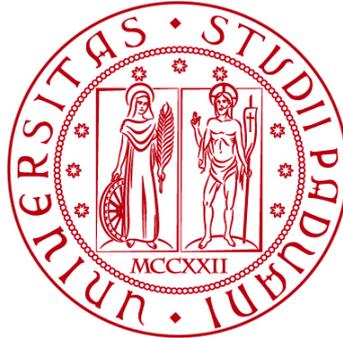


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**ISOLAMENTO DA CAMPIONE CLINICO DEL VIRUS
DELL'INFLUENZA B CIRCOLATO NELLA REGIONE VENETO
NELLA STAGIONE 2022-2023**

**Tutor: Prof.ssa Claudia Del Vecchio
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Co-tutor: Dott.ssa Sarah Di Sopra
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureanda: Laura Cenzone

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1	ABSTRACT.....	1
2	STATO DELL'ARTE (INTRODUZIONE).....	2
2.1	Il virus Influenza.....	2
2.1.1	Trasmissione umana	2
2.1.2	Ciclo replicativo	3
2.2	Il sistema di sorveglianza.....	5
3	APPROCCIO SPERIMENTALE.....	6
3.1	Materiali	6
3.1.1	Campioni	6
3.1.2	Cellule MDCK.....	6
3.2	Metodi.....	6
3.2.1	Mantenimento delle cellule MDCK in coltura e semina.....	6
3.2.2	Isolamento del virus da tampone nasofaringeo.....	6
3.2.3	Amplificazione del virus isolato.....	7
3.2.4	Rilevazione del virus dell'Influenza	7
3.2.5	Estrazione dell'RNA virale	7
3.2.6	PCR end-point	7
3.2.7	Sequenziamento Sanger	8
4	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	9
4.1	Isolamento del virus dell'influenza B su cellule MDCK-CCL-34	9
4.2	Amplificazione del virus isolato.....	10
4.3	Determinazione delle regioni HA e NA del virus B circolante mediante sequenziamento Sanger	10
4.4	Analisi filogenetica del campione analizzato	14
5	CONCLUSIONI.....	17
6	BIBLIOGRAFIA.....	18

1 ABSTRACT

L'influenza è una malattia respiratoria acuta causata da virus influenzali che si presenta tipicamente come un'epidemia stagionale durante il periodo invernale, ma è in grado di causare anche eventi pandemici, nel momento in cui si verificano riassortimenti genetici. La sintomatologia è caratterizzata generalmente da febbre, sintomi delle vie respiratorie e manifestazioni generali, quali dolori ossei, brividi, mal di testa, che compaiono dopo un periodo di incubazione di 3-4 giorni. La diagnosi di influenza si basa solitamente sui sintomi clinici, ma la certezza dell'infezione da parte del virus influenzale è determinata mediante metodi molecolari o sierologici. L'isolamento in colture cellulari invece, non rappresenta un metodo diagnostico di routine ma è importante al fine di contribuire ad esempio all'aggiornamento della composizione dei vaccini, da utilizzare nella stagione successiva, o per testare l'attività antivirale di nuove molecole. In tale contesto, nel corso del tirocinio, a partire da campioni raccolti durante la stagione 2022-2023 dalla U.O.C. Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedale-Università Padova, è stato isolato e caratterizzato il virus influenzale, in particolar modo di tipo B.

2 STATO DELL'ARTE (INTRODUZIONE)

2.1 Il virus Influenza

Il virus dell'Influenza appartiene alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* e presenta un genoma segmentato ad RNA a singolo filamento a polarità negativa di 12-14 kb. I virus A e B contengono 8 segmenti, che codificano una o più proteine; i virus C e D, invece, contengono solo 7 segmenti. Ogni segmento è poi associato a una nucleoproteina (NP) del capsido a formare delle ribonucleoproteine (vRNPs).

Il virione è pleiomorfo sferico o allungato, con nucleocapside elicoidale dotato di envelope, dal diametro di 80-120 nm. Sulla superficie della particella sono presenti le due glicoproteine virali, emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA), che mediano rispettivamente l'ingresso e il rilascio del virus dalla cellula ospite. Al di sotto dell'envelope è presente lo strato della matrice, costituito dalle due proteine M1 e M2, che forniscono supporto all'involucro virale e interagiscono con il nucleocapside più interno. In particolare, M1 è coinvolta nel disassemblaggio del virione e il rilascio delle vRNPs nel citoplasma della cellula ospite, mentre M2 è un canale protonico tetramerico, che modula il pH degli endosomi e permette la scapsidazione. All'interno del nucleocapside sono contenute anche altre proteine, quali: le subunità PB1, PB2 e PA della RNA polimerasi-RNA dipendente, che si assemblano e si legano ad una delle estremità delle vRNPs; la proteina NS1, espressa ad alti livelli durante l'infezione, che inibisce la risposta antivirale dell'interferone; la proteina NS2 (o NEP), che facilita l'esportazione dal nucleo della cellula ospite delle vRNPs e media il contatto di queste con la proteina M1 della matrice. Possono essere presenti anche altre proteine accessorie, come PB1-F2 e PA-x, che insieme a NS1 prevengono la risposta immunitaria innata dell'ospite.

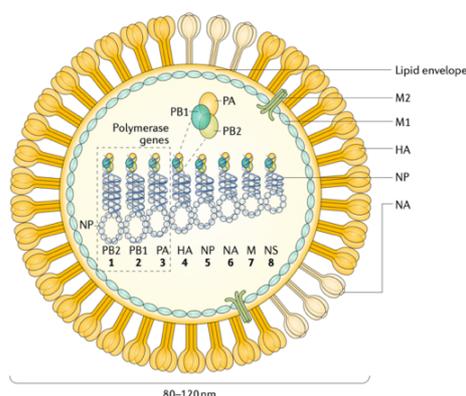


Figura 1. Composizione del virione dell'Influenza.

2.1.1 Trasmissione umana

Dei quattro tipi influenzali, solo i virus A, B e C sono in grado di infettare l'uomo; il virus D, infatti, è stato recentemente isolato da suini e bovini, ma non è ancora

chiara la possibilità di infezione per l'uomo. Per la determinazione del tipo di influenza si analizzano gli antigeni interni NP e M, che sono tipo-specifici. I virus A e B sono responsabili della sintomatologia influenzale classica, con febbre, tosse, mal di gola, raffreddore, mentre il virus C sembra essere associato a infezioni asintomatiche o al raffreddore comune, con scarsa rilevanza clinica. Il virus A circola sia che nell'uomo che in specie animali e, sulla base della struttura antigenica delle glicoproteine di superficie HA e NA, può essere ulteriormente suddiviso in sottotipi; ad oggi, sono stati identificati 18 sottotipi di HA (H1 – H18) e 11 di NA (N1 – N11), dei quali, però, soltanto tre tipi di HA (H1, H2 e H3) e due tipi di NA (N1 e N2) sono presenti stabilmente nell'uomo. Il virus B, invece, circola esclusivamente nell'uomo e può essere suddiviso in due lineaggi, antigenicamente differenti: B/Victoria e B/Yamagata.

Alla base dell'epidemiologia dell'influenza vi è l'instabilità genetica che caratterizza questi virus, ovvero la loro capacità di mutare a livello genetico e/o antigenico. In particolare, le variazioni a carico degli antigeni di superficie permettono l'elusione della risposta immunitaria attraverso due meccanismi: antigenic drift e antigenic shift. Il primo riguarda tutti i tipi e sottotipi influenzali ed è caratterizzato da un accumulo di mutazioni puntiformi nei geni codificanti le proteine HA e/o NA, durante il processo di replicazione; questo evento dà origine a nuovi ceppi, antigenicamente differenti dalle varianti presenti nella popolazione ma geneticamente correlati, che causano le epidemie stagionali. L'antigenic shift, invece, interessa esclusivamente i virus di tipo A e si basa sul riassortimento genetico tra virus umani o tra virus umani e animali co-infettanti la stessa cellula ospite; questo evento porta a nuovi sottotipi virali, con differenti proteine HA e/o NA, che possono causare importanti pandemie.

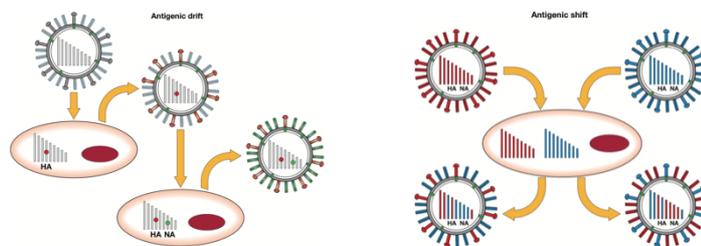


Figura 2. Variabilità del virus influenzale.

2.1.2 Ciclo replicativo

La replicazione virale avviene principalmente nell'epitelio respiratorio e inizia con il legame del virus alla cellula ospite, mediato dalla glicoproteina HA. Questa interagisce con il recettore mucoproteico presente sulla membrana plasmatica, in particolare si lega all'ultimo residuo costituito dall'acido salico, che nelle cellule umane è collegato al resto della molecola mediante un legame α (2 \rightarrow 6). È proprio questo tipo di legame che determina il tropismo del virus; infatti, i ceppi aviari

riconoscono residui sialici con legami di tipo α (2 \rightarrow 3), tipici del tratto intestinale degli uccelli.

A seguito di questa interazione, il virus viene internalizzato tramite endocitosi; l'endosoma viene trasportato e acidificato, grazie alla pompa protonica M2, con conseguente attivazione di proteasi cellulari, che causano un cambiamento conformazionale della proteina HA, con successiva fusione dell'envelope virale con la membrana endosomale. Le ribonucleoproteine (vRNPs) vengono, quindi, rilasciate nel citoplasma della cellula ospite e trasportate nel nucleo, grazie alla proteina NP; a livello nucleare avviene la trascrizione e replicazione dell'RNA genomico, grazie a enzimi virali, enzimi cellulari e oligonucleotidi cellulari dotati di cap 5', che fungono da primer per l'RNA polimerasi. La replicazione procede tramite la formazione di un intermedio a polarità positiva, noto come complesso ribonucleoproteico complementare (cRNP); la trascrizione porta alla formazione di un mRNA a polarità positiva con 5'-cap e 3'-poli-A, che viene esportato nel citoplasma e tradotto nelle proteine virali. Tra le proteine sintetizzate, le 3 subunità della polimerasi e NP vengono trasportate nuovamente nel nucleo e aiutano nella sintesi dell'RNA virali, le proteine HA, NA e M2 vengono inserite nella membrana cellulare, a livello di zone ricche di sfingolipidi e colesterolo, mentre le proteine M1 e NEP, prodotte nelle ultime fasi, legano i vRNPs generati e mediano il loro trasporto nel citoplasma.

I nuovi virioni, quindi, escono dalla cellula ospite, incorporando le vRNPs prodotte, tramite un processo di gemmazione favorito dalla proteina NA, che impedisce il legame delle HA delle nuove particelle con i residui di acido sialico della cellula da cui vengono rilasciate; in questo modo viene favorita la diffusione del virus.

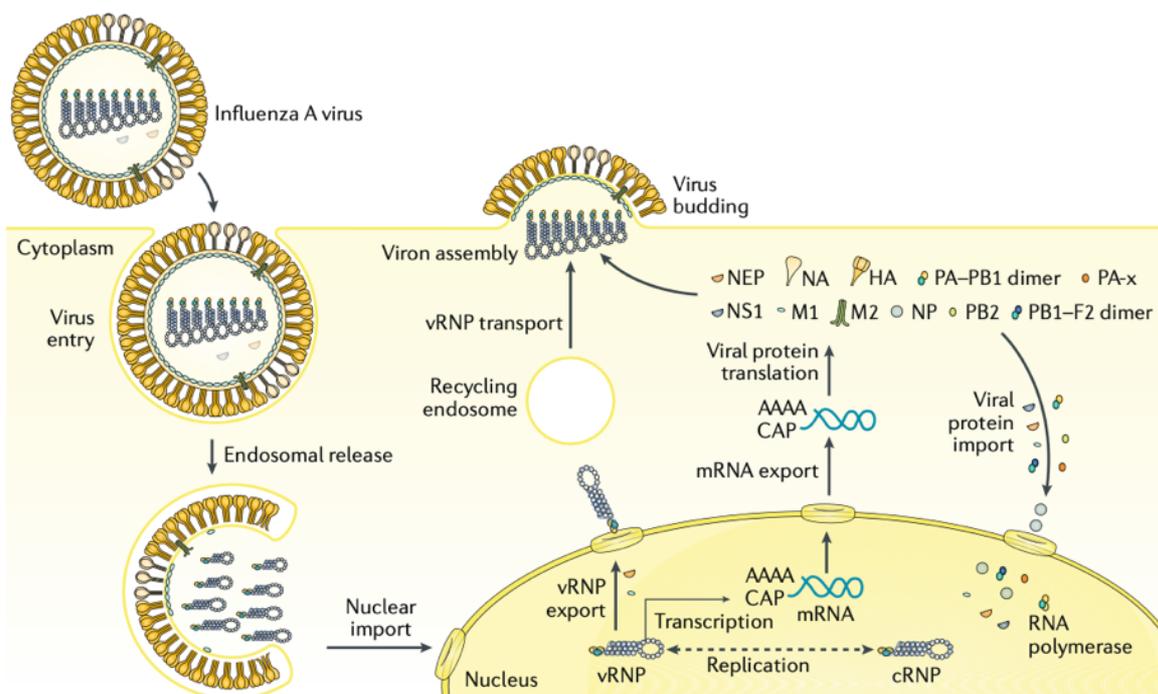


Figura 3. Ciclo replicativo.

2.2 Il sistema di sorveglianza

L'Influenza è un importante problema per la sanità pubblica con un notevole impatto dal punto di vista clinico, epidemiologico ed economico dovuto a diversi fattori quali: la variabilità antigenica del virus, la diffusione mondiale, l'elevata contagiosità, la possibilità di insorgenza di forme gravi con conseguente aumento dei costi di gestione.

A livello nazionale, la sorveglianza dell'Influenza viene effettuata mediante l'utilizzo del sistema InluNet, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), con il supporto del Ministero della Salute. Questo sistema è stato istituito nel 2000 e permette di attuare sia una sorveglianza epidemiologica, che determina inizio, durata e intensità dell'epidemia stagionale, sia una sorveglianza virologica, che monitora la circolazione dei diversi tipi e sottotipi di virus influenzale. Nella stagione influenzale 2022-2023, l'80% dei casi rilevati sono correlati al virus A, con prevalenza del sottotipo H3N2, e il restante 20% sono causati da virus B, appartenente al lineaggio Victoria. Inoltre, il picco di incidenza si è osservato in anticipo rispetto alle stagioni precedenti, come riportato in Figura 4.

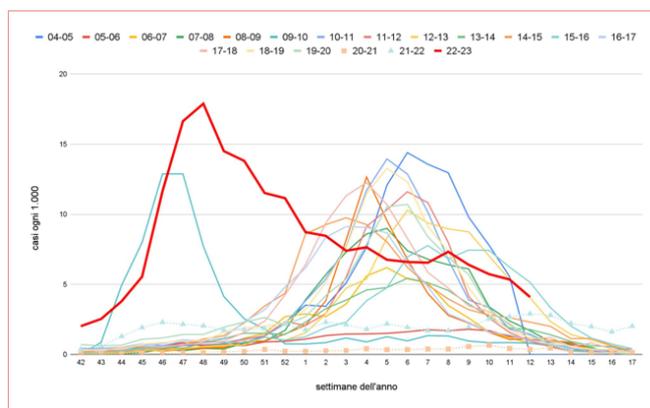


Figura 4. Andamento dei tassi di incidenza dalla stagione 2004-2005 ad oggi.

A livello europeo, i dati della sorveglianza sono raccolti dal Network Europeo di Sorveglianza Influenzale (EISN), coordinato dal Centro Europeo di Controllo e prevenzione delle Malattie (ECDC). Si stima che, in Europa, fino a 50 milioni di persone contraggano un'infezione sintomatica ogni anno, con un numero di decessi compreso tra i 15.000 e i 70.000.

A livello mondiale, la sorveglianza è attuata dal Sistema di Sorveglianza Globale dell'Influenza WHO (GISRS) e stima che, globalmente, ogni anno, il virus colpisce il 5-15% della popolazione adulta e il 20-30% dei bambini.

3 APPROCCIO SPERIMENTALE

3.1 Materiali

3.1.1 Campioni

Per eseguire l'analisi sono stati utilizzati tamponi naso-faringei raccolti presso la U.O.C. Microbiologia e Virologia-Azienda Ospedale - Università Padova.

3.1.2 Cellule MDCK

Per l'isolamento e l'amplificazione del virus sono state utilizzate cellule della linea MDCK (Madin-Darby Canine Kidney - ATCC CCL-34™), isolate dal tubulo renale di cane. Si tratta di una linea cellulare molto utilizzata in virologia perché è permissiva, quindi può essere infettata e permette la replicazione del virus, in particolar modo quello influenzale.

3.2 Metodi

3.2.1 Mantenimento delle cellule MDCK in coltura e semina

Le cellule MDCK-CCL-34 vengono diluite 1:5 ogni 2-3 giorni. A tal fine si procede rimuovendo il terreno (DMEM addizionato di Penicillina-Streptomina 1X e 10% (v/v) FBS – ThermoFisher Scientific) dalla fiasca T75 e si effettua un lavaggio utilizzando 7 mL di PBS 1X (ThermoFisher Scientific). Per questo passaggio, si rilascia delicatamente il PBS 1X sulle cellule, per evitare di staccarle, e si muove leggermente la fiasca per distribuirlo su tutta la superficie; si prosegue poi con la rimozione del liquido aspirando dalla parte opposta rispetto a dove sono adese le cellule. Si aggiungono, quindi, 3 mL di tripsina-EDTA (ThermoFisher Scientific), e si incuba la fiasca a 37°C 5% (v/v) CO₂ per 5-10 min. Quando le cellule risultano in sospensione, si aggiungono 7 mL di DMEM addizionato di antibiotici 1X e 10% (v/v) FBS e si risospende pipettando delicatamente per ottenere una sospensione omogenea di cellule singole. Si procede quindi con la conta alla camera di Burkner e al calcolo del numero di cellule per mL.

Successivamente, si seminano le cellule in una piastra da 6 pozzetti per ottenere una concentrazione di 100.000 cellule per pozzetto. Infine, si incuba la piastra a 37°C 5% (v/v) CO₂ per 24h.

3.2.2 Isolamento del virus da tampone nasofaringeo

Per l'isolamento del virus dal campione clinico, ottenuta una confluenza delle cellule tra il 75% e il 90%, nella piastra seminata il giorno precedente, si procede con la rimozione del terreno, si lava con PBS 1X e si inoculano 200 µL di tampone nasofaringeo. Nella piastra si predispongono anche dei pozzetti di controllo non infetti, dove si aggiunge terreno DMEM senza siero. Quindi, si incuba a 37°C 5% (v/v) CO₂ per 1h, muovendo delicatamente la piastra ogni 15 min.

Trascorsa l'ora di infezione, si elimina il surnatante, si lava con PBS 1X e si aggiungono 500 µL di terreno costituito da: BSA (0.6 % (v/v)), antibiotico-antimicotico (AA) (ThermoFisher Scientific) 1X e tripsina TPCK 0.5 µg/mL

(ThermoFisher Scientific). Infine, si incuba la piastra a 37°C 5% (v/v) CO₂ e si valutano gli effetti citopatici ogni 24h, per 3-5 giorni. Il surnatante contenente il virus viene, quindi, prelevato per la successiva fase di amplificazione.

3.2.3 Amplificazione del virus isolato

L'amplificazione si esegue in fiasche T75, dove vengono seminate 3·10⁶ MDCK-CCL-34, mantenute a 37°C 5% (v/v) CO₂. Dopo 24h, raggiunta la confluenza del 90%, si procede con l'infezione, utilizzando il surnatante ottenuto nella fase di isolamento del virus di cui al paragrafo 3.2.2. Quindi, si rimuove il terreno, si effettua un lavaggio con PBS 1X e si inoculano 4 mL di virus, precedentemente diluito 1:100 con DMEM privo di siero. Il tempo di infezione è di 1h a 37°C 5% CO₂ e ogni 15 min circa è opportuno muovere delicatamente la fiasca per distribuire il virus sulla superficie. Si procede con la preparazione del terreno post-infezione, come nel paragrafo 3.2.2, che viene addizionato dopo aver effettuato un lavaggio con PBS 1X al fine di rimuovere il virus in eccesso; infine, si incuba a 37°C 5% (v/v) CO₂ per 72h o fino alla comparsa di effetti citopatici. Il surnatante viene, quindi, prelevato e conservato per successive indagini.

3.2.4 Rilevazione del virus dell'Influenza

La presenza di RNA virale è stata determinata impiegando il test RT-PCR multiplex SARS-CoV-2/Flu A/B/RSV Assay Panther Fusion™ (Hologic), in grado di differenziare la presenza in diverse matrici dell'RNA di SARS-CoV-2, dal virus dell'influenza A (Flu A), dal virus dell'influenza B (Flu B) e dal virus respiratorio sinciziale (RSV). In breve, il test prevede la lisi del campione e la cattura dell'acido nucleico in una provetta fornita dal produttore e successivo trasferimento dell'eluato in una provetta di reazione del Panther Fusion System, contenente i reagenti del test necessari per l'amplificazione.

3.2.5 Estrazione dell'RNA virale

Per l'estrazione dell'acido nucleico viene utilizzato il kit Maxwell® CSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit basato sull'impiego di particelle paramagnetiche, che costituiscono una fase solida mobile per la cattura del campione, il lavaggio e la purificazione dell'acido nucleico. In particolare, si aggiungono 200 µL di tampone di lisi e 20 µL di Proteinasi K a 200 µL del surnatante. Dopo incubazione a 56°C per 10 min si procede con l'estrazione seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

3.2.6 PCR end-point

La reazione viene allestita impiegando: 17,6 µL di Reaction Mix (dNTP) 2X, 5 µL di MgSO₄ 5 mM, 0,7 µL di primer F e R 10 µM, 0,7 µL di SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix e 6 µL di estratto (volume totale di reazione: 30 µL).

Allestita la reazione, si imposta il termociclatore come segue: 50°C per 30' (fase di retrotrascrizione); 95°C per 5' (fase di inattivazione dell'attività di retrotrascrittasi e attivazione dell'attività di DNA polimerasi dell'enzima Taq); 45 cicli di amplificazione a 95°C per 1' (fase di denaturazione), 55°C per 1' (fase di

ibridazione) e 72°C per 3' (fase di estensione); 72°C per 5' (fase di elongazione finale).

Gli amplificati ottenuti vengono caricati in gel di agarosio 2% (p/v), in dettaglio 5 µl di amplificato sono stati addizionati di 2 µl di Loading Dye (glicerolo 5% (v/v), blu di bromofenolo 0.15% (p/v), Xilene cianolo 0.02% (p/v), EDTA 0.002 M). Viene utilizzato il marcatore di peso molecolare "Marker VIII" 250 µg/mL (le bande sono così posizionate: 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 pb) (Roche).

3.2.7 Sequenziamento Sanger

Gli amplificati ottenuti come descritto nel paragrafo 3.2.6 sono stati sottoposti a purificazione aggiungendo 1,5 µL di reagente ExoSAP-IT™ (ThermoFisher Scientific) ad ogni campione di PCR ed incubazione a 37°C per 30' e 80°C per 15'.

Le miscele di sequenziamento vengono allestite nel seguente modo: 10 µL di H₂O, 5 µL di primer 1 µM, 2 µL di Buffer 2X, 1 µL di Big Dye® (contiene la polimerasi, i dNTP e i ddNTP) e 5 µL di PCR purificata.

Preparate le miscele, si imposta il termociclatore: 96°C per 3' (fase di denaturazione); 30 cicli di amplificazione a 96°C per 10'', 50°C per 5'' e 60°C per 4'; 62°C per 7' (fase di elongazione finale).

Terminata la reazione di sequenziamento, si purificano i campioni mediante le colonne Centri-Sept™ Spin Columns (ThermoFisher Scientific), che sfruttano la gel filtrazione per rimuovere i reagenti in eccesso.

Infine, i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem). Dopo separazione dei frammenti marcati ed eccitazione laser dei fluorofori, i dati grezzi vengono analizzati dal software *sequencing analysis* e restituiti come elettroferogramma.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

La stagione influenzale 2022-2023 è stata caratterizzata da una co-circolazione di virus influenzali di tipo A e B, con un picco di incidenza che si è osservato in anticipo rispetto a tutte le stagioni precedenti, tranne quella pandemica 2009-2010. In particolare, dei 28.997 campioni clinici raccolti dai diversi laboratori afferenti alla rete Influnet, il 21.8% è risultato positivo al virus influenzale, di cui il 79.5% di tipo A e il 20.5% di tipo B. Tra quest'ultimi, tutti i 653 ceppi di cui è stato caratterizzato il lineaggio sono risultati B/Victoria.

Anche il laboratorio di Microbiologia e Virologia (U.O.C. Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedale-Università Padova) fa parte della rete di laboratori di riferimento regionale (Rete Influnet) per la sorveglianza e caratterizzazione dei virus influenzali ed è il centro di riferimento per la Regione Veneto. In particolare, mediante l'utilizzo di metodi molecolari commerciali, che sfruttano sistemi di RT-PCR multiplex, viene eseguita una diagnosi differenziale dei principali virus respiratori, quali SARS-CoV-2, virus dell'influenza A (Flu A), virus dell'influenza B (Flu B) e virus respiratorio sinciziale (RSV).

Durante il corso di questo tirocinio, a partire da un campione raccolto durante la stagione 2022-2023 dalla U.O.C. Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedale-Università Padova, risultato positivo al virus influenzale di tipo B, è stato possibile isolare in coltura cellulare e caratterizzare mediante sequenziamento il virus.

4.1 Isolamento del virus dell'influenza B su cellule MDCK-CCL-34

Il tampone naso-faringeo raccolto e conservato a -80°C è stato utilizzato per l'isolamento del virus influenzale in coltura, su monostrato della linea cellulare continua MDCK-CCL-34. Queste cellule derivano dal tubulo renale di cane e sono molto utilizzate in virologia perché sono permissive, quindi possono essere infettate e permettono la replicazione del virus, in particolar modo quello influenzale. Il principale effetto citopatico che si verifica è la perdita di adesività delle cellule nei pozzetti, quindi nei giorni successivi l'infezione si osserva un numero crescente di cellule che si trovano in sospensione.

Il sovrantante della coltura cellulare viene poi analizzato mediante tecniche molecolari, che sfruttano un sistema di Real-Time PCR per determinare la presenza del virus influenzale nella coltura e per confermare che la lisi delle cellule è conseguenza diretta della replicazione. L'analisi dei risultati rilasciati dalla piattaforma Hologic® ha permesso di evidenziare la presenza di virus influenzale di tipo B lineaggio Victoria nel sovrantante della coltura cellulare e pertanto di confermare l'avvenuto isolamento del virus a partire dal campione (Figure 5 e 6).

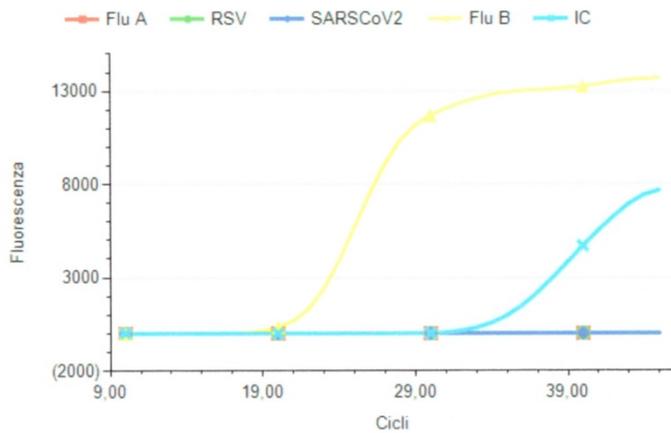


Figura 5. Curva di amplificazione del virus influenzale di tipo B (curva gialla).

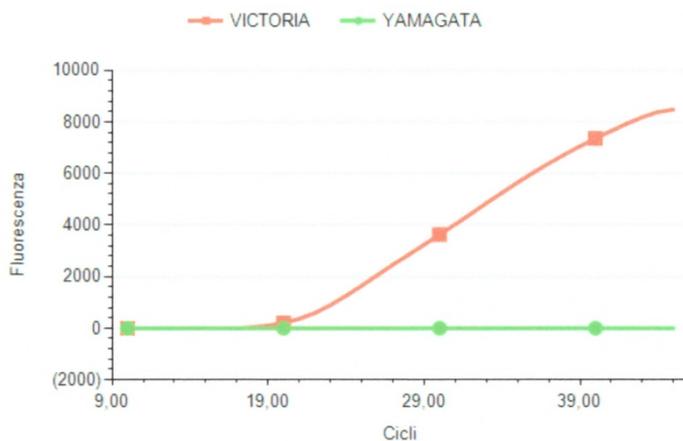


Figura 6. Curva di amplificazione del virus influenzale B lineaggio Victoria (curva arancione).

4.2 Amplificazione del virus isolato

Effettuato l'isolamento del virus influenzale di tipo B dal campione, si è proceduto con l'amplificazione del virus al fine di espandere la preparazione virale da poter utilizzare per le successive applicazioni. Pertanto, il virus isolato viene inoculato in un monostrato di cellule MDCK-CCL-34 e si osserva, nei giorni successivi l'infezione, la comparsa dell'effetto citopatico.

Il virus viene quindi aliquotato e conservato a -80°C per le successive indagini.

4.3 Determinazione delle regioni HA e NA del virus B circolante mediante sequenziamento Sanger

Il virus isolato è stato infine caratterizzato a livello delle regioni antigeniche (emoagglutinina HA e neuraminidasi NA), tramite sequenziamento di Sanger. Questa analisi permette di confrontare il campione con i ceppi influenzali circolanti e già caratterizzati, e di contribuire quindi all'aggiornamento della composizione dei vaccini da utilizzare nella stagione successiva.

A partire dal sovrinatante della coltura cellulare, è stato estratto l'RNA ed amplificato, impiegando un sistema One-Step RT-PCR SuperScript™ III che permette di eseguire in una sola reazione sia la fase di sintesi del cDNA sia

l'amplificazione. Infatti, il sistema sfrutta due enzimi, presenti nella stessa miscela di reazione, attivi a temperature diverse: a 45-60°C è attiva la trascrittasi inversa SuperScript™ III, che sintetizza il cDNA; a 94°C è attiva la Taq DNA polimerasi Platinum™, che amplifica il cDNA precedentemente prodotto. L'amplificazione avviene in modo specifico, sfruttando una coppia di oligonucleotidi complementari alla regione target (primer forward e reverse); affinché la reazione avvenga in modo corretto, è necessario aggiungere anche un tampone di reazione, contenente un tampone pH e ioni di magnesio, fondamentali per il funzionamento della polimerasi. La reazione procede con un processo ciclico, che si articola in più fasi: denaturazione del cDNA, ibridazione del DNA a singolo filamento con i primer ed estensione (formazione del doppio filamento a partire dai primer).

Attraverso questa tecnica è possibile ridurre il rischio di contaminazione in quanto si esegue una PCR one-step, quindi in un'unica reazione avviene sia la retrotrascrizione sia l'amplificazione del target.

Quindi, sono state allestite le reazioni di amplificazione, ognuna contenente un primer specifico per l'estremità 5' o 3' della proteina HA/NA, come descritto nel paragrafo 3.2.6. I primer specifici impiegati per l'amplificazione della regione dell'emoagglutina e della neuraminidasi sono di proprietà del CDC (CDC, Centers for Disease Control and Prevention Influenza Division, Atlanta, GA, USA) pertanto non sono stati riportati.

Per poter verificare l'avvenuta reazione di PCR, gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio, al fine di verificare che le dimensioni dei frammenti ottenuti fossero corrette (dati non riportati). In particolare, per gli amplificati della regione HA ci si aspetta un peso molecolare di circa 1380 pb, mentre per la regione NA il peso molecolare atteso è di circa 1150 pb. L'analisi della corsa elettroforetica ha permesso di stabilire che erano presenti gli amplificati della dimensione attesa.

Gli amplificati sono stati poi purificati e sequenziati tramite metodo di Sanger, come descritto nel paragrafo 3.2.7, impiegando i primer riportati dal CDC.

Nel sequenziamento si utilizza il kit 'Big dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction' (Applied Biosystem), che si basa su una modifica del metodo ideato da Sanger. In particolare, si utilizzano 2'-3'-dideossinucleosidi trifosfato (ddNTP), che vengono incorporati dall'enzima DNA polimerasi AmpliTaq® durante la polimerizzazione, grazie alla presenza di gruppi 5'-trifosfato; essendo, però, privi del 3'-OH, non vengono legati a deossinucleosidi trifosfato (dNTP) successivi, per cui si formano frammenti di diversa lunghezza, complementari allo stampo, tutti con la stessa estremità 5', ma con diversa estremità 3' in base al punto di interruzione della polimerizzazione. Inoltre, ogni ddNTP è coniugato a un differente fluoroforo, in modo da poter distinguere le quattro basi nella fase di rilevamento e poter ricostruire la sequenza di DNA stampo.

Nelle Figure 7 - 14 vengono riportati gli elettroferogrammi relativi al sequenziamento del virus influenzale B lineaggio Victoria isolato da campione clinico. In particolare, le figure 7 e 9 sono relative al sequenziamento della regione 3' della HA mediante due diversi primer, mentre le figure 8 e 10 sono relative alla regione 5'; invece le figure 11 e 13 riguardano il sequenziamento della regione 5' della NA, mentre le figure 12 e 14 della regione 3' della NA, sempre utilizzando due primer diversi.

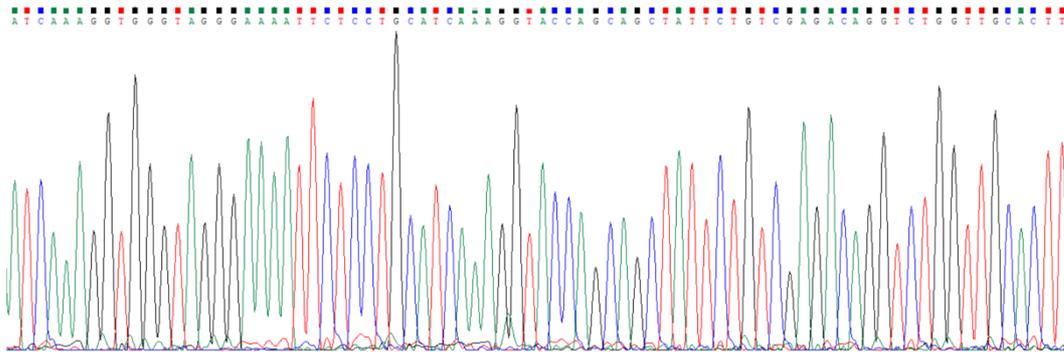


Figura 7. Elettroferogramma della regione 3' dell'emoagglutinina (HA).

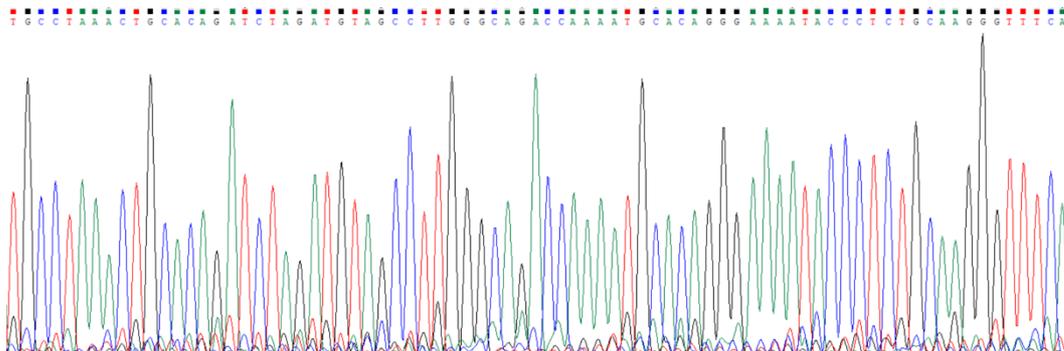


Figura 8. Elettroferogramma della regione 5' dell'emoagglutinina (HA).

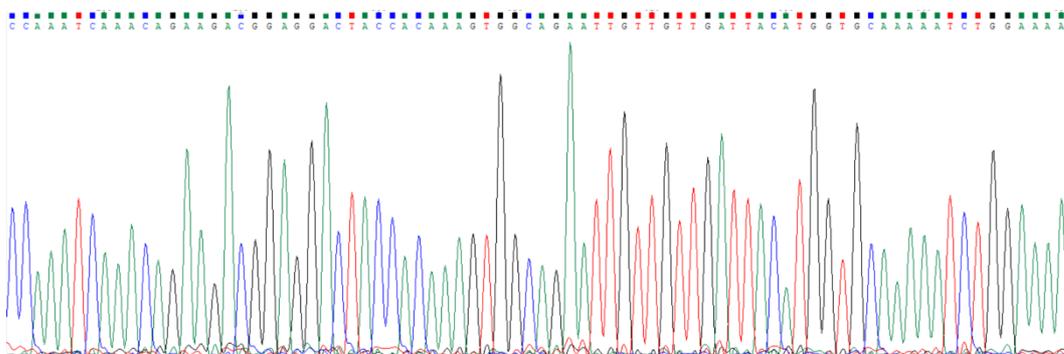


Figura 9. Elettroferogramma della regione 3' dell'emoagglutinina (HA).

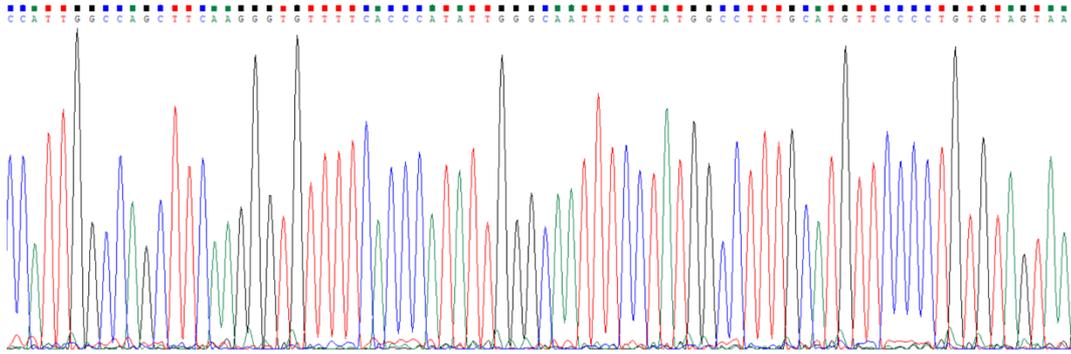


Figura 10. Elettroferogramma della regione 5' dell'emoagglutinina (HA).

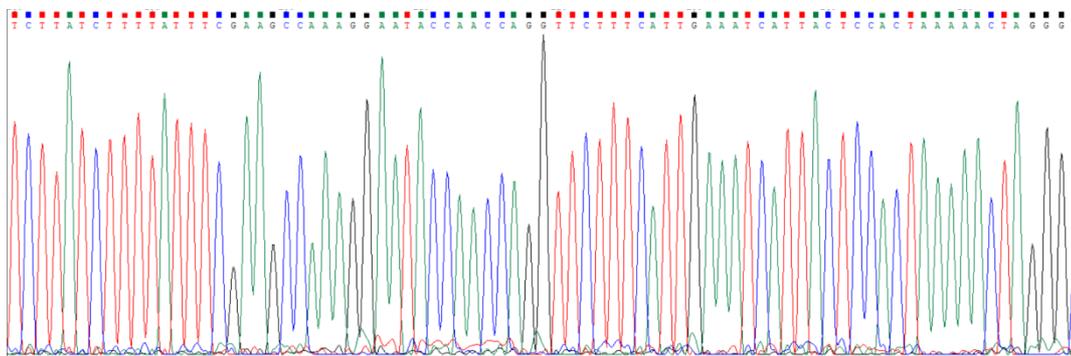


Figura 11. Elettroferogramma della regione 5' della neuroaminidasi (NA).

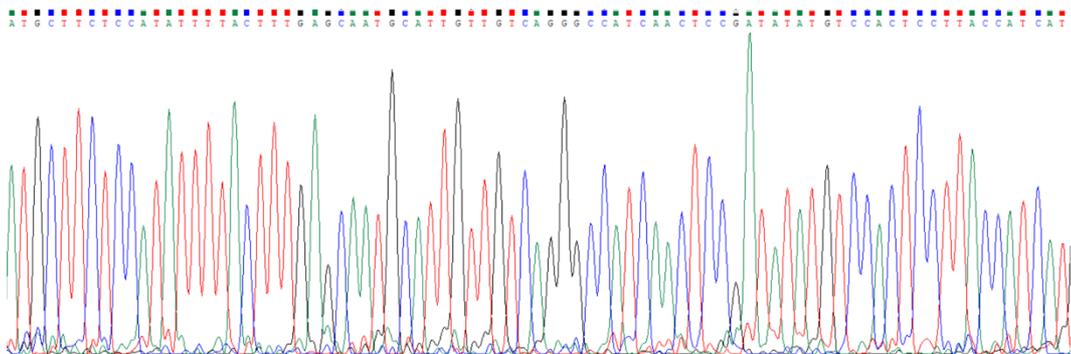


Figura 12. Elettroferogramma della regione 3' della neuroaminidasi (NA).

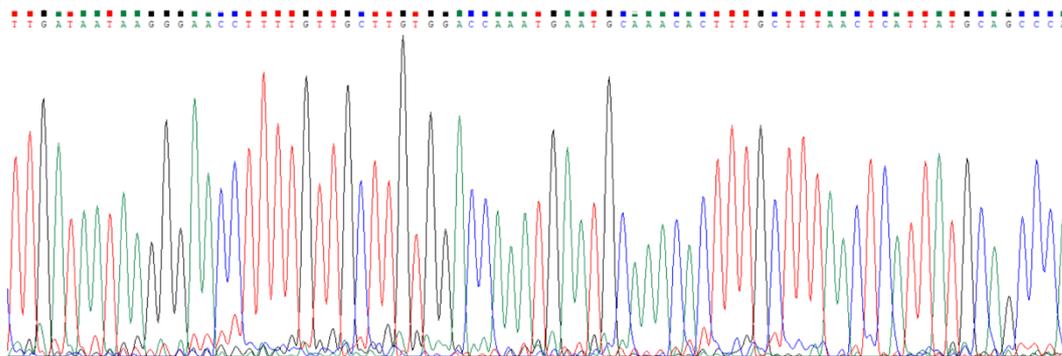


Figura 13. Elettroferogramma della regione 5' della neuroaminidasi (NA).

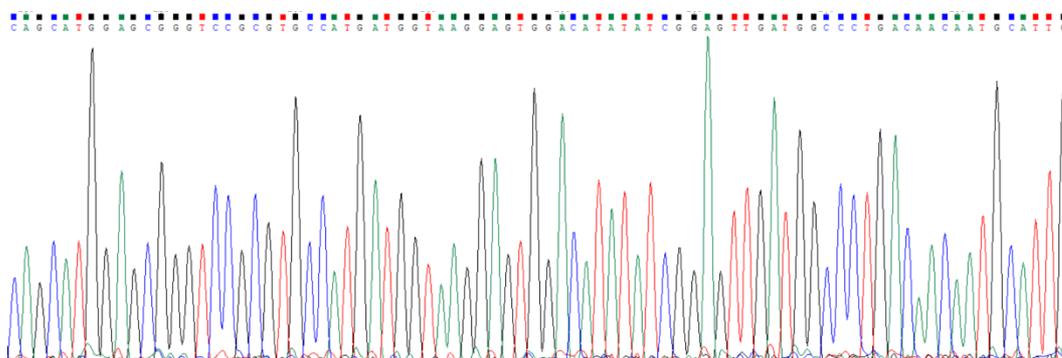


Figura 14. Elettroferogramma della regione 3' della neuroaminidasi (NA).

4.4 Analisi filogenetica del campione analizzato

Dall'analisi molecolare e filogenetica del gene dell'emoagglutinina HA, tutti i ceppi influenzali di tipo B circolanti nella stagione influenzale corrente sono risultati appartenenti al lineaggio Victoria, in particolare il 70% è risultato del *clade* V1A e del *sub-clade* V1A.3a.2, che comprende anche il ceppo vaccinale B/Austria/1359417/2021 (Figura 15). Il restante 30% invece non risulta ancora essere stato assegnato ad uno specifico sottogruppo.

In particolare, questo *sub-clade* è definito dalle sostituzioni aminoacidiche A127T, P144L e K203R nella regione HA1, che lo differenzia dal *sub-clade* V1A.3, a cui appartiene il ceppo vaccinale B/Washington/02/2019 utilizzato nella stagione 2021-2022.

Ceppo vaccinale (stagioni 2022/2023 e 2023/2024)

Ceppi di riferimento

Data raccolta:

Dicembre 2022

Gennaio 2023

Febbraio 2023

Marzo 2023

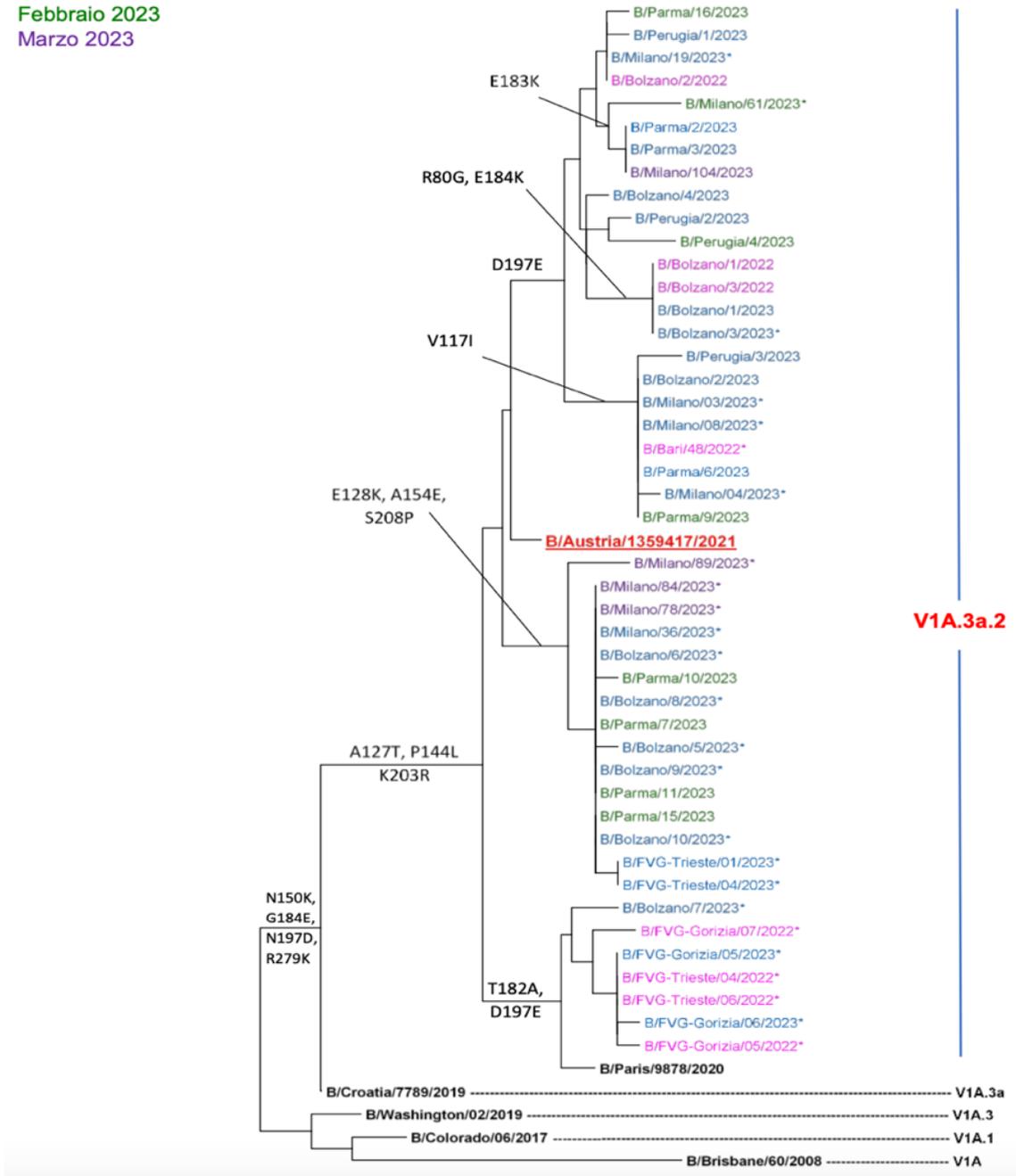


Figura 15. Relazioni filogenetiche relative al gene HA di virus influenzali B (lineaggio Victoria) isolati in Italia (da: Sorveglianza virologica dell’Influenza, Rapporto N. 22 del 21 aprile 2023, Settimana 15/2023).

Per determinare il *clade* e *sub-clade* di appartenenza del campione in analisi è stato effettuato l’allineamento della sequenza ottenuta dalla reazione di sequenziamento, tramite il software Protein BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool). In particolare, sono stati individuati due aminoacidi, A (alanina) in posizione 182 e E (acido glutammico) in posizione 197, che caratterizzano un *cluster* all'interno del *sub-clade* V1A.3a.2, indicando l'appartenenza del virus a quest'ultimo. Infatti, questi aminoacidi non sono presenti nella HA del ceppo vaccinale sopra indicato, dove è presente treonina (T) in posizione 182 e acido aspartico in posizione 197, ma indicano la presenza di ulteriori gruppi virali nello stesso *sub-clade*.

Range 1: 131 to 413 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	549 bits(1414)	0.0	Compositional matrix adjust.	264/283(93%)	267/283(94%)	0/283(0%)	-1
Query	885		NMSVSTHNVINTRMRHRRTRLRNWNLRVCLNITNGKGGFFATMAWAVPKNK	ATNPLTIEVP			706
			++ +STHNVINT	CLNITNGKGGFFATMAWAVPKNK	ATNPLTIEVP		
Sbjct	131		HVRLSTHNVINTEDAPGGPYEIGTSGSCLNITNGKGGFFATMAWAVPKNK	ATNPLTIEVP			190
Query	705		YICTEEELQITVWGFHSDEETQMARLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDG				526
			YICTEEELQITVWGFHSDEETQMARLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDG				
Sbjct	191		YICTEEELQITVWGFHSDEETQMARLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDG				250
Query	525		GLPQSGRIVVDYVMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGKSKVIKGSPLIGEADCLHE				346
			GLPQSGRIVVDYVMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGKSKVIKGSPLIGEADCLHE				
Sbjct	251		GLPQSGRIVVDYVMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGKSKVIKGSPLIGEADCLHE				310
Query	345		KYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLE				166
			KYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLE				
Sbjct	311		KYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLE				370
Query	165		GGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNS		37		
			GGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNS				
Sbjct	371		GGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNS		413		

Figura 16. Allineamento della sequenza aminoacidica relativa all'estremità 5' della regione dell'emoagglutinina (Sbjct) con una sequenza di riferimento (Query), individuata dal software BLAST.

5 CONCLUSIONI

Il virus influenzale causa una malattia respiratoria acuta, che colpisce principalmente la fascia d'età 0-14 anni e che può portare a complicanze gravi e/o morte nelle persone ad alto rischio, quali anziani e pazienti sottoposti a terapie immunosoppressive.

La vaccinazione antinfluenzale è un'importante misura di protezione per sé stessi e per chi sta attorno, riducendo la probabilità di sviluppo di complicanze e riducendo il carico dell'assistenza sanitaria. Grazie alla rilevazione delle sindromi simil-influenzali, attuata dalla sorveglianza integrata dell'influenza (Influnet) con il contributo dei Medici di Medicina Generale (MMG), dei Pediatri di Libera Scelta (PLS), di altri referenti presso le ASL e le Regioni e della rete di Laboratori di riferimento regionali, è possibile monitorare la circolazione dei diversi tipi e sottotipi virali. Queste informazioni sono fondamentali per l'aggiornamento dei vaccini da utilizzare nella successiva stagione influenzale.

In particolare, nella stagione influenzale 2022-2023 in Italia, il 79,5% dei casi è risultato positivo per il virus di tipo A e il 20,5% per il virus di tipo B. Tra questi ultimi, la circolazione è esclusivamente di virus appartenenti al lineaggio Victoria e nello specifico al *sub-clade* V1A.3a.2; all'interno di questo sono individuati anche altri *clusters*, caratterizzati da alcuni cambiamenti aminoacidici rispetto al ceppo vaccinale B/Austria/1359417/2021, a cui appartiene anche il campione analizzato in questo tirocinio.

In conclusione, la sorveglianza virologica, l'isolamento e la caratterizzazione dei virus circolanti è estremamente importante per l'aggiornamento dei vaccini da utilizzare nella stagione successiva e per testare l'attività antivirale di nuove molecole.

6 BIBLIOGRAFIA

Krammer F, Smith G.J.D, Fourchier R.A.M, Peiris M, Kedzierska K, Doherty P.C, Palese P, Shaw M.L, Treanor J, Webster R.G e Garcia-Sastre A. 2018. Influenza.

InfluNet. Istituto Superiore di Sanità.

Sorveglianza Virologica dell'Influenza. Rapporto N.24 del 5 maggio 2023, settimana 17/2023. NIC – Dipartimento di Malattie Infettive/DMI – Istituto Superiore di Sanità.

Sorveglianza Virologica dell'Influenza. Rapporto N.22 del 21 aprile 2023, settimana 17/2023. NIC – Dipartimento di Malattie Infettive/DMI – Istituto Superiore di Sanità.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini G.M. Principi di Microbiologia Medica, 3^a edizione.