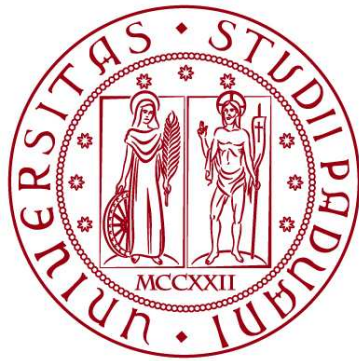


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

ELABORATO DI LAUREA

**Sorveglianza virologica della stagione
Influenzale 2022-2023 nella regione Veneto**

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

**Co-Tutor: Dott. Giuseppe Di Pietra
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureando: Alessandro Frattarolo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1.ABSTRACT	1
2.INTRODUZIONE	2
2.1 Influenza Virus.....	2
2.2 Ciclo replicativo.....	3
2.3 Sorveglianza.....	4
2.4 Diagnostica.....	5
3.MATERIALI E METODI	6
3.1 Materiali.....	6
3.2 Metodi.....	6
3.2.1 Estrazione.....	6
3.2.2 Amplificazione tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR).....	6
3.2.3 Elettroforesi su gel d'agarosio.....	7
3.2.4 Sequenziamento.....	7
4.RISULTATI E DISCUSSIONE	9
4.1 Ottenimento amplificati della regione HA.....	10
4.2 Corsa elettroforetica degli amplificati della regione HA.....	10
4.3 Purificazione degli amplificati e sequenziamento di Sanger.....	11
4.4 Analisi filogenetica dei campioni di Influenza.....	12
5. CONCLUSIONI	13
6.BIBLIOGRAFIA	14

1.ABSTRACT

Il virus dell'Influenza è uno dei patogeni più diffusi nella popolazione umana, causando malattie respiratorie sotto forma di epidemie annuali o anche pandemie. In genere il decorso della malattia e la fase di recupero sono di breve durata per le persone sane, mentre per individui fragili o con patologie pregresse possono portare a complicazioni che necessitano il ricovero ospedaliero e in alcuni casi portano alla morte. La sorveglianza virologica coordinata a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed effettuata a livello regionale dal Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedale-Università Padova, ha lo scopo di monitorare e caratterizzare le varianti Influenzali circolanti e valutarne l'omologia antigenica rispetto ai ceppi presenti nei vaccini, contribuendo ad aggiornare la composizione del vaccino per la stagione successiva. Pertanto, nell'ambito del tirocinio sono stati identificati mediante metodi molecolari, a partire da tamponi naso-faringei, tipi e sottotipi Influenzali circolanti nella regione Veneto nel corso della stagione Influenzale 2022-2023. Sono state inoltre, per un numero selezionato di campioni, determinate le sequenze della regione dell'emoagglutinina (HA), al fine di contribuire all'analisi filogenetica dei virus circolanti nella stagione 2022/2023.

2.INTRODUZIONE

2.1 Influenza Virus

Il virus dell'Influenza appartiene alla famiglia Orthomyxoviridae, è un virus pleomorfo ma normalmente è di forma sferica con diametro di 100-150nm, presenta anche un envelope lipidico in cui sono inserite le glicoproteine emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA) e la proteina M2 necessarie al virus per effettuare il processo replicativo. Il genoma virale è composto da 8 segmenti di RNA a singolo filamento a polarità negativa per i ceppi A e B e 7 per il ceppo C. Ogni segmento è associato ad una nucleoproteina formando una serie di ribonucleoproteine a simmetria elicoidale. Il virus dell'Influenza, nonostante sia un virus a RNA, effettua la replicazione nel nucleo della cellula ospite invece che nel citoplasma. Il genoma del virus codifica 11 proteine di cui 8 faranno parte dei virioni neogenerati. [1]

Strutturalmente il virione è costituito da un envelope derivato dalla cellula ospite che viene ulteriormente rafforzato dalla proteina di matrice M1, presenta le glicoproteine H ed N che sono i determinanti antigenici e anche la proteina M2 che è un piccolo canale ionico che permette l'ingresso selettivo di ioni per diminuire il pH interno in modo da facilitare il distacco delle ribonucleoproteine dalla matrice. All'interno del virione si trovano le 8 ribonucleoproteine che presentano su una delle estremità PB1, PB2 e PA, ovvero le 3 componenti della polimerasi virale. Durante la replicazione vengono espresse varie proteine: NS1 permette l'evasione immunitaria, NS2 esporta dal nucleo della cellula ospite le ribonucleoproteine dopo la replicazione, in alcuni ceppi viene espressa anche PB1-F2, generata dopo un evento di frameshift da PB1, che induce l'apoptosi della cellula ospite. [2]

Non tutti i tipi di virus Influenzali sono in grado di infettare l'uomo, come ad esempio il tipo D. I virus Influenzali con tropismo per l'uomo sono classificati in base alle caratteristiche delle proteine M1, M2 e NP. I tipi noti al momento sono A, B e C. Il virus di tipo A sono patogeni per l'uomo e per molte altre specie animali e causano patologie più gravi rispetto agli altri tipi, sono a loro volta suddivisi in sottocategorie in base alla struttura degli antigeni di superficie. Sono noti 16 sottotipi dell'emoagglutinina e 9 per la neuraminidasi. I virus di tipo B sono patogeni con tropismo specifico per l'uomo e sono divisi in 2 lineaggi: il lineaggio B/Yamagata e il lineaggio B/Victoria. La differenziazione di questi due ceppi è avvenuta nel 1980 circa. Infine i virus di tipo C sono anch'essi con tropismo specifico per l'uomo sebbene siano poco rilevanti rispetto ai tipi A e B. [3]

L'ampia diffusione del virus dell'Influenza è dovuta alla sua instabilità genetica che si manifesta con i fenomeni di antigenic drift e antigenic shift. L'antigenic drift è un processo lento e graduale che riguarda tutti i tipi e sottotipi e si verifica con l'accumulo di tante piccole mutazioni nelle sequenze codificanti l'emoagglutinina e la neuraminidasi durante la replicazione del genoma ed è il fenomeno alla base delle epidemie stagionali. L'antigenic shift è un processo improvviso, raro e non

prevedibile che riguarda solo i virus di tipo A. In questo caso avviene una modifica radicale dei geni codificanti emoagglutinina e neuroaminidasi, tanto da portare alla nascita di nuovi sottotipi virali e all'insorgenza di pandemie. Il processo avviene per riassortimento genetico tra virus umani o tra un virus umano e uno animale in caso di co-infezione della stessa cellula e in particolare in questo secondo caso è possibile che l'antigenic shift provochi un salto di specie. [4]

Considerando quindi la varietà di tipi, sottotipi e ceppi presenti in aggiunta alla possibilità di mutazioni e riassortimento genico si spiega la comparsa di virus sempre nuovi con caratteristiche diverse dai precedenti. Pertanto vi è la necessità di effettuare studi per delineare delle misure di sicurezza in modo da contenere i danni verso la popolazione umana. [5]

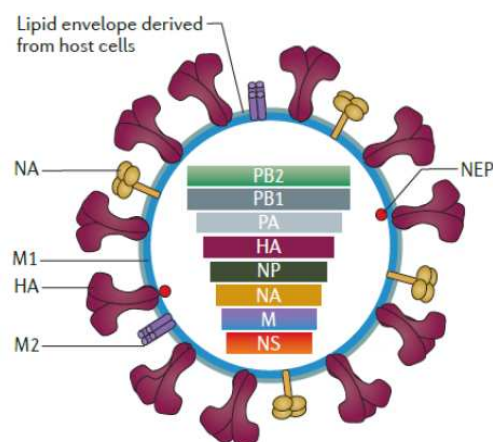


Figura 1: Struttura virione [6]

2.2 Ciclo replicativo

Il tropismo del virus è determinato dalla presenza sulla superficie della cellula di acido sialico, uno zucchero presente in molte proteine glicosilate per proteggerle dall'azione delle proteasi e, sulla superficie delle membrane, serve a trattenere più acqua. In genere nelle proteine glicosilate l'acido sialico è l'ultimo zucchero della catena e può legarsi al penultimo con due legami: alfa 2-3 che lega il carbonio 2 dell'acido sialico col carbonio 3 del galattosio e alfa 2-6 che lega invece il carbonio 2 con il carbonio 6. Il tipo di legame dipende dalla specie ed è fondamentale per il tropismo virale dato che il primo legame è tipico di cellule delle vie respiratorie umane, mentre il secondo viene riconosciuto da ceppi aviari. L'ingresso del virus nella cellula avviene per fusione acido-catalizzata. L'emoagglutinina riconosce e lega l'acido sialico esposto, entrando nella cellula tramite endocitosi mediata da recettore. L'endosoma formato si sposta verso il nucleo mentre il pH all'interno diminuisce in modo da permettere il cambio di conformazione dell'emoagglutinina che espone così i peptidi di fusione che permettono la fusione tra la membrana endosomiale e il virione. A questo punto avviene la dissociazione delle ribonucleoproteine dalla

proteina M1, le quali poi migrano verso il nucleo. Questo processo avviene per diminuzione del pH del virione grazie al canale M2. Dopo il rilascio del genoma virale nel citoplasma esso raggiunge il nucleo dove avviene la replicazione grazie alla presenza delle componenti della RNA polimerasi sulle ribonucleoproteine dato che la RNA polimerasi cellulare non è RNA-dipendente. I segmenti vengono replicati e poi trasferiti nel citoplasma dove si assemblano alle componenti della polimerasi e alla nucleoproteina NP, formando nuovamente le ribonucleoproteine di partenza. Le proteine del virione vengono prodotte dai ribosomi cellulari e in seguito si posizionano all'interno della membrana plasmatica, in particolare nelle cosiddette zattere lipidiche, ovvero zone della membrana plasmatica ricche di colesterolo e sfingolipidi dove poi avverrà l'assemblamento del virione. A questo punto entra in gioco la proteina neuraminidasi che taglia l'acido sialico sulla superficie della cellula per impedire al virione appena formato di invadere nuovamente la stessa cellula. [7]

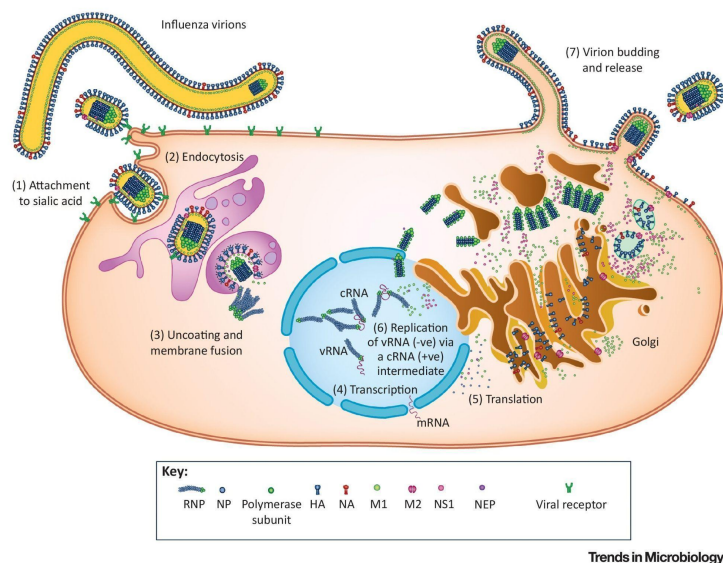


Figura 2: Ciclo replicativo [8]

2.3 Sorveglianza

Secondo le stime del Centro Europeo per il Controllo Malattie (ECDC) in Europa sono registrati ogni anno da 4 a 50 milioni di pazienti sintomatici per il virus dell'Influenza di cui dai 15000 ai 70000 muoiono per complicazioni causate dalla malattia, sebbene il 90% dei decessi riguarda individui fragili o over 65. [9] In Italia è attiva la rete INFLUNET dalla stagione 1999/2000. Questa rete di sorveglianza coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità è divisa in sorveglianza epidemiologica per determinare inizio, durata ed intensità dell'epidemia stagionale e nella sorveglianza virologica per il monitoraggio della circolazione dei diversi tipi e sottotipi di virus influenzali e la loro caratterizzazione per valutare l'efficacia del programma di vaccinazione e per mantenere aggiornato il vaccino. Viene inoltre monitorato l'andamento delle forme più gravi, ovvero quelle che prevedono ricoveri in terapia intensiva. La continua sorveglianza permette di conoscere i ceppi influenzali circolanti nella stagione corrente in modo da formulare dei vaccini il più mirati

possibile. Dai campioni raccolti nella stagione 2022-2023 si riscontra una predominanza del tipo A, in particolare dei ceppi H3 (il più rappresentato) e H1N1-pdm09 nella prima metà di stagione, mentre nella seconda metà è predominante il tipo B/Victoria. [10]

A causa della velocità di mutazione del virus è necessario ogni anno aggiornare la composizione dei vaccini antinfluenzali con i ceppi più recenti affinché la protezione vaccinale rimanga ottimale. La composizione del vaccino quadrivalente antinfluenzale raccomandata dall'OMS per la stagione 2022/2023 è la seguente:

- A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09-like virus;
- A/Darwin/9/2021 (H3N2)-like virus;
- B/Austria/1359417/2021-like virus (lineaggio B/Victoria);
- B/Phuket/3073/2013-like virus (lineaggio B/Yamagata).

Per i vaccini trivalenti invece è escluso il ceppo B/Phuket/3073/2013-like virus (lineaggio B/Yamagata). [11]

2.4 Diagnostica

La diagnosi di un'infezione da virus influenzale viene effettuata tramite l'analisi di campioni clinici quali: tamponi naso-faringei, tamponi tracheali, lavaggi bronchiali, biopsie polmonari. I test diagnostici disponibili per il rilevamento dei virus dell'influenza nei campioni respiratori includono test di rilevamento dell'antigene (inclusi test diagnostici rapidi per l'influenza e test di immunofluorescenza) e approcci molecolari (inclusi test molecolari rapidi, RT-PCR e altri test di amplificazione degli acidi nucleici). La coltura virale è importante per scopi di salute pubblica, ma non fornisce risultati tempestivi per la gestione clinica immediata. Tra gli approcci molecolari la RT-PCR è utilizzata come metodo rapido e sensibile per la rilevazione dei virus influenzali sia nei campioni clinici che negli isolati. In particolare, i primers e le sonde vengono disegnate sul gene della matrice per la rilevazione dell'influenza di tipo A e di tipo B mentre per la determinazione del sottotipo A e del lineage dei virus di tipo B viene amplificato il gene dell'emoagglutinina. [12]

La sensibilità e la specificità di qualsiasi test per i virus influenzali nei campioni respiratori può variare in base al tipo di metodo di analisi e test specifico utilizzato, il tempo dall'insorgenza della malattia alla raccolta del campione, la qualità del campione raccolto, la fonte respiratoria del campione, la manipolazione e trattamento del campione e il tempo dalla raccolta del campione al test. [13]

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Sono stati analizzati tamponi naso-faringei raccolti presso la U.O.C. Microbiologia e Virologia Azienda Ospedale - Università Padova nel corso della stagione influenzale 2022-2023.

3.2 Metodi

3.2.1 Estrazione

A partire dal tampone nasofaringeo viene eseguita l'estrazione degli acidi nucleici tramite il kit Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, seguendo le istruzioni fornite dal produttore. In particolare, dopo aver risospeso per 30-60 secondi il campione, si aggiungono 200µl di tampone di lisi e 20µl di Proteinasi K a 200µl del campione in una provetta da 2ml, si miscelano le provette tramite agitazione per 10-20 secondi ed infine si esegue l'incubazione a 56°C per 10 minuti in blocco termostato. Durante l'incubazione, si procede alla preparazione dell'estrattore. L'estrazione ha una durata di 30 minuti.

3.2.2 Amplificazione tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

Successivamente è necessario amplificare il materiale genetico estratto tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR). La PCR end-point usata in questo protocollo comprende al termine dei cicli di amplificazione una corsa elettroforetica su gel d'agarosio di un'aliquota di campione per verificare la buona riuscita dell'amplificazione e l'eventuale presenza di materiale genetico contaminante.

Dal momento che il materiale genetico di partenza è RNA viene prima effettuata una retrotrascrizione dell'estratto (*come descritto nel paragrafo 3.2.1*) virale in cDNA tramite l'enzima retrotrascrittasi. Dopodichè è possibile procedere con l'amplificazione tramite opportune coppie di oligonucleotidi (primers NAFUc e H3N2R109 per NA-5'; NARUc e N2F387 per NA-3'; primers H3A1R1 e H3A1F6 per HA-5'; HARUc e H3A1F3 per HA-3') (le sequenze non sono riportate perché sono di proprietà del CDC e devono essere esclusivamente utilizzate per la sorveglianza dell'influenza. CDC, Centers for Disease Control and Prevention Influenza Division, Atlanta, GA, USA), i deossinucleotidi e l'enzima Taq polimerasi, derivante dal batterio *Thermophilus aquaticus*. Sono infine aggiunti ioni magnesio, necessari per il corretto funzionamento della polimerasi. La PCR è una reazione divisa in 3 fasi che si ripetono per un numero definito di cicli: fase di denaturazione in cui si separano i filamenti complementari di DNA, ibridazione o annealing dove avviene l'associazione tra i filamenti di DNA denaturati con gli oligonucleotidi, estensione del primer che sintetizza un secondo filamento formando nuovamente la doppia elica.

La miscela di reazione prevede: 17.6µl di 2X Reaction Mix, 0.7µl di Primers concentrati a 10µM, 0.7µl di Taq polimerasi, 5µl di MgSO₄ e infine 6µl di campione

per un totale di 30µl. Tutti i reagenti sono del kit Invitrogen ONE Step PCR®. A questo punto le miscele di reazione vengono poste nel termociclatore impostato come segue: 50°C per 30 minuti per la fase di retrotrascrizione, 95°C per 5 minuti per inattivare la retrotrascrittasi e attivare la Taq polimerasi; a questo punto si effettuano 45 cicli di amplificazione (95°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 3 minuti), infine la reazione termina con una fase a 72°C per 5 minuti per la fase di estensione e in seguito la temperatura viene impostata a 4°C.

3.2.3 Elettroforesi su gel d'agarosio

L'elettroforesi degli amplificati viene eseguita in gel d'agarosio al 2% (p/v) in tampone TBE 1X (Tris-borato 0.009 M, EDTA 1mM, pH 8) addizionato di Gel Red (Biotium) intercalante fluorescente che permette di visualizzare gli acidi nucleici in seguito ad irradiazione con luce UV. In ogni pozzetto sono stati caricati 7µl di miscela di cui 5µl di amplificato e 2µl di Loading Dye (glicerolo 5% (v/v), blu di bromofenolo 0.15% (p/v), Xilene cianolo 0.02% (p/v), EDTA 0.002M) il quale favorisce l'ingresso del campione nel pozzetto e permette, inoltre, di controllare il fronte di migrazione della corsa. Infine, per poter analizzare le dimensioni dell'amplificato, è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare "Marker VIII" 250µg/mL (le bande sono così posizionate: 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 pb).

3.2.4 Sequenziamento

Prima della fase di sequenziamento è necessario purificare gli amplificati tramite il reagente Exosap® al fine di rimuovere i primers e i deossinucleotidi non incorporati. Ogni campione viene addizionato con 1.5µl di reagente ed inserito nel termociclatore impostato nel seguente modo: 37°C per 30 minuti, 80°C per 15 minuti.

Il sequenziamento utilizza il kit "Big dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystem) basato su una modifica del metodo ideato da Sanger. La tecnica si basa sull'utilizzo di 2', 3'- dideossinucleosidi trifosfato (ddNTP) che vengono incorporati in una catena nascente di DNA dall'enzima DNA polimerasi AmpliTaq®, attraverso i loro gruppi 5'-trifosfati, ma, essendo privi del gruppo 3'-OH, non possono essere uniti al deossinucleoside trifosfato (dNTP) successivo. Per ottenere la sequenza d'interesse, è necessario inserire nella reazione i seguenti componenti: DNA da sequenziare, primer complementare alla sequenza d'interesse, DNA polimerasi, ioni magnesio, i quattro deossinucleosidi trifosfato (dNTPs) e quattro 2', 3'- dideossinucleosidi trifosfato (ddNTPs), ognuno dei quali è coniugato a un fluoroforo differente per il riconoscimento. Durante la reazione si vengono a formare frammenti di dimensioni differenti, tutti complementari allo stampo, con la stessa estremità 5', ma che sono interrotti in punti diversi al 3'. Successivamente, i prodotti vengono denaturati e analizzati mediante gel elettroforesi dove migreranno in base alle dimensioni mentre la molecola fluorescente sul DNA verrà individuata usando un raggio laser e un rivelatore. Le informazioni ottenute dalle emissioni di fluorescenza vengono integrate e trasformate in picchi di colore diverso, ognuno dei

quali corrisponde alle 4 basi azotate in modo da poter ricostruire la sequenza di DNA stampo.

Prima del sequenziamento si devono preparare aliquote di primers con concentrazione 1 μ M. La miscela di reazione è composta da: 2 μ l di Buffer 2X, 1 μ l di Big Dye, 5 μ l di primers 1 μ M e 10 μ l di H₂O per un totale di 18 μ l a cui vengono aggiunti 5 μ l di PCR purificata. Il termociclatore viene impostato come segue: 96°C per 3 minuti per la fase di denaturazione, 30 cicli di amplificazione (96°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi, 60°C per 4 minuti) al termine dei quali i campioni vengono portati a 4°C. Successivamente, i campioni vengono purificati mediante l'utilizzo di colonne Centri-Sept Spin Columns® (Thermo Fisher Scientific) per rimuovere i reagenti non incorporati. L' elettroforesi capillare è stata eseguita con il sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem) che, in maniera automatica, elabora il Raw Data e restituisce la sequenza nucleotidica d'interesse.

4.RISULTATI E DISCUSSIONE

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia (Azienda Ospedale - Università Padova) appartiene alla rete di Laboratori di Riferimento Regionale (Rete InluNet) per le attività di diagnostica e caratterizzazione di virus influenzali ed è centro di riferimento per la Regione Veneto. La sorveglianza virologica è effettuata utilizzando protocolli di PCR Real-Time che permettono di determinare sia il tipo di influenza (A o B) che il sottotipo A o il lineaggio B.

La stagione Influenzale 2022/2023 in Italia è stata caratterizzata da una maggiore circolazione del virus di tipo A (circa 80%) e una minore presenza del virus di tipo B. I virus di tipo A appartengono ai ceppi H3N2 e H1N1-pdm09 che sono co-circolati durante tutta la stagione, tuttavia sono più numerosi i casi A/H3N2, soprattutto nelle ultime settimane dell'anno 2022 che sono state caratterizzate da una scarsa presenza del tipo B. La situazione è cambiata nelle ultime settimane durante le quali si è verificato un aumento dei casi di Influenza B/Victoria e un crollo dei casi del tipo A, mentre non si registrano casi di tipo B/Yamagata.

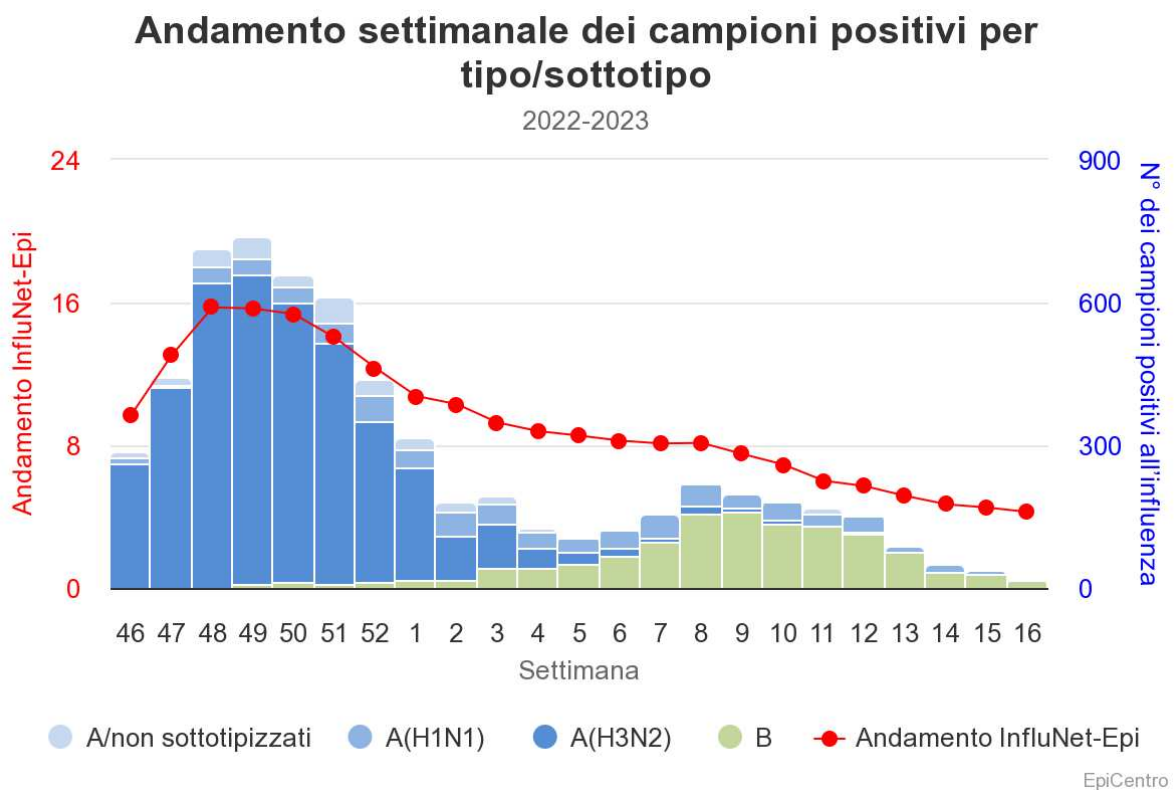


Figura 3: Distribuzione dei vari ceppi Influenzali in Italia [14]

Nell'ambito di questo tirocinio sono stati analizzati mediante sequenziamento 6 campioni (denominati con le lettere A-F) di Influenza A/H3N2 al fine di verificare la presenza di mutazioni a livello della regione HA, informazioni utili allo scopo di monitorare l'insorgenza di varianti.

4.1 Ottenimento amplificati della regione HA

L'RNA estratto tramite il kit Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (*come descritto nel paragrafo 3.2.1*) è stato successivamente amplificato utilizzando il kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Questo kit di amplificazione permette di effettuare una PCR "one-step", ovvero una reazione di PCR in cui avvengono sia la retrotrascrizione da RNA a cDNA che l'amplificazione, riducendo il rischio di contaminazioni.

La SuperScript™ III Reverse Transcriptase è una versione ingegnerizzata della M-MLV retrotrascrittasi al fine di ridurre l'attività della RNasi H e per una maggiore resistenza alle temperature elevate. L'enzima è in grado di sintetizzare cDNA in un intervallo di temperatura di 45–60°C, con maggiore specificità, resa di cDNA e numero di prodotti "full-length" rispetto ad altre retrotrascrittasi. Inoltre SuperScript™ III retrotrascrittasi non viene inibita in maniera significativa dalla presenza di tRNAs and rRNAs, pertanto può essere usata per sintetizzare cDNA da RNA totale.

La Platinum™ Taq DNA polimerasi è una Taq DNA polimerasi ricombinante complessata con un anticorpo che blocca l'attività della polimerasi a temperatura ambiente. L'attività viene ripristinata dopo la fase di denaturazione durante la PCR a 94°C, fornendo un "avvio a caldo" automatico nella PCR per una maggiore sensibilità, specificità e resa dal momento che la Taq polimerasi ha un'elevata efficienza e processività a temperature elevate. Per ogni campione sono state allestite 4 miscele di reazione contenenti i primers per l'amplificazione della regione HA ed NA (*come descritto nel paragrafo 3.2.2*).

4.2 Corsa elettroforetica degli amplificati della regione HA

Prima di procedere al sequenziamento gli amplificati della regione HA sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio per verificare se l'amplificazione fosse avvenuta correttamente. Per la corsa è stato utilizzato un gel d'agarosio al 2% (p/v) immerso in tampone TBE 1X, il quale è addizionato di Gel Red (Biotium). La durata della corsa è stata di circa 20 minuti ad un voltaggio di 120V. Successivamente il gel è stato analizzato con il software ImageJ (Bio-Rad).

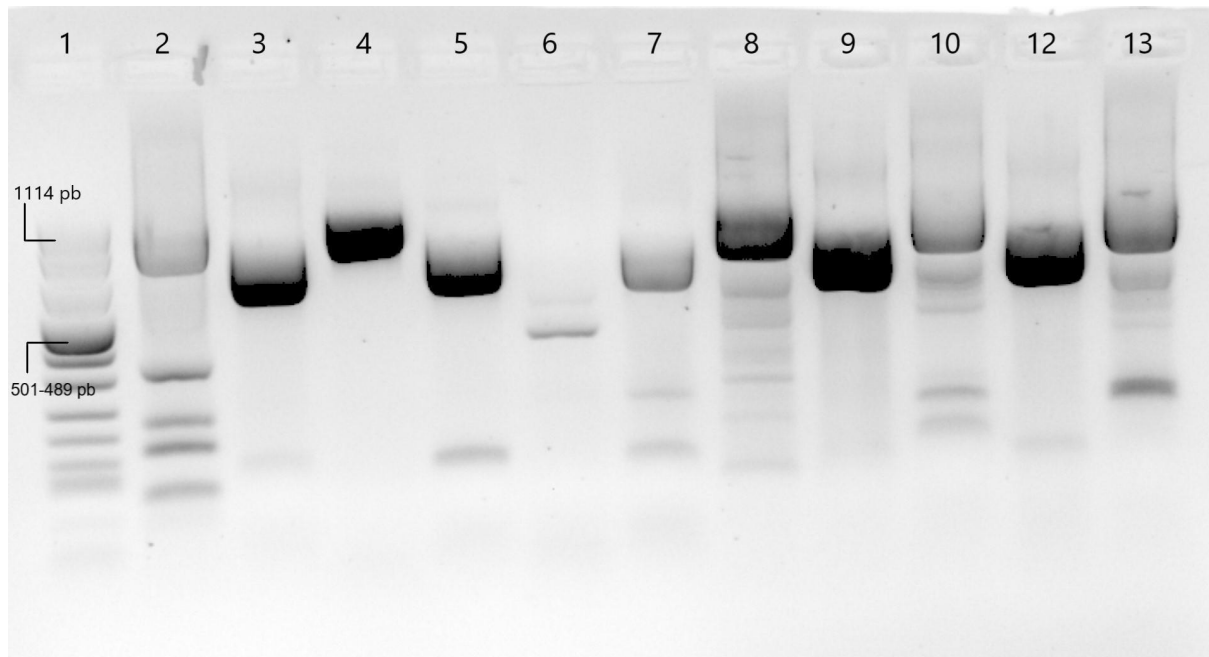


Figura 4: Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR

Nella figura 4 sono illustrati i risultati della corsa su gel d'agarosio dei prodotti di PCR. Nella corsia 1 è stato caricato il Marker VIII (Roche), nelle corsie 2 e 3 sono stati caricati gli amplificati corrispondenti rispettivamente alle regioni 5' e 3' della HA del campione A, nelle corsie 4 e 5 quelle del campione B, nelle corsie 6 e 7 quelle del campione C, nelle corsie 8 e 9 quelle del campione D, nelle corsie 10 e 11 quelle del campione E, nelle corsie 12 e 13 quelle del campione F. Dall'immagine si può notare che le bande delle corsie 2, 4, 8, 10 e 13 presentano il peso molecolare atteso di 1300pb, leggermente al di sopra dell'altezza della prima banda del Marker VIII di peso molecolare di 1114pb. Le bande delle corsie 3, 5, 7, 9 e 12 si trovano in corrispondenza della terza banda del Marker VIII di peso molecolare 692pb, inferiore rispetto al peso molecolare atteso di 1300pb, mentre nella corsia 6 non è presente l'amplificato per cui la reazione di PCR deve essere ripetuta.

4.3 Purificazione degli amplificati e sequenziamento di Sanger

Dopo la corsa elettroforetica si è proceduto alla purificazione degli amplificati della regione HA al fine di rimuovere i primers e i deossinucleotidi non incorporati durante l'amplificazione. Per questa procedura è stato utilizzato il reagente Exosap® (come descritto nel paragrafo 3.2.4).

Al termine della purificazione si è proceduto con l'allestimento della reazione di sequenziamento utilizzando il kit "Big dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystem) (come descritto nel paragrafo 3.2.4). A questo punto avviene un'ulteriore purificazione tramite colonne Centri-Sept Spin Columns® (Thermo Fisher Scientific) sempre per eliminare i reagenti non incorporati ed infine viene effettuato il sequenziamento tramite elettroforesi capillare eseguita dal

sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate tramite il programma Chromas. A scopo esemplificativo in Fig. 5 è riportato l'elettroferogramma relativo al sequenziamento della regione HA del Campione C.

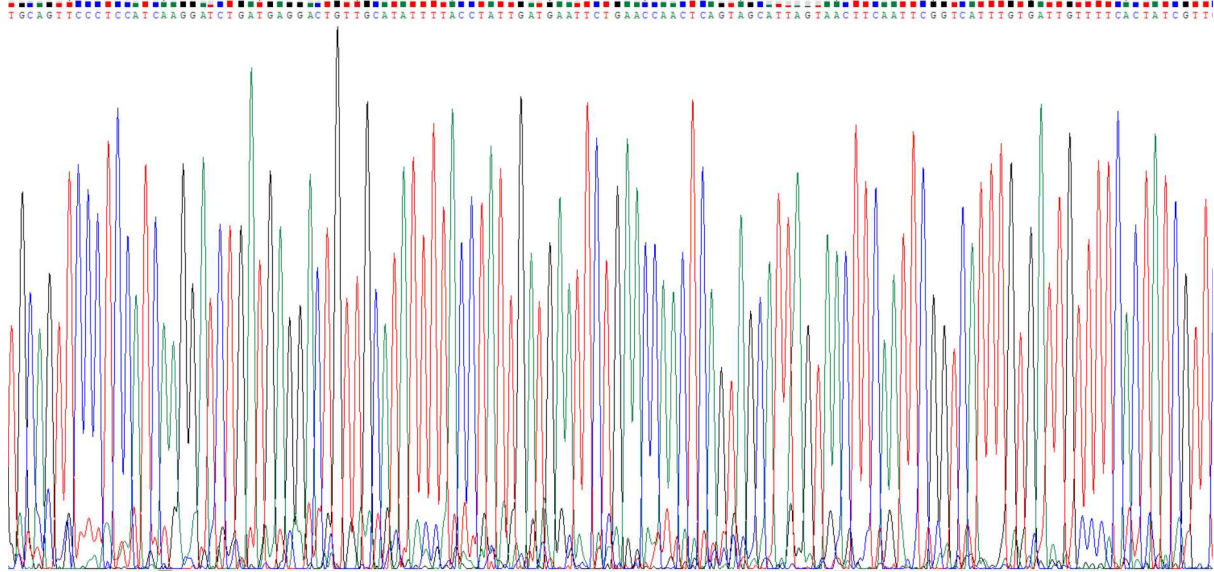


Figura 5: porzione di elettroferogramma della regione HA del campione C

4.4 Analisi filogenetica dei campioni di Influenza

Dopo il sequenziamento della regione HA dei campioni analizzati si è proceduto al confronto delle sequenze ottenute con il database “nucleotide collection (nr/nt)” tramite il software BLAST. I campioni analizzati appartengono al sub-clade 3C.2a1b.2a.2 (sottogruppo genetico a cui appartengono anche i ceppi vaccinali A/Darwin/6/2021 e A/Darwin/9/2021), definito dalle sostituzioni aminoacidiche Y159N, T160I, L164Q, G186D, D190N, F193S and Y195F in accordo con quanto circolato in Italia.

5. CONCLUSIONI

L'influenza è una malattia respiratoria e rappresenta un problema di Sanità Pubblica con una rilevante fonte di costi diretti e indiretti per la gestione dei casi e delle complicanze della malattia. Le persone anziane, i bambini, le donne in gravidanza e le persone con malattie croniche sono maggiormente soggetti a forme gravi, ma tutta la popolazione può sviluppare gravi complicanze, tra cui polmonite, miocardite ed encefalite, che possono portare al decesso. Pertanto, la continua sorveglianza epidemiologica e virologica, predisposta dal Ministero della Salute in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, consente di valutare la diffusione, l'intensità, la severità dei virus influenzali circolanti e l'efficacia delle misure messe in atto per prevenire la diffusione dell'influenza.

Le attività di monitoraggio virologico, nell'ambito delle quali si inserisce questo progetto di tesi, sono prioritariamente finalizzate alla caratterizzazione dei virus circolanti nel periodo invernale e alla valutazione del grado di omologia antigenica tra ceppi epidemici e vaccinali, contribuendo così all'aggiornamento annuale della composizione vaccinale.

6.BIBLIOGRAFIA

[10;11;14]FluNews - Italia - Rapporto della sorveglianza integrata dell'influenza - Stagione 2022/2023 - Istituto Superiore di Sanità.

[9;11]ECDC (European Center for Disease Control) - Seasonal Influenza Annual Epidemiological Report for 2022/2023.

[1;2;3;4;5;7]Flint, S.J., Principles of virology, molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses S.J. Flint ... [et al.]. Washington: ASM, 2015.

[1;2;3;4;5;7]Cann, Alan J; Campadelli-Fiume, Gabriella, Elementi di virologia molecolare Alan J. Cann edizione italiana a cura di Gabriella Campadelli-Fiume. Milano: CEA, 2006.

[8]Hutchinson EC. Influenza Virus. Trends Microbiol. 2018 Sep;26(9):809-810. doi: 10.1016/j.tim.2018.05.013. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29909041.

[6]Natures Reviews - Microbiology

[12;13]Rev. Med. Virol. 2002; 12: 375–389. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). Reviews in Medical Virology DOI: 10.1002/rmv.370

[12;13]Pan American Health Organization (PAHO) - Guidance for the implementation of the Influenza and SARS-CoV-2 Multiplex RT-PCR Assay into the influenza and COVID-19 integrated surveillance.