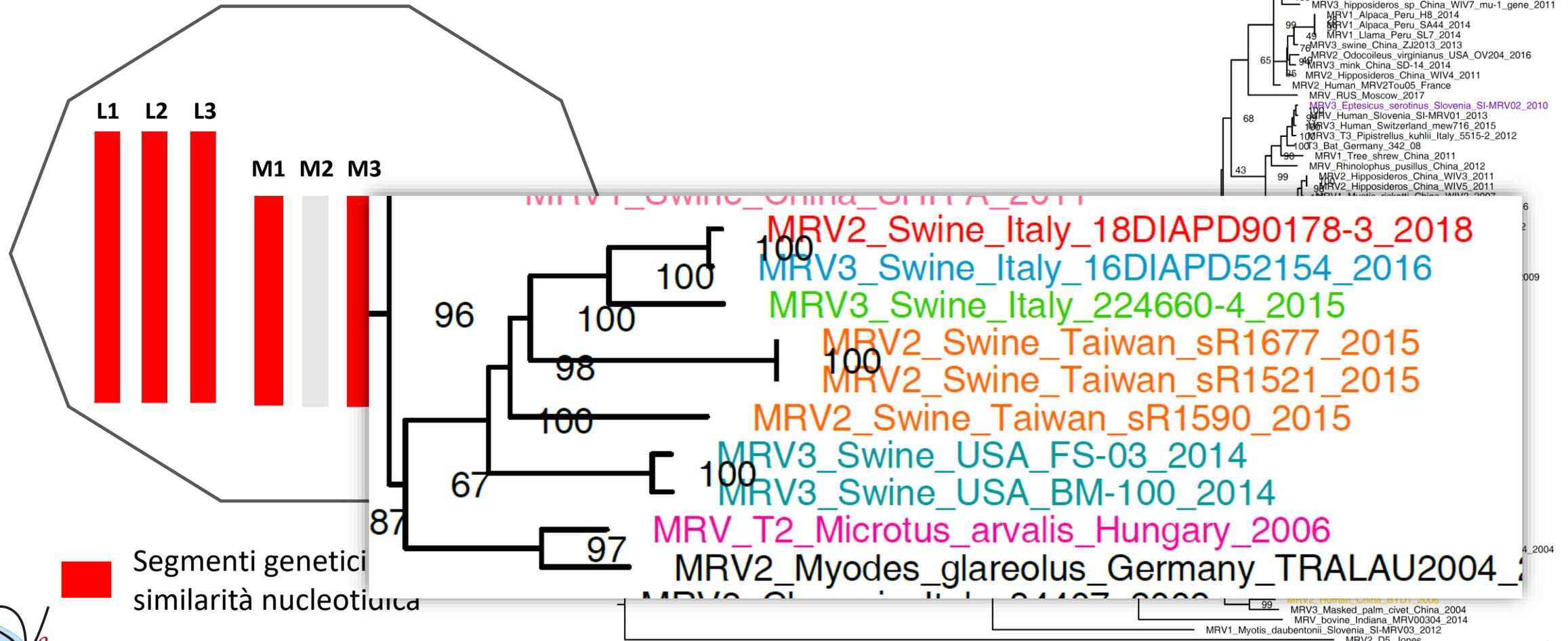


Caratterizzazione Molecolare di MRV2 e MRV3

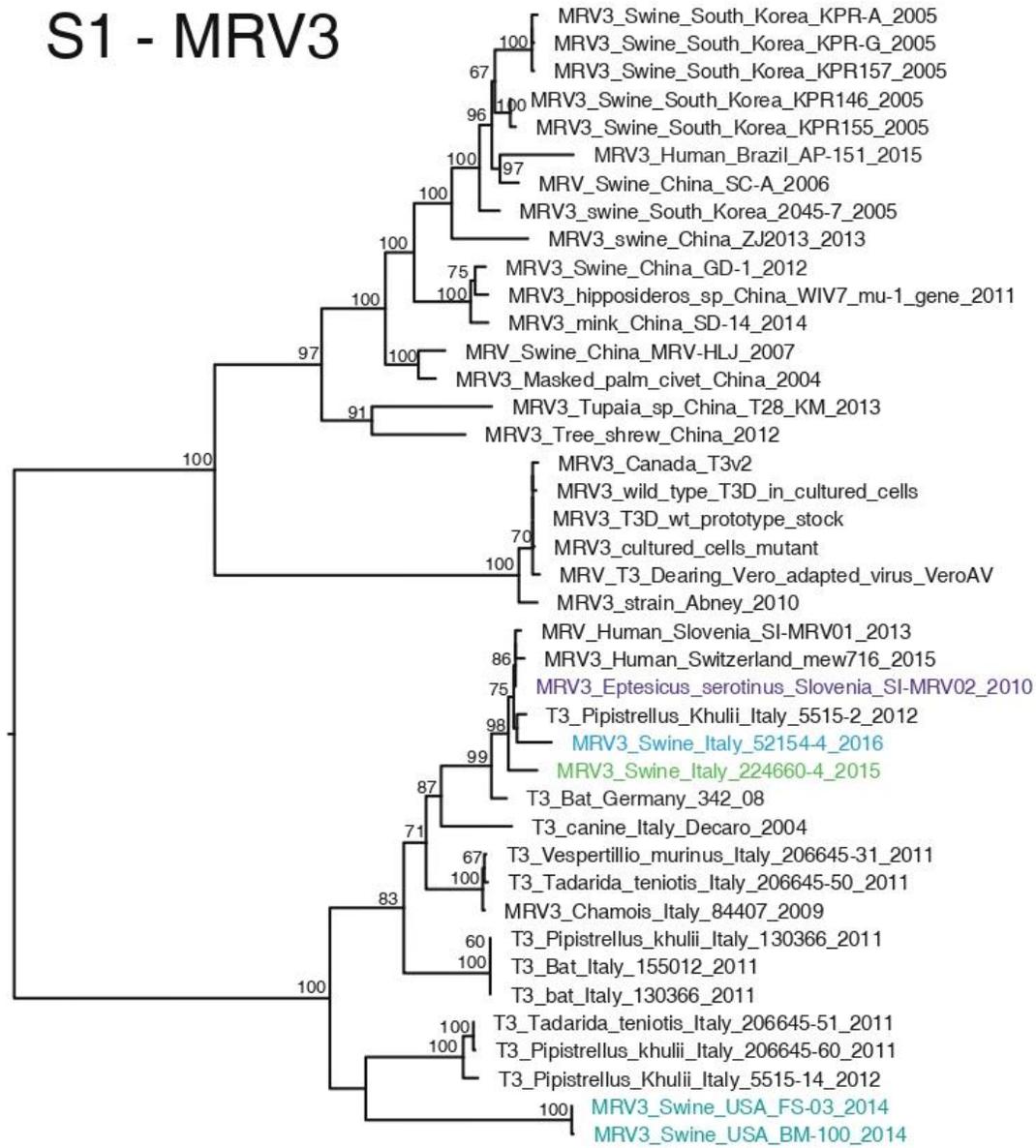
MRV3/2016: seconda segnalazione di MRV3 in Italia nel suino

MRV2/2018: seconda segnalazione MRV2 in Europa nel suino

Gene L1

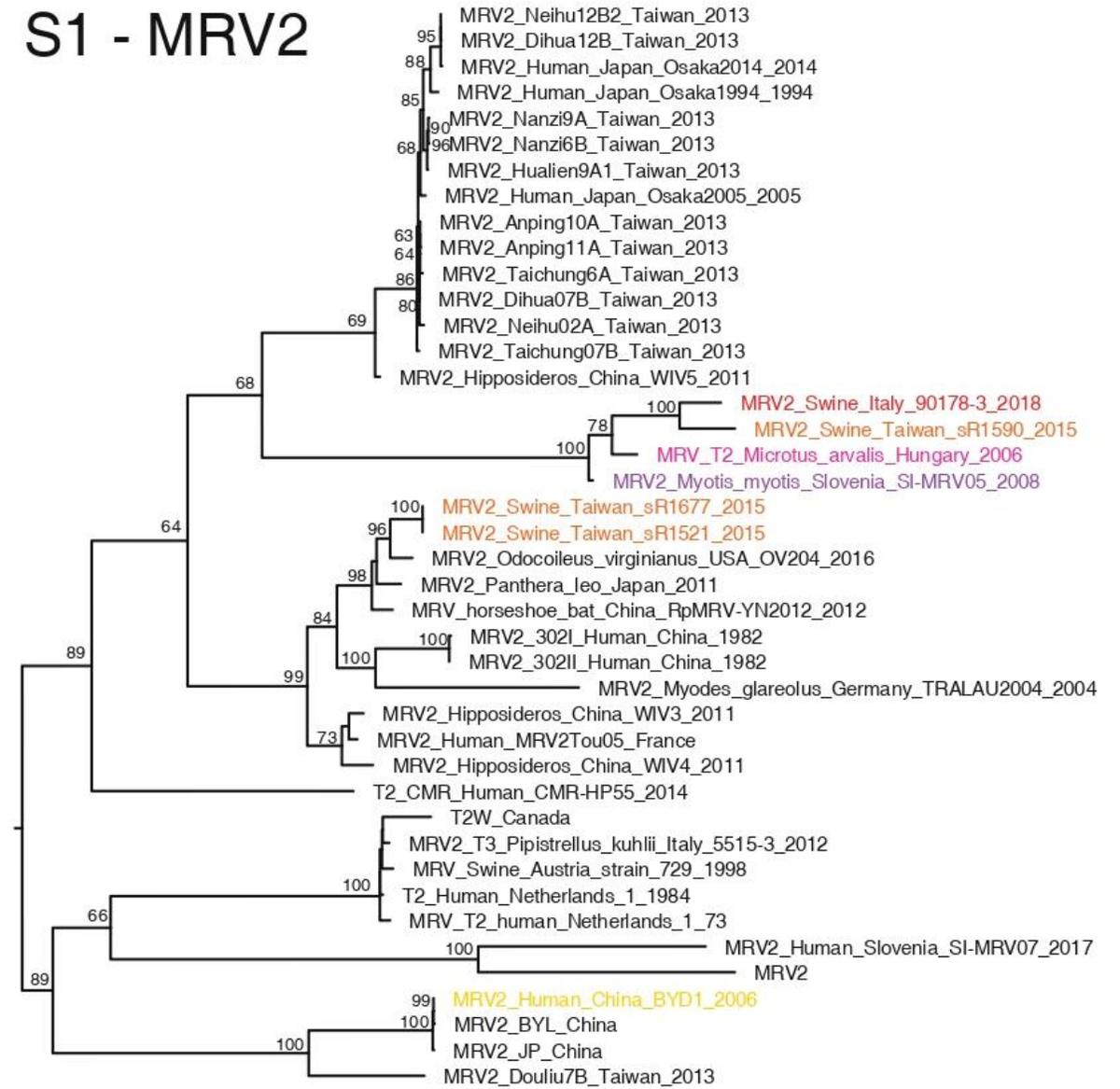


S1 - MRV3



0.03

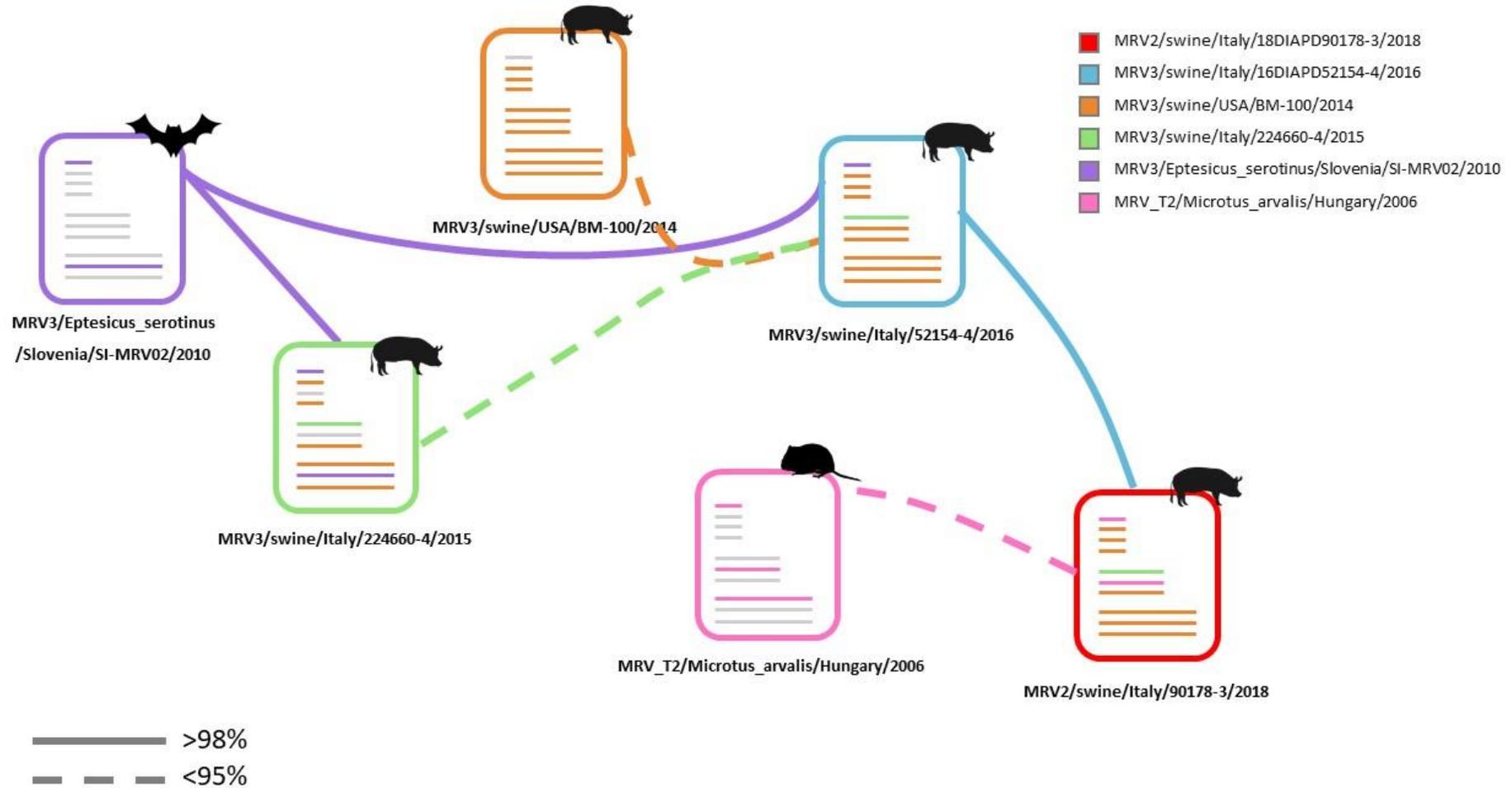
S1 - MRV2



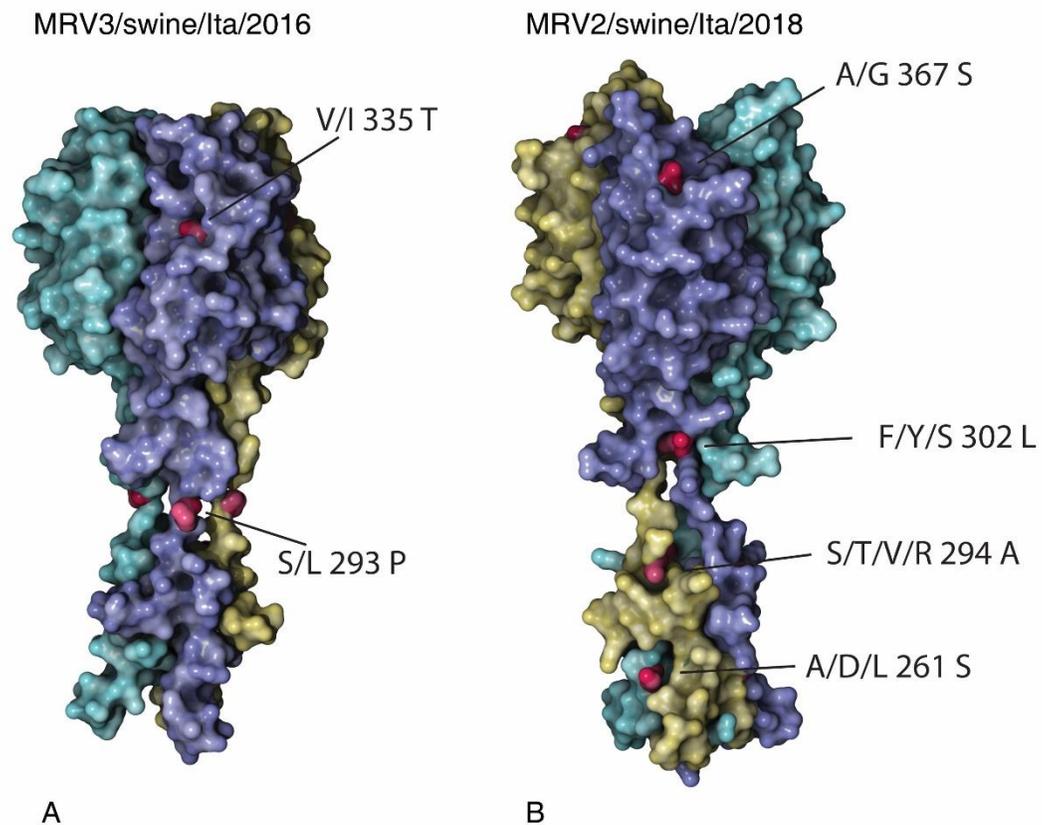
0.3



Ipotesi di riassortimento



● Analisi della proteina S1 di MRV2 e MRV3



Conclusioni

- L'analisi in silico ha evidenziato l'inadeguatezza dei metodi a disposizione per la rilevazione e caratterizzazione degli MRV del suino
- L'assenza di sequenze disponibili rende difficile lo sviluppo di metodi adeguati
- Per questo risulta sempre più necessario la produzione di sequenze e dati relativi ad MRV
- L'assenza di dati sulla distribuzione e sulle caratteristiche genetiche di MRV in Europa rende inoltre difficile qualsiasi ipotesi su potenziali link epidemiologici tra suini, pipistrelli e esseri umani
- Il caso Veneto ha fatto emergere l'importanza a livello zoonotico di MRV visto l'alto tasso di fenomeni di riassortimento genico che lo caratterizzano



Domande aperte

- Prevalenza e distribuzione di MRV nel suino in Italia e in Europa
- Il suino come potenziale mixing vessel?
- Legame tra virulenza e sierotipo
- Interazione pipistrello suino uomo

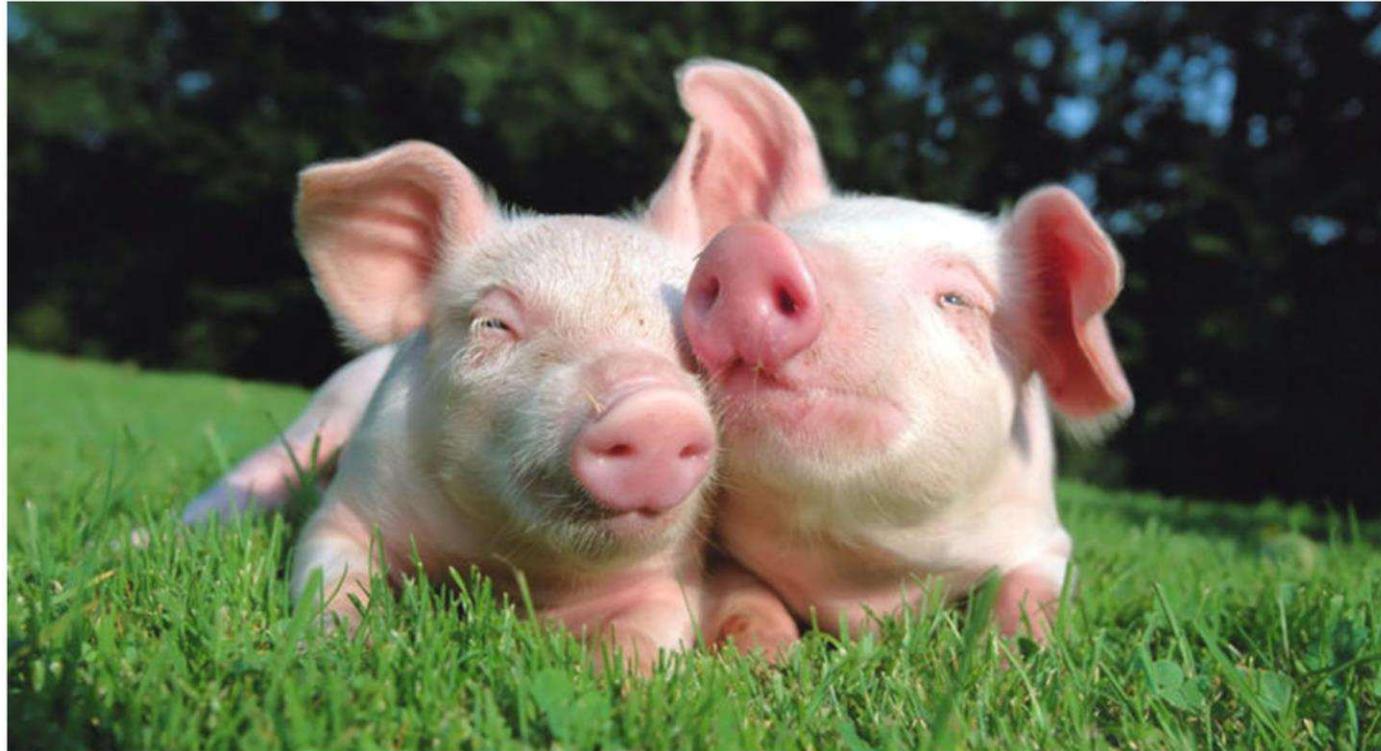


Attività in corso e future

- Indagare la circolazione di MRV negli allevamenti suini mediante una sorveglianza attiva
- Studi ecologici mirati a determinare il legame tra suino uomo e pipistrello
- Miglioramento degli strumenti di diagnostica molecolare per il rilevamento e la caratterizzazione degli MRV
- EVA-GLOBAL progetto europeo H2020: Grant agreement 871029 → sequenziamento



Grazie per l'attenzione!



RC 17/16 IZSve – Italian Ministry of Health

Borsa di studio Sipas

Short term mission Epizone