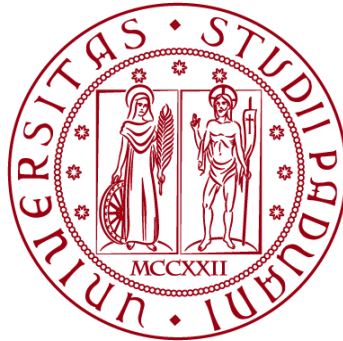


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

SCREENING MOLECOLARE PER IL VIRUS DELLA FEBBRE EMORRAGICA CRIMEA-CONGO ED ALTRI VIRUS TRASMESSI DA ZECHE IN ZECHE RACCOLTE IN SARDEGNA, ITALIA

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

**Co-tutor: Dott.ssa Silvia Fabi
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureando: YuanHang Guan

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. ABSTRACT	1
2. STATO DELL' ARTE (INTRODUZIONE)	2
2.1 VIRUS DELLA FEBBRE EMORRAGICA DI CRIMEA-CONGO	2
2.1.1 Trasmissione del CCHFV	4
2.1.2 Rilevamento del CCHFV	5
3. MATERIALI E METODI	6
3.1 CAMPIONI BIOLOGICI	6
3.2 ESTRAZIONE DELL' ACIDO NUCLEICO DA CAMPIONI DI ZECHE	6
3.3 REAL-TIME PCR	6
3.4 RETROTRASCRIZIONE	7
3.5 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA	8
3.6 ANALISI ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO	9
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	10
4.1 RICERCA DEL CCHFV MEDIANTE REAL-TIME PCR	10
4.2 SCREENING DELLE ZECHE MEDIANTE PCR END-POINT	11
4.3 DISCUSSIONE	12
5. BIBLIOGRAFIA	13

1. ABSTRACT

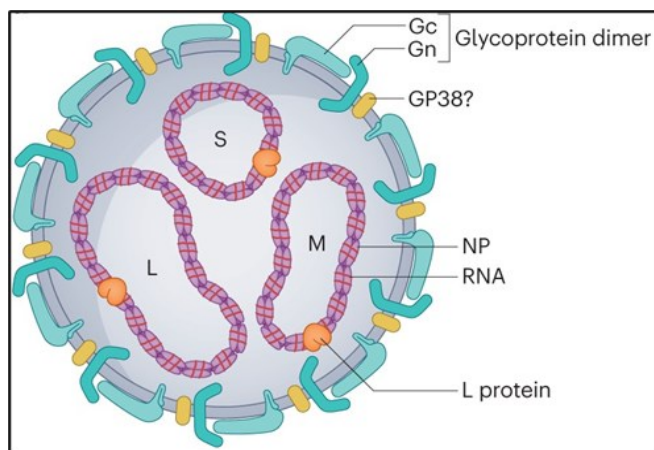
Le zecche sono importanti vettori di molti agenti patogeni, tra cui una serie di arbovirus indicati come virus trasmessi da zecche (Tick-borne viruses - TBVs). I cambiamenti climatici stanno favorendo la diffusione di zecche e TBVs, come il virus della febbre emorragica di Crimea-Congo (CCHFV) che nell'ultimo decennio ha colonizzato l'Europa sudoccidentale come evidenziato dai casi umani riportati in Spagna e dalla circolazione del virus negli animali in Corsica (Francia). La Sardegna, isola vicina alla Corsica, è un luogo di intenso passaggio di uccelli migratori rappresentando quindi un sito potenzialmente esposto al rischio di introduzione di zecche infettate dal CCHFV o altri TBVs. Lo scopo di questo studio è quello di determinare la presenza del CCHFV ed eventualmente di altri TBVs in zecche raccolte in Sardegna da animali da allevamento o selvatici, dall'uomo o dall'ambiente. Ogni campione è stato analizzato in singolo e testato per la presenza del CCHFV mediante Real-Time RT-PCR oppure degli Orthonairovirus attraverso PCR end-point.

2. STATO DELL' ARTE (INTRODUZIONE)

2.1 VIRUS DELLA FEBBRE EMORRAGICA DI CRIMEA-CONGO

Il virus della febbre emorragica di Crimea-Congo (CCHFV) è un virus appartenente all'ordine *Bunyvirales*, nello specifico alla famiglia *Nairoviridae* e al genere *Orthonairovirus*. Il virus presenta l'envelope e un genoma segmentato a RNA a senso negativo. Il genoma del CCFHV consiste di tre segmenti nucleotidici S (small), M (medium), L (large) denominati in base al numero di nucleotidi costituenti ciascun segmento.

Figura 1. Morfologia della particella virale del CCHFV (Hawman, D.W., Feldmann, H. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. 2023)



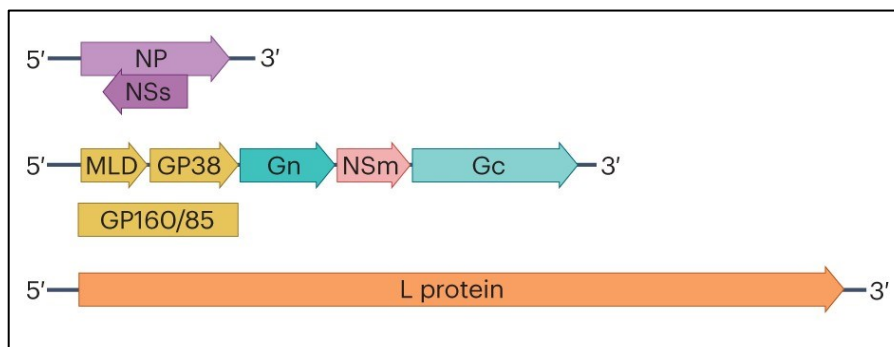
Il segmento genico S (1,6 kb) codifica per la nucleoproteina virale (NP) e una piccola proteina non strutturale (NSs). La NP interagisce con RNA genomico virale per formare il complesso ribonucleoproteico ed è dotata di attività endonucleasica. La NSs, in associazione con la NP, è in grado di modulare l'apoptosi della cellula ospite.

Il segmento M (5,4 kb) codifica per il precursore della glicoproteina virale (GPC) che è processato in senso proteolitico per ottenere le glicoproteine virali Gn e Gc, la glicoproteina GP160/85 e una media proteina non strutturale (NSm). La proteina GP 160/85 è ulteriormente processata in senso proteolitico per produrre un dominio simile alla mucina fortemente glicosilato (MLD) e la glicoproteina GP38. Le glicoproteine Gn e Gc sono coinvolte nel legame con il recettore cellulare, nella fusione pH-dipendente con la membrana della cellula ospite e nell'ingresso in essa.

La proteina GP160/85 è un importante fattore virale per il taglio proteolitico del precursore della glicoproteina Gc (Pre-Gc) e per l'incorporazione di Gc nei virioni. Il MLD ha la funzione di promuovere l'incorporazione delle glicoproteine nei virioni ma non è essenziale per l'infettività virale. La proteina GP38, invece, ha la funzione di promuovere l'assemblaggio del virione. Infine, la NSm è coinvolta nell'assemblaggio e nel rilascio dei virioni.

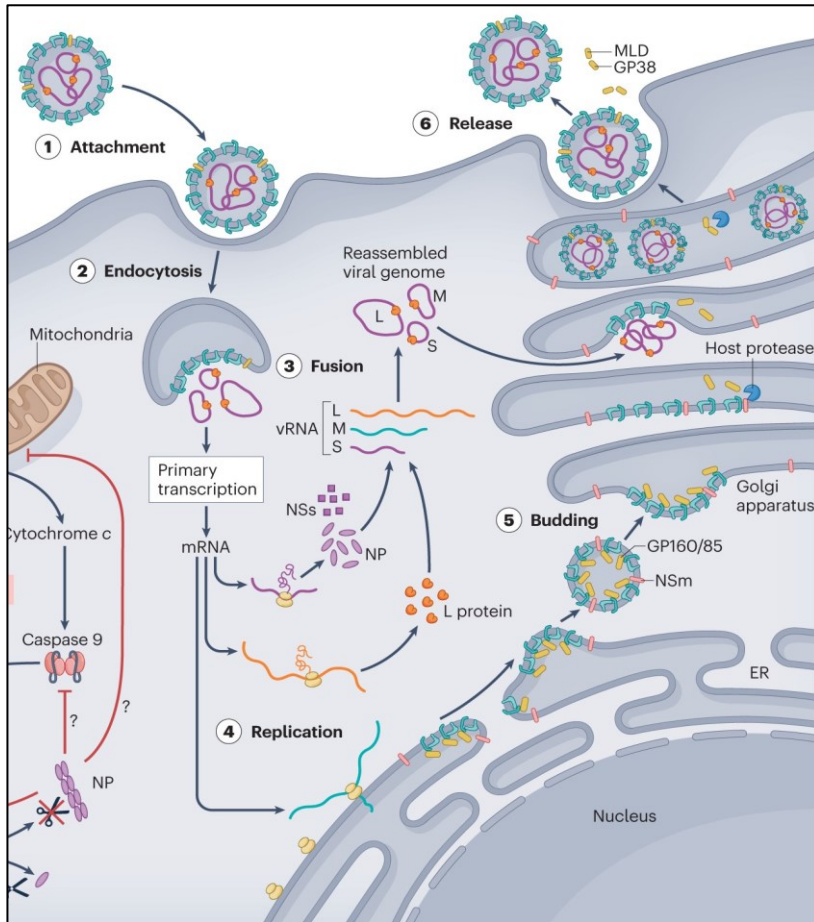
Il segmento L (12,1 kb) codifica per la proteina L che è la RNA polimerasi RNA dipendente virale dotata di un dominio proteasico OTU (ovarian tumor-type) all'N-terminale in grado di inibire la risposta immunitaria innata dell'ospite.

Figura 2. Organizzazione del genoma del CCHFV (Hawman, D.W., Feldmann, H. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. 2023)



Il ciclo virale inizia con l'endocitosi clatrina e pH dipendente del virus da parte della cellula ospite. Successivamente avviene la fusione dell'envelope virale con la membrana della vescicola di endocitosi e il genoma virale viene così liberato nel citoplasma. Nel citoplasma della cellula ospite l'RNA polimerasi RNA dipendente virale (RdRp), ovvero la proteina L, trascrive a partire dal genoma virale gli mRNA a senso positivo necessari alla traduzione di proteine virali. Oltre agli mRNA, la RdRp sintetizza anche RNA complementare a senso positivo (cRNA) che funge da copia per la sintesi dell'RNA genomico virale. Ai segmenti neosintetizzati di RNA genomico si legano la NP e la proteina L necessarie per avviare un nuovo ciclo replicativo. La GPC viene tradotta a livello del reticolo endoplasmico (RE) e durante il passaggio dal RE all'apparato di Golgi viene processato in senso proteolitico per produrre le glicoproteine Gc e Gn e altre proteine accessorie MLD, GP38 e NSm come sopra riportato. L'assemblaggio del virione avviene a livello dell'apparato di Golgi e il virione assemblato viene secreto con l'esocitosi ed è pronto a infettare nuove cellule.

Figura 3. Ciclo virale del CCHFV (Hawman, D.W., Feldmann, H. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. 2023)



2.1.1 Trasmissione del CCHFV

I principali vettori e serbatoi del CCHFV sono le zecche dell'ordine *Ixodidae* e in particolare quelle appartenenti al genere *Hyalomma*. Le zecche per sopravvivere e riprodursi devono consumare il pasto ematico su ospiti vertebrati e in questa fase il CCHFV e altri TBVs possono essere inoculati nell'ospite tramite la saliva della zecca e iniziare l'infezione. Prove sierologiche hanno dimostrato infezioni produttive del CCHFV in animali selvatici come roditori di piccole dimensioni, lepri, struzzi, bufali e rinoceronti e in animali da allevamento come tori e pecore. Il CCHFV può infettare anche l'uomo e tra tutte le specie infette solo gli esseri umani sviluppano una malattia sintomatica. Il virus può essere trasmesso all'uomo direttamente dal morso delle zecche infette e dal contatto con sangue o tessuti di animali viremici. La trasmissione del CCHFV tra gli esseri umani è possibile attraverso contatti sessuali o durante le operazioni mediche in cui è prodotto

aerosol o vi è contatto con fluidi corporei. La CCHF è una malattia molto diffusa e tradizionalmente è stata riportata nell'Europa Sud-orientale, in Africa, nel Medio-Oriente e in Oriente. Attualmente il trasporto di zecche da parte di uccelli migratori, il commercio globale e il cambiamento climatico stanno espandendo l'habitat delle zecche *Hyalomma* verso latitudini sempre più alte e di conseguenza si ha l'ampliamento dell'area geografica di diffusione del CCHFV. Casi di infezione umana sono stati segnalati in Spagna nell'ultimo decennio e la presenza del CCHFV in animali dall'allevamento è stata rilevata in Corsica (Francia). L'isola di Sardegna può rappresentare un potenziale punto di introduzione del CCHFV e di altri TBVs in Italia per la posizione geografica intermedia tra Corsica e le zone endemiche di diffusione del CCHFV in Africa e per l'intenso passaggio di uccelli migratori che possono trasportare zecche infettate dal virus.

2.1.2 Rilevamento del CCHFV

La malattia causata dalle infezioni del CCHFV è la febbre emorragica di Crimea-Congo (CCHF), malattia che può presentare una mortalità del 30% o superiore in alcune aree geografiche. Attualmente non sono disponibili vaccini o antivirali specifici approvati per il trattamento della CCHF. I sintomi della CCHF sono generalmente aspecifici nelle fasi iniziali: stati febbrili, cefalea e dolori muscolari, per cui una diagnostica rapida è necessaria per la gestione dei malati e per prendere misure preventive per impedire la diffusione del virus negli esseri umani e negli animali. Il campione di partenza per la ricerca del CCHFV è il sangue intero o il siero e la presenza del virus può essere rilevata da tecniche di diagnostica diretta o indiretta. Per quanto riguarda la diagnostica diretta la Real-Time RT-PCR basata sulla rilevazione dell'RNA virale è la tecnica di elezione per la diagnostica rapida del CCHFV. Sono disponibili anche test per rilevare la presenza della NP del CCHFV ma questi hanno una sensibilità minore rispetto al Real-Time PCR. Sono state sviluppate tecniche di diagnostica indiretta per il CCHFV basate su ELISA, ma i limiti di queste tecniche sono relativi al ritardo della produzione anticorpale rispetto all'infezione virale e ai possibili falsi negativi nei casi gravi della CCHF in cui si osserva l'assenza degli anticorpi. Attualmente sono disponibili pochi test basati sulla Real-Time PCR per i lineaggi del CCHFV di maggiore diffusione. Ma la grande variabilità genetica del CCHFV, data dall'elevata variabilità nucleotidica, dalla ricombinazione e dal riassortimento dei segmenti genici, può richiedere lo sviluppo di protocolli specifici per rilevare lineaggi del CCHFV diffusi in diverse aree geografiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI BIOLOGICI

Le zecche sono state raccolte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna nelle aree nord-occidentali, sud-occidentali e centrali dell'isola. Sono state raccolte 217 zecche provenienti da diversi distretti della Sardegna comprendenti aree di ampia diversità geologica, vegetazionale, paesaggistica e agro-ecologica. Le zecche sono state raccolte da animali domestici, mammiferi selvatici e vegetazioni. Tre zecche sono state raccolte anche dall'uomo. Ogni campione è stato inciso longitudinalmente e solo una metà della zecca è stata omogeneizzata mediante lisi meccanica dei tessuti.

3.2 ESTRAZIONE DELL'ACIDO NUCLEICO DA CAMPIONI DI ZECCHE

L'acido nucleico dei campioni di zecche è stato estratto con l'utilizzo del kit Maxwell® CSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit. Il kit si basa sull'impiego di particelle paramagnetiche che fungono da fase solida mobile per la cattura, il lavaggio e la purificazione dell'acido nucleico. In particolare, l'estrazione dell'acido nucleico richiede la preparazione della soluzione di lisi composta da 200 µL di tampone di lisi e da 20 µL di soluzione di proteinasi K per 200 µL di campione. Segue l'incubazione a 56°C per 10 minuti e si procede con l'estrazione secondo le istruzioni fornite del produttore del kit.

3.3 REAL-TIME PCR

La presenza del genoma del CCHFV nell'estratto viene valutata impiegando "One-Step Real-Time PCR" che comprende due reazioni successive: la trascrizione inversa dell'RNA in una copia del DNA complementare (cDNA) e l'amplificazione del cDNA con la reazione a catena della polimerasi a tempo reale (Real-Time PCR) che impiega primers specifici per la sequenza del CCHFV da amplificare e sonde associate a fluorofori che permettono di visualizzare in tempo reale l'andamento

della reazione. Le sequenze nucleotidiche dei primers e delle sonde sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Oligonucleotidi impiegati nella One-Step Real-Time RT-PCR

Primers (RT-PCR)	Sequenza nucleotidica
CCHFV Forward	5'-CAAGGGGTACCAAGAAAATGAAGAAGGC-3'
CCHFV Reverse	5'-GCCACAGGGATTGTTCCAAAGCAGAC-3'
Sonde (RT-PCR)	Sequenza nucleotidica
Sonda P1	5'- 6-FAM-TGTC AACACAGCAGGGTGCATGTAGAT-TAMRA-3'
P2	5'- 6-FAM-TGTAAGCACGGCACGGTGCATGTAAAT-TAMRA-3'
P3	5'- 6-FAM-ACTCCAATGAAGTGGGGGAAGAAGCT-TAMRA-3'

Per allestire la One-Step Real-Time PCR viene utilizzato il kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR, seguendo le indicazioni del fornitore. I reagenti impiegati per la preparazione di un singolo campione sono i seguenti: 6,25 µL di RT-PCR Buffer (2x); 2,32 µL di acqua MilliQ®; 0,93 µL del mix primers/sonde; 0,5 µL del mix di enzimi (25x) e 5 µL dell'RNA estratto in precedenza. Il volume totale è di 15 µL. L'amplificazione viene eseguita mediante l'impiego del termociclatore QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System. Si imposta il termociclatore nel modo seguente: 50°C per 10' (fase di retro-trascrizione), 95°C per 10' (inattivazione dell'enzima retro-trascrittasi e attivazione della Taq-polimerasi); 40 cicli di amplificazione PCR con alternanza di due fasi: 95°C per 15'' (denaturazione) e 60°C per 1' (appaiamento ed estensione dei primers). Al termine dell'amplificazione si analizzano le curve di amplificazione (Amplification Plot) e relativi Multicomponent Plot.

3.4 RETROTRASCRIZIONE

L'RNA estratto in precedenza viene retrotrascritto a cDNA mediante l'impiego del kit Hiscript® III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper). Il kit contiene 4x gDNA wiper

mix e 5x Hiscript III qRT SuperMix. In particolare, la 5x Hiscript III qRT SuperMix contiene l'enzima retro-trascrittasi HiScript III e i random esameri che fungono da primers per la retro-trascrittasi. Si allestisce in primo luogo la reazione per la rimozione del DNA genomico dall'acido nucleico estratto in precedenza impiegando i seguenti reagenti: 7 μL di acqua MilliQ[®], 4 μL di gDNA wiper mix e 5 μL di acido nucleico estratto. Segue l'incubazione a 42°C per 2 minuti. Successivamente si allestisce la reazione di retrotrascrizione aggiungendo ai reagenti precedentemente impiegati 4 μL di 5x Hiscript III qRT SuperMix. Segue l'incubazione a 37°C per 15 minuti e a 85°C per 5 secondi.

3.5 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati i primers validati per l'amplificazione di una sequenza conservata sul segmento S di alcune specie virali appartenenti al genere *Orthonairovirus* (Lambert e Lanciotti *et al.*, 2009). Nello specifico possono essere amplificate le sequenze sui genomi del CCHF, Hazara e Dugbe virus. Si riportano nella Tabella 2 i primers impiegati.

Tabella 2. Primers utilizzati per PCR end-point

Primers (PCR end-point)	Sequenza Nucleotidica
Nairo Forward	5'-TCTCAAAGAAACACGTGCCGC-3'
Nairo Reverse	5'-GTCCTTCCTCCACTTGWGRGCAGCCTGCTGGTA-3'

La reazione di PCR viene allestita utilizzando i seguenti reagenti: 33,5 μL di acqua MilliQ[®], 5 μL di cDNA, 5 μL di Buffer TransTaq[®] DNA Polymerase High Fidelity, 4 μL di dNTPs (2,5mM), 1 μL (10 μM) di primer forward, 1 μL (10 μM) di primer reverse e 0,5 μL di DNA-polimerasi termostabile TransTaq[®] High Fidelity (5U/ μL). Il volume totale è di 50 μL .

Si imposta il termociclatore nel modo seguente: 94°C per 5' (attivazione dell'enzima TransTaq[®] High Fidelity); 45 cicli di amplificazione con alternanza di tre fasi: 94°C per 30'' (fase di denaturazione), 60°C per 30'' (appaiamento di primers) e 72°C per 45'' (estensione di primers); 72°C per 7'' (elongazione finale).

3.6 ANALISI ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO

Per effettuare la corsa elettroforetica è stato preparato il gel di agarosio al 2% (p/v). L'agarosio è stato sciolto nel tampone tris-borato EDTA (TBE) che ha la duplice funzione di mantenere il pH della soluzione costante e di chelare gli ioni Mg²⁺ inibendo la funzione delle nucleasi. Al gel è stato addizionato il Nancy-520 DNA Gel Stain (Sigma-Aldrich®), un colorante in grado di intercalarsi nella doppia elica di DNA permettendone la visualizzazione dopo irradiazione con luce UV.

In ciascun pozzetto del gel sono caricati 15 µL del cDNA amplificato e 3 µL di Loading Dye 6X. Il Loading Dye attribuisce una colorazione al campione e aumenta la sua densità con i pregi di facilitarne l'entrata nel pozzetto e di permettere il controllo del fronte di migrazione durante la corsa elettroforetica.

Al fine di poter valutare la dimensione dell'amplificato viene utilizzato il marcatore di peso molecolare "Marker VIII" 250 µg/ml (Roche), le cui bande sono posizionate nel gel dall'alto verso il basso nel seguente ordine: 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 paia di basi (pb).

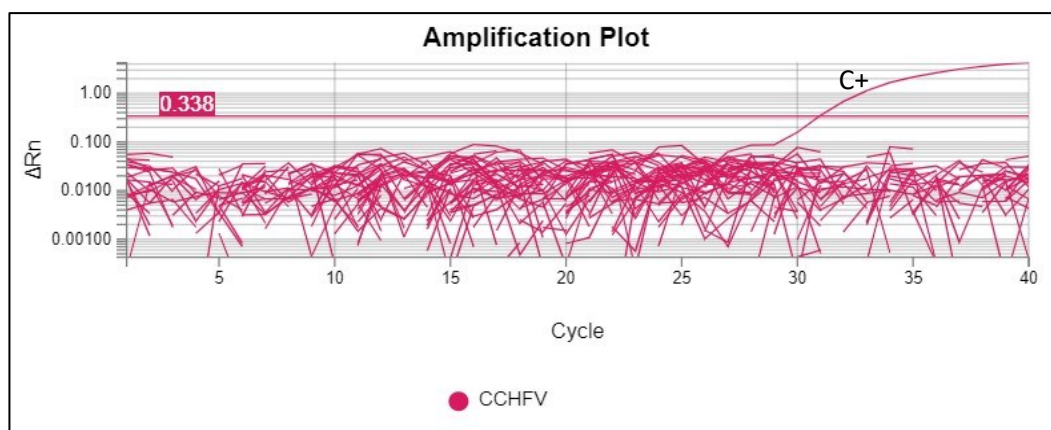
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I cambiamenti climatici stanno favorendo la diffusione di zecche, importanti vettori di molti patogeni quali il virus della febbre emorragica di Crimea-Congo (CCHFV) che nell'ultimo decennio ha colonizzato l'Europa sudoccidentale. Risulta pertanto di estrema rilevanza monitorare la circolazione di tali virus e lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di valutare la presenza del CCHFV in zecche raccolte in Sardegna. Considerando l'elevata variabilità delle sequenze genomiche del CCHFV, il virus è stato ricercato con un approccio specifico basato sulla Real-Time PCR sia con un approccio basato su PCR end-point sviluppata per il rilevamento di specie virali (tra cui CCHFV) appartenenti al genere *Orthonairovirus*.

4.1 RICERCA DEL CCHFV MEDIANTE REAL-TIME PCR

Nella prima fase è stata valutata mediante Real-Time PCR la presenza di RNA del CCHFV nei campioni precedentemente estratti. La presenza dell'RNA virale del CCHFV non è stata rilevata nei 217 campioni analizzati. Si riportano in seguito a titolo dimostrativo i grafici di amplificazione (Amplification Plot) relativi a 54 campioni. L'Amplification Plot correla il ΔRn (in ordinata), che è il rapporto tra le fluorescenze emesse dal fluoroforo reporter e il fluoroforo passivo di riferimento (ROX), con il numero dei cicli di amplificazione (in ascisse). Il valore soglia di ΔRn scelto per determinare l'avvenuta amplificazione è stato fissato a 0,338.

Figura 4. Ricerca mediante RT-PCR del CCHFV. C+: controllo positivo.



4.2 SCREENING DELLE ZECHE MEDIANTE PCR END-POINT

L'assenza del CCHFV, evidenziata dalla Real-Time PCR, non può escludere la presenza di altri virus trasmessi dalle zecche. Pertanto, su 24 campioni estratti è stata eseguita una PCR end-point che permette di rilevare la presenza di CCHF, Hazara e Dugbe virus appartenenti al genere *Orthonairovirus*. Gli amplificati ottenuti sono stati caricati in gel di agarosio in presenza di un opportuno marcatore di peso molecolare (Marker VIII) e di un controllo positivo di amplificazione pari a 400 pb.

Si riportano in seguito le immagini di due gel acquisite con lo strumento Alliance Q9 di Uvitec Ltd. Nel primo gel (Figura 5) è avvenuta la corsa elettroforetica dei campioni numerati da 1 a 12. Le bande a 400 pb nelle corsie dei campioni 2, 6 e 8 indicano la presenza degli *Orthonairovirus*. Nel secondo gel (Figura 6), invece, è avvenuta la corsa elettroforetica dei campioni numerati dal 13 a 24. Le bande a 400 pb nelle corsie dei campioni 13, 14 e 15 indicano la presenza degli *Orthonairovirus*. Alla luce dei risultati ottenuti vengono sottoposti al sequenziamento di Sanger i campioni risultati positivi.

Figura 5: Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR. Corsie da 1 a 12: amplificati dei campioni da 1 a 12. Corsia B: controllo negativo PCR. Corsia C+: controllo positivo. Corsia MVIII: Marker VIII (1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 pb).

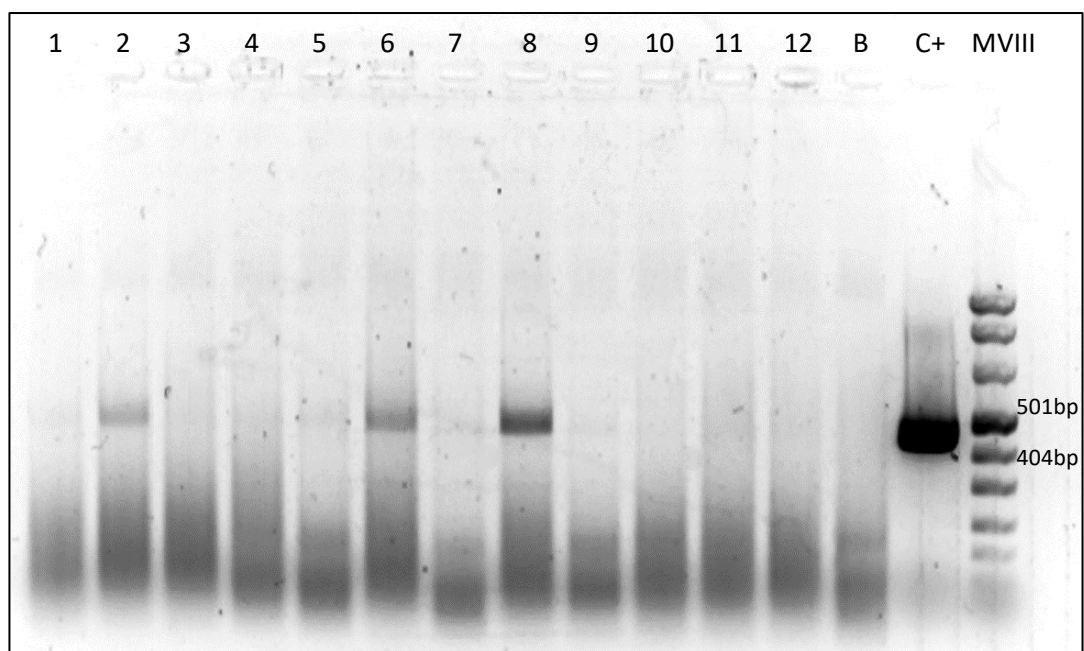
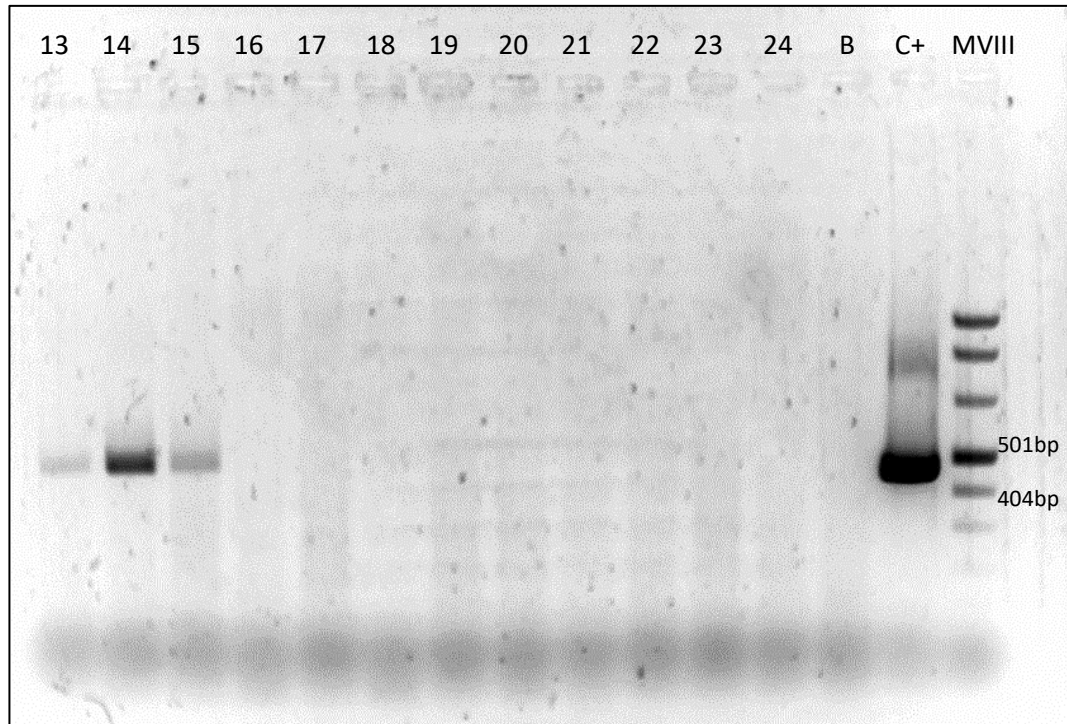


Figura 6: Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR. Corsie da 13 a 24: amplificati PCR dei campioni da 13 a 24. Corsia B: controllo negativo PCR. Corsia C+: controllo positivo. Corsia MVIII: Marker VIII (1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 pb).



4.3 DISCUSSIONE

In conclusione, nel presente lavoro di tesi sono stati estratti mediante piattaforma automatizzata gli acidi nucleici di 217 campioni di zecche provenienti da diversi distretti della Sardegna e sono stati sottoposti ad analisi molecolari. In particolare, per rilevare la presenza del CCHFV è stato impiegato un approccio di Real-Time PCR che ha evidenziato l'assenza delle sequenze genomiche del virus. Successivamente, 24 campioni sono stati sottoposti alla PCR end-point per lo screening degli Orthonairovirus. Dei campioni analizzati sei sono risultati positivi e sono sottoposti al sequenziamento di Sanger al fine di identificare le specie degli Orthonairovirus. A tutt'oggi i risultati delle sequenze non sono ancora stati elaborati.

Si rende comunque necessario continuare l'attività di sorveglianza nella regione Sardegna per la ricerca del CCHFV e di altri TBVs di interesse clinico. In particolare, l'aumento della numerosità dei campioni sottoposti all'analisi molecolare è di importante avallo nell'elaborazione di un quadro più completo sull'epidemiologia relativa ai TBVs che possono dare infezioni sintomatologiche sull'essere umano.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Hawman, D.W., Feldmann, H. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Nat Rev Microbiol.* 2023
2. Zivcec M, Scholte FE, Spiropoulou CF, Spengler JR, Bergeron É. Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses.* 2016
3. Freitas, N. et al. The interplays between Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) M segment-encoded accessory proteins and structural proteins promote virus assembly and infectivity. *PLoS Pathog.* 2020
4. Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol.* 2009