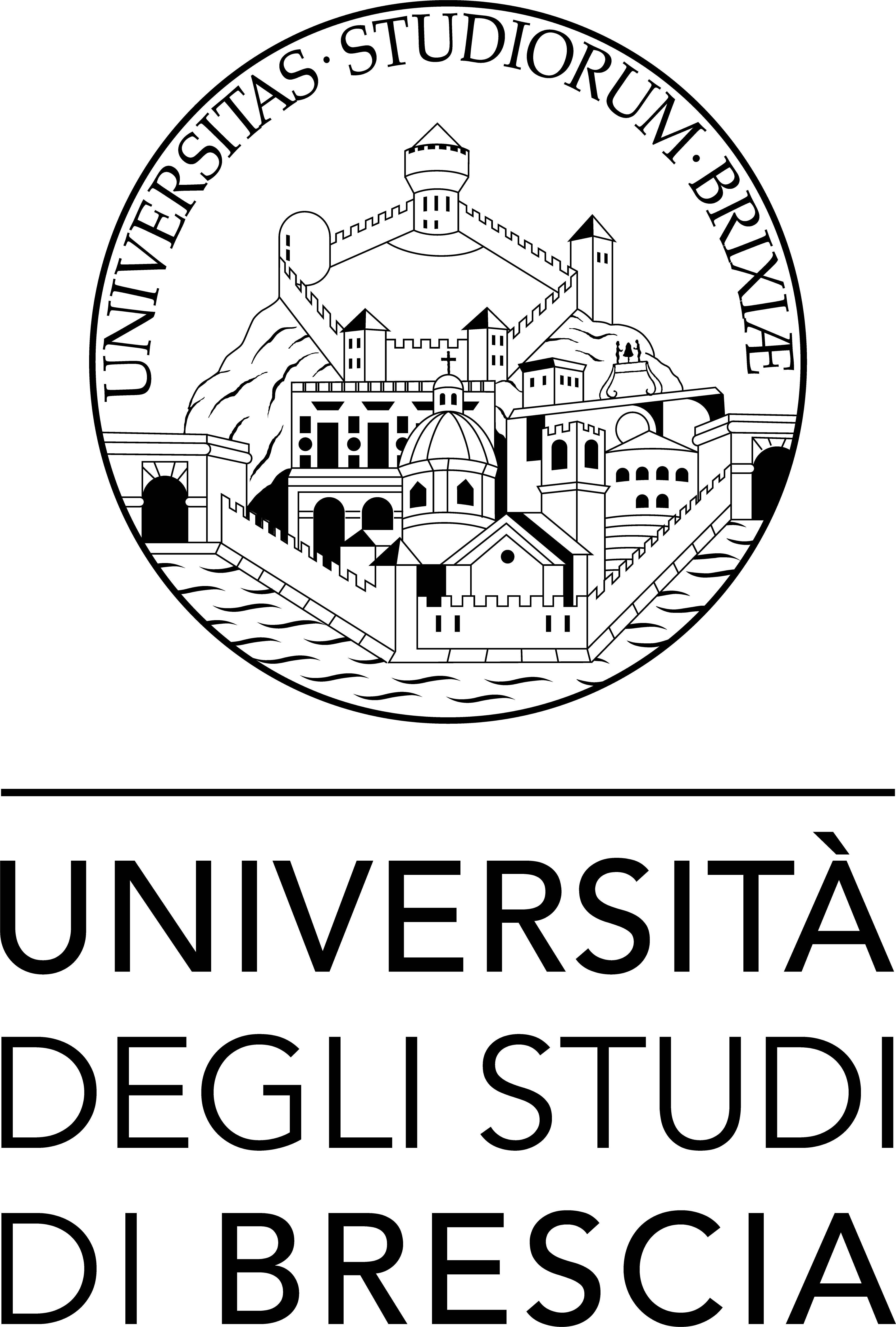
**

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Classe della Medicina diagnostica e di laboratorio (non medici)

**Caratterizzazione molecolare e variabilità degli enterovirus: monitoraggio e sorveglianza nelle acque reflue della regione Lombardia**

Prof.ssa Maria Antonia De Francesco; Dott.ssa Marina Nadia Losio

Firme

Specializzanda Lucia Mangeri

Matricola n. 730590

Anno accademico 2021-2022

*Alle mie care nonne Valentina e Melania*

**INDICE**

1 INTRODUZIONE 3

1.1 ENTEROVIRUS 3

1.1.1 Organizzazione strutturale e genomica 3

1.1.2 Classificazione genotipica 4

1.1.3 Patogenesi e immunità 5

1.1.4 Epidemiologia 5

1.1.5 Vie di trasmissione e fonti d’infezione 6

1.1.6 Prevenzione e trattamento 6

1.1.7 Manifestazioni cliniche 6

1.1.7.1 Infezioni da poliovirus 8

1.1.7.2 Infezioni da coxsackievirus ed echovirus 8

1.1.7.3 Altre malattie da enterovirus 9

1.1.8 Approcci diagnostici per il rilevamento 9

1.1.8.1 Esami clinico-chimici 9

1.1.8.2 Coltura 9

1.1.8.3 Test genetici e sierologici 9

1.1.9 Trattamento e prevenzione 10

1.2 SORVEGLIANZA ENTEROVIRUS IN REFLUI URBANI 10

2 Scopo DEL LAVORO 12

3 Materiali e metodi 13

3.1 Campionamento 13

3.2 Preparazione dei campioni 13

3.3 Estrazione dell’acido nucleico 15

3.4 Reazioni di one-step real-time RT-PCR 16

3.5 Sequenziamento 19

3.5.1 Amplificazione del target da sequenziare 20

3.5.1.1 Reazione di retrotrascrizione dell’RNA 20

3.5.1.2 Reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico mediante PCR 21

3.5.1.3 Reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico mediante seminested PCR 22

3.5.1.4 Analisi dei prodotti della reazione mediante elettroforesi capillare di screening 24

3.5.2 Genotipizzazione mediante metodica Sanger 25

3.5.2.1 Purificazione enzimatica del prodotto amplificato 25

3.5.2.2 Reazione di sequenza mediante marcatori fluorescenti (cycle sequencing) 26

3.5.2.3 Purificazione dei prodotti della reazione di sequenza 27

3.5.2.4 Elettroforesi capillare 27

3.5.2.5 Lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi 27

3.5.3 Next Generation Sequencing (NGS) metabarcoding su piattaforma Illumina MiSeq 28

3.5.3.1 Quantificazione dsDNA di partenza 29

3.5.3.2 Amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori 30

3.5.3.3 Purificazione dei prodotti di PCR 32

3.5.3.4 Preparazione delle librerie di sequenziamento 33

3.5.3.5 Corsa di sequenziamento 37

3.5.3.6 Valutazione dei parametri di corsa 38

3.5.3.7 Generazione del report di caratterizzazione 40

3.6 STATISTICA 42

4 Risultati 43

4.1 Reazioni di one-step real-time RT-PCR 43

4.2 Sequenziamento 43

5 discussione 44

6 conclusioni 45

7 Indice delle figure 46

8 Indice delle tabelle 47

9 Bibliografia 50

# INTRODUZIONE

Gli enterovirus (EV) sono virus ampiamente diffusi in tutto il mondo, che causano una vasta gamma di malattie sia nella popolazione dei bambini che negli adulti (Brouwer et al., 2021).

La conoscenza della prevalenza e della diffusione globale di tale virus è fondamentale per definire lo scenario epidemiologico e clinico delle malattie causate da enterovirus e permette di indirizzare e coordinare le decisioni terapeutiche.

## ENTEROVIRUS

Enterovirus (Figura 1) appartiene alla famiglia *Picornaviridae,* è un virus a RNA a singolo filamento, a polarità positiva, privo di envelope, di dimensioni pari a 25-30 nm, che presenta un capside icosaedrico (Tapparel et al., 2013).

Tale capside è resistente a condizioni ambientali avverse quali: i blandi trattamenti ai sistemi fognari, l’essicamento, il calore, l’impiego di detergenti e la presenza di acidi nel tratto gastrointestinale, caratteristica che ne consente la trasmissione oro-fecale.

Immagine che contiene bianco e nero, monocromatico

Descrizione generata automaticamente

Figura 1 - Poliovirus al microscopio elettronico (Details - Public Health Image Library - PHIL)

### Organizzazione strutturale e genomica

Enterovirus presenta un genoma a singolo filamento di RNA, di 7,2 – 8,4 kb, a polarità positiva, circondato da un capside icosaedrico. Tale capside presenta 12 vertici pentametrici, ciascuno dei quali è composto da 5 protomeri proteici, che a loro volta sono costituiti da 4 polipeptidi virali: VP1, VP2, VP3 e VP4. VP4 è essenziale per stabilizzare il virione ed è prodotto solo quando il genoma è incorporato nel virione (Kitamura et al., 1980).

Il genoma è simile ad un RNA messagero: presenta una sequenza di poli A (adenosina) all’estremità 3’ ed una proteina virale associata al genoma (VPg), legata all’estremità 5’, necessaria per l’incorporazione del genoma e per l’inizio della sintesi dell’RNA virale. Il genoma codifica una poliproteina, che una volta tagliata da proteasi di origine virale, dà origine a proteine enzimatiche e strutturali del virus (Kitamura et al., 1980).

### Classificazione genotipica

Esistono 90 sierotipi di enterovirus umani, classificati come:

* poliovirus tipi 1, 2 e 3;
* coxsackievirus A tipi da 1 a 22 e 24;
* coxsackievirus B tipi da 1 a 6;
* echovirus tipi da 1 a 9, da 11 a 27 e da 29 a 34;
* enterovirus da 68 a 71.

In Tabella 1 è riportata la classificazione degli enterovirus che infettano gli esseri umani, sulla base della specie di appartenenza.

Immagine che contiene testo, schermata, Carattere, numero

Descrizione generata automaticamente

Tabella 1 - Tipi di enterovirus umani per specie. CVA, coxsackievirus A; CVB, coxsackievirus B; EV, enterovirus; E, echovirus; PV, poliovirus (Brouwer et al., 2021)

### Patogenesi e immunità

La maggior parte delle infezioni da Enterovirus è generalmente asintomatica e nonostante abbia frequentemente origine nel tratto gastrointestinale, solo raramente causa malattie enteriche (Rovida et al., 2013).

Le malattie causate da enterovirus sono definite, proncipalmente, da differenze nel tropismo tissutale e nella capacità citolitica del virus. Il virus entra in contatto con l’organismo attraverso l’orofaringe, la mucosa intestinale o il tratto respiratorio superiore ed infetta il tessuto linfatico sottostante. I virioni sono resistenti al pH acido dello stomaco, alle proteasi ed alla bile. In assenza di anticorpi sierici, il virus si diffonde tramite viremia alle cellule dei tessuti bersaglio, quali: cute, muscolo, encefalo o meningi e ne consegue la determina malattia. La maggior parte degli enterovirus è citolitica e causa danni diretti alle cellule bersaglio.

Nel caso del poliovirus, esso infetta il muscolo scheletrico ed attraverso i nervi afferenti giunge al cervello; l’estensione della paralisi è determinata dal numero di neuroni danneggiati.

La presenza del virus nell’orofaringe può essere rilevata per un breve periodo di tempo, prima del manifestarsi dei sintomi, mentre l’eliminazione di enterovirus dal tratto intestinale può perdurare per più di 30 giorni, anche in presenza di una risposta umorale. Gli anticorpi costituiscono la risposta immunitaria più rilevante nei confronti degli enterovirus, essi infatti prevengono l’infezione nell’orofaringe e nel tratto gastrointestinale e la diffusione viremica ai tessuti bersaglio. L’immunità cellulo-mediata può essere implicata nella risoluzione della malattia e nella patogenesi.

### Epidemiologia

Gli enterovirus sono patogeni esclusivamente umani che si diffondono per via oro-fecale. La dispersione del virus nell’ambiente è favorita dall’eliminazione asintomatica, che può perdurare per più di 30 giorni. La contaminazione delle risorse idriche con scarichi fognari può causare epidemie da enterovirus. Tali episodi epidemici sono osservati in ambienti semi-chiusi quali scuole ed asili nido e prevalentemente durante le stagioni miti (estate ed autunno) (Jubelt, 2013; Jubelt and Lipton, 2014). I coxsackeievirus e gli echovirus possono diffondersi anche attraverso gli aerosol e causare infezioni del tratto respiratorio.

A seguito del successo dei programmi vaccinali antipolio, il poliovirus *wild type* è stato eradicato nella maggior parte dei Paesi del mondo, eccetto Nigeria, Afghanistan e Pakistan, dai quali la poliomielite paralitica si sta diffondendo ai Paesi limitrofi (Pellegrinelli et al., 2017). Sono, inoltre, stati riscontrati, casi di poliomielite associati alla mutazione di un dei tre ceppi dei virus vivi utilizzati per la vaccinazione, a causa del ripristino della sua neurovirulenza. Pertanto, è stato favorito l’impiego del vaccino antipolio inattivato.

Durante l’infanzia, l’infezione è più frequentemente asintomatica o causa una malattia molto lieve, come nel caso dell’infezione da coxsackie A. Mentre l’infezione da coxsackie B virus od alcuni echovirus, tra cui E11 è più pericolosa nei bambini.

### Vie di trasmissione e fonti d’infezione

Gli Entrovirus si moltiplicano nel tratto hypoteticalintestinale e sono trsmessi principalmente per via oro-fecale. La trasmissione del virus è facilitata la condioni igienico-sanitarie scarse e dal sovraffollamento (Jubelt, 2013; Jubelt and Lipton, 2014).

La fonte di infezione può essere rappresentata anche da ingestione di cibo o acqua contaminati, da contatto con fomiti infetti o per inalazione di aerosol infettivi.

### Prevenzione e trattamento

Per quanto riguarda la poliomelite, sono somministrati vaccini vivi per via orale (OPV trivalente) o vaccini trivalenti inattivati (IPV) (Thompson et al., 2021). Per gli altri enterovirus non esiste un vaccino; le buone condizioni igigeniche ne limitano la diffusione (Jubelt, 2013; Jubelt and Lipton, 2014).

### Manifestazioni cliniche

Le differenti manifestazioni cliniche dovute a enterovirus sono determiate da diversi fattori quali: il sierotipo virale, la dose infettante, il tropismo tissutale, la via di ingresso, l’età, il sesso e lo stato di salute del paziente. Il periodo di incubazione varia tra 1 e 35 giorni.

In Tabella 2 sono riportate le principali manifestazioni cliniche assocciate ad enterovirus.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Sindromi** | **Frequenza** | **Specie/tipi coinvolti più frequentemente** |
| Congiuntivite | Epidemica | Coxsackievirus A24 |
| (emorragica acuta) | Enterovirus 70 |
|  | Focolai | Poliovirus 1-3 |
| Meningite asettica | Coxsackievirus A2, 4, 7, 9 ed altri e B2-5 |
| ed encefalite | Echovirus 4, 6, 7, 9, 11, 16, 30 ed altri |
|  | Enterovirus 71 |
| Pleurodinia epidemica | Focolai | Coxsackievirus B1-6 |
| (malattia di Bornholm) |
| Malattie neonatali | Focolai | Coxsackievirus B |
| Echovirus |
| Enterovirus |
| Asintomatica | Frequente | Poliovirus |
| Coxsackievirus A e B |
| Echovirus |
| Enterovirus |
| Malattia mani-piedi-bocca | Comune | Coxsackievirus A6, 9, 16, ed altri e B2-5 |
| Enterovirus 71 |
| Erpangina | Comune | Coxsackievirus A2, 4-6, 8 e 10 e B3 ed altri |
| Malattia esantematica | Comune | Coxsackievirus A4, 6, 9 e 16 e B1 e 3-5 |
| (eruzione cutanea) | Echovirus 2, 4, 9, 11, 14, 16, 19 e 25 |
| Febbre indifferenziata | Comune | Poliovirus |
| Coxsackievirus A e B |
| Echovirus |
| Enterovirus |
| Malattie respiratorie | Comune | Poliovirus |
| Coxsackievirus A21 e 24 e B1 e 3-5 |
| Echovirus 4, 8, 9, 11, 20 ed altri |
| Enterovirus D68 |
| Miopericardite | Sporadica | Coxsackievirus A4 e 16 e B1-5 |
| Echovirus 9 |
| Paralisi | Sporadica | Poliovirus 1-3 |
| Coxsackievirus A7, 9, 24 ed altri |
| Echovirus 4, 6, 9 ed altri |
| Enterovirus 71, C99, D68 e D70 |
| Malattia gastrointestinale | Non comune | Enterovirus |
| Diabete, pancreatite | Non comune | Coxsackievirus B |
| ed orchite |

Tabella 2 – Riepilogo delle manifestazioni cliniche assocciate ad enterovirus (<https://www.msdmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/enterovirus/panoramica-sulle-infezioni-da-enterovirus>; Murray et al., 2021)

#### Infezioni da poliovirus

Esistono tre tipi di poliovirus, l’85% dei casi di poliomelite è dovuta al tipo 1. La patologia associata al vaccino può essere causata dalla reversione del virus attenuato usato per il vaccino dei tipi 2 e 3. Inoltre, dato il trionfo dei vaccini antipolio, le infezioni da poliovirus *wild type* sono rare. Tuttavia, alcune popolazioni sono tutt’ora non vaccinate e pertanto a rischio di infezione. A seconda della progressione di quest’ultima, i possibili esiti risultano essere: malattia asintomatica (90% dei pazienti con infezione), poliomelite abortiva (malattia miore; 5% dei casi), poliomelite non paralitica o meningite asettica (1-2% degli infettati) e poliomelite paralitica (malattia maggiore; 1-2% dei casi). Quest’ultima colpisce lo 0,1-2,0% degli individui infetti e la gravità della paralisi che causa, dipende dall’estensione dell’infezione ai neuroni e dal tipo di neuroni colpiti. La paralisi spinale può coinvolgere uno o più arti, mentre quella bulbare può coinvolgere i nervi cranici ed i centri respiratori midollari.

Infine, la sindrome Postpolio è un possibile postumo (30-40 anni dopo l’infezione) della poliomelite, che causa progressiva perdita dei neuroni originariamente colpiti.

#### Infezioni da coxsackievirus ed echovirus

Nella maggior parte dei casi, la malattia è asintomatica o simil-influenzale od interessa il tratto respiratorio, causando febbre, esantema e sintomi simili al raffreddore comune, come nel caso di infezione da coxsackievirus A21 e A24 o da echovirus 11 e 20.

I coxsackievirus A sono associati a malattie che causano lesioni vescicolare, quale l’erpangina (Jubelt and Lipton, 2014), mentre i coxsackievirus B sono associati più frequentemente a miocardite e pleurodinia (malattia di Bornholm). Sia i coxsackievirus che gli echovirus possono essere responsabili di meningite asettica (Frantzidou et al., 2008; Archimbaud et al., 2009). Sia le infezioni miocardiche e pericardiche che la meningite asettica sono più pericolose quando associate a neonati. Durante le stagioni estate-autunno sono frequenti epidemie di meningiti causate da echovirus 11.

Infine, alcuni tipi di coxsackievirus ed enterovirus 68 possono essere associate ad una forma paralitica simile alla poliomelite.

Il coxsackievirus A16 ed enterovirus 71 sono conosciuti come le principali cause della malattia mani-piedi-bocca (Goto et al., 2009).

#### Altre malattie da enterovirus

L’enterovirus 70 ed il coxsackievirus A24, recentemente, sono stati identificati come responsabili di congiuntivite emorragica acuta.

### Approcci diagnostici per il rilevamento

#### Esami clinico-chimici

Il liquido cerebrospinale è raramente positivo per il virus, ma in caso di positività a meningiti asettiche da enterovirus può essere distinto dalla meningite betterica. Infatti, il liquido cerebrospinale non presenta neutrofili, il livello di glucosio è normale o leggermente basso ed il livello di proteine è normale o leggermente alto.

#### Coltura

Poliovirus, coxsackievirus ed echovirus crescono in colture di rene di scimmia e possono essere isolati dalla faringe, dalle feci o dal liquido cerebrospinale del paziente. Tuttavia, molti ceppi di coxsackievirus A necessitano di inoculazione in topi, in quanto non crescono in colture cellulari.

#### Test genetici e sierologici

Test specifici per gli anticorpi e gli antigeni e la rilevazione dell’RNA virale tramite retrotrascrizione e reazione polimerasica a catena (RT-PCR) permettono di identificare il tipo di enterovirus, presente nel campione clinico in alalisi. Tra i test diagnostici impegati vi sono: la neutralizzazione, l’immunofluorescenza, ed il test immunoenzimatico (ELISA) (Berger et al., 2006). In ogni caso, la RT-PCR è il metodo di routine più rapido, sfruttato per l’identificazione di enterovirus e specialmente per confermare la diagnosi meningite da echovirus 11 in pazienti neonati (Archimbaud et al., 2009).

La sierologia, invece, è impigeta per confermare un’infezione da enterovirus, tramite la ricerca di immunoglobuline (Ig)M oppure tramite la dimostrazione di un aumento del titolo anticorpale di almeno quattro volte, dal periodo della malattia acuta, al periodo della convalescenza.

### Trattamento e prevenzione

Il pleconaril è un farmaco, disponibile commercialmente, che inibisce la penetrazione dei picornavirus all’interno delle cellule; deve essere somministrato precocemente nel corso dell’infezione.

La prevenzione delle poliomeliti paralitiche è stato un successo della medicina moderna. Dal 2002 è stata dichiarata l’eradicazione completa del poliovirus *wild type* in Europa (https://www.epicentro.iss.it/polio/). Non esistono cure per la poliomielite, se non trattamenti sintomatici che possono solo in parte minimizzare gli effetti della malattia. L’unica modalità per evitare potenziali conseguenze è la prevenzione tramite vaccinazione. Esistono due tipi di vaccini diversi: quello inattivato di Salk (vaccino antipolio inattivato - IPV), da somministrare con iniezione intramuscolo, e quello vivo attenuato di Sabin (vaccino orale vivo attenuato - OPV), da somministrare per via orale. Entrambi proteggono contro i tre tipi di poliovirus, sono stabili ed inducono una risposta anticorpale protettiva.

Il vaccino di Sabin, somministrato fino ad anni recenti anche in Italia, ha permesso di eradicare la poliomielite in Europa ed è raccomandato dall’Organizzazione mondiale della sanità nella sua campagna di eradicazione della malattia a livello mondiale (<https://www.epicentro.iss.it/polio/>). L’obiettivo dell’Oms è infatti quello di eliminare completamente la presenza della malattia, seguendo il successo ottenuto con il vaiolo nel 1980.

Non esistono vaccini per coxsackievirus o echovirus, la loro trasmissione può essere ridotta migliorando le condizioni igienico-sanitarie.

## SORVEGLIANZA ENTEROVIRUS IN REFLUI URBANI

L’epidemiologia basata sulle acque reflue (“Wastewater Based Epidemiology”) è un approccio che utilizza i reflui urbani come fonte di osservazione dinamica della circolazione dei patogeni. Inizialmente fu applicata a poliovirus ed altri virus enterici, di recente è stata utilizzata per lo studio della circolazione di SARS-CoV-2 nella popolazione.

# Scopo DEL LAVORO

L’obiettivo del seguente lavoro è stato valutare la prevalenza e l’eterogeneità degli enterovirus presenti nelle acque reflue analizzate ed approcciarsi a definire un andamento epidemiologico del virus nella zona comprendente le province di Brescia, Cremona e Bergamo.

# Materiali e metodi

## Campionamento

I prelievi sono eseguiti in corrispondenza dell’ingresso dell’impianto di depurazione, prima dei trattamenti. Il monitoraggio è stato effettuato con frequenza bisettimanale per quanto riguarda i depuratori delle città di Brescia (Verziano) e di Cremona e settimanale per il depuratore della città di Bergamo. Tali impianti possono trattare, rispettivamente, fino a 290.000, 574.700 e 200.000 Abitanti Equivalenti (AE). Il campionamento è durato 18 mesi ed ha interessato il periodo compreso tra gennaio 2022 e giugno 2023.

Il campionamento è stato eseguito dagli operatori all’interno degli impianti di depurazione. Il prelievo è stato eseguito mediante campionatori automatici per ottenere il medio composito delle 24 ore. I campioni di refluo grezzo sono stati raccolti in bottiglie di polietilene dotate di tappo di sicurezza e conservati a temperatura refrigerata, per un massimo di 48 ore. Un’aliquota di 50 ml è stata processata tempestivamente, in seguito all’arrivo in laboratorio, in modo da evitare perdite del target dovute al congelamento. In caso di impossibilità ad effettuare la concentrazione entro le 48 ore, il campione è stato conservato a -20 °C.

Come riportato in Tabella 3, i campioni sottoposti ad analisi sono 305: 131 pervenuti dal depuratore di Verziano, 126 dal depuratore di Cremona e 48 dal depuratore di Bergamo.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Sito prelievo** | **n. campioni anno 2022** | **n. campioni anno 2023** | **n. campioni totale** |
|
| Depuratore Verziano (BS) | 89 | 42 | 131 |
| Depuratore Cremona | 82 | 44 | 126 |
| Depuratore Bergamo | 29 | 19 | 48 |
|  |  |  | 305 |

Tabella 3 – Riepilogo campioni di acque reflue analizzate

## Preparazione dei campioni

*Reagenti per la preparazione dei campioni*

* Mengovirus, a titolo 102 TCID50/ml, quale virus controllo di processo.
* Soluzione PEG/NaCl: glicole polietilenico (PEG) 8000 (4 g), NaCl (0,9 g).
* PBS (Phosphate Buffered Saline), formula per litro: cloruro di sodio (8 g), cloruro di potassio (0,2 g), sodio fosfato bibasico (1,15 g), potassio fosfato monobasico (0,2 g) e acqua deionizzata sterile qb a 1000 ml.

*Procedimento per la preparazione dei campioni*

*Inattivazione del campione*

La prima fase dell’analisi, comprendente inattivazione e concentrazione dei campioni, oltre che il trasferimento degli stessi nel buffer di lisi è stata eseguita in cappa biologica di classe 2, situata in un laboratorio di contenimento, seguendo le relative procedure di sicurezza.

Le bottiglie contenenti il refluo scongelato sono state sottoposte ad un pre-trattamento termico, essendo collocate in bagnetto a 56 °C per 30 minuti. Tale processazione consente l’inattivazione delle particelle virali infettanti eventualmente presenti nei campioni.

Successivamente, i campioni sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente per 15 minuti.

*Concentrazione del campione*

* I campioni inattivati sono stati agitati mediante inversione dei contentenitori.
* Sono stati prelevati 45 ml dei campioni e sono stati posti in provetta tipo falcon da 50 ml e sono stati aggiunti 100 µl di materiale virale di controllo di processo positivo.
* I campioni sono stati centrifugati a 4500 × g per 30 minuti in centrifuga munita di rotore con chiusura di sicurezza anti-aerosol, refrigerata a +4 °C, senza freno (brake 0).
* In nuove falcon sono stati pesati 0,9 g di NaCl e 4 g di PEG 8000 e sono stati aggiunti, trasferendoli delicatamente, 40 ml di surnatante. Le falcon sono, successivamente, state poste in agitazione blanda per 15 minuti a 4 °C per far sciogliere completamente i sali.
* I campioni sono, poi, stati centrifugati a 12000 × g per 120 minuti a +4 °C.
* Il surnatante è stato scartato inclinando le falcon dalla parte opposta rispetto a dove si deposita il pellet, che in questa fase è normalmente invisibile.
* I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 12000 × g per 5 minuti a +4 °C per compattare il pellet.
* Il surnatante è stato eliminato completamente ed il pellet è stato risospeso in 500 µl di PBS.

## Estrazione dell’acido nucleico

Il metodo di estrazione con il sistema BioMérieux NucliSENS® (BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, Francia), si basa sulla chimica di Boom che sfrutta particelle di silice magnetica. In ambiente con forte concentrazione di sali, accade che gli acidi nucleici si leghino alle particelle di silice, le quali costituiscono la fase solida in questo metodo di estrazione. Tutte gli altri componenti presenti nella fase liquida sono stati eliminati con diversi lavaggi eseguiti utilizzando lo strumento eGENE-UP® Lysis and RNA/DNA Purification.

*Reagenti per l’estrazione dell’acido nucleico*

* NucliSENS Lysis Buffer o buffer di lisi a base di guanidina tiocianato.
* NucliSENS® Magnetic Extraction Reagents comprendenti: set di buffer di lavaggio, silica magnetica, buffer di eluizione degli acidi nucleici ed inibitore delle RNAsi.

*Procedimento per l’estrazione dell’acido nucleico*

Dapprima, sono stati aggiunti i 500 µl di campione concentrato a 2 ml di buffer di lisi (NucliSENS® Lysis Buffer) in provette da 15 ml e sono stati incubati a temperatura ambiente per 20 minuti, dopo essere stati agitati. Quindi, sono stati aggiunti 50 µl di sospensione di silice in grado di interagire con gli acidi nucleici. Dopo essere stati vortexati ed incubati a temperatura ambiente per 10 minuti, i campioni sono stati sottoposti a 4 lavaggi di 30 secondi in successione: due lavaggi con 500 µl di buffer Wash 1 e due lavaggi con 500 µl di buffer Wash 2. Infine è stato eseguito un ultimo lavaggio di 15 secondi con 500 µl di buffer Wash 3. Per le fasi di lavaggio è stato utilizzato uno strumento per l’estrazione magnetica (eGENE-UP® Lysis and RNA/DNA Purification), dotato di un magnete, rimovibile, in grado di trattenere la silice lungo la parete dei puntali durante l’aspirazione della fase liquida. In seguito, sono stati aggiunti 100 µl di buffer di eluizione (buffer Wash 3) per recuperare l’RNA virale legato alla silice ed è stata effettuata una incubazione a 60°C per 5 minuti ad agitazione massima in un termoblocco. Dopodiché i campioni sono stati inseriti in un rack magnetico ed e stato prelevato il buffer di eluizione prestando attenzione a non aspirare la silice (UNI EN ISO 15216-2:2019 - UNI Ente Italiano di Normazione). L’eluato è stato processato immediatamente oppure conservato a 5 °C ± 3 °C per un massimo di 24 ore, oppure a ≤ -65 °C per periodi più lunghi, sino al momento dell’amplificazione.

Al fine di verificare l’assenza di contaminazioni, durante questa fase e per ciascun set di campioni, è stato aggiunto ai campioni un controllo negativo di estrazione, costituito da acqua ultrapura tipo MilliQ. Inoltre, è stato aggiunto un controllo positivo di estrazione costituito da 100 µl di RNA di mengovirus (alla concentrazione di 102 TCID50/ml), addizionati a 500 µl di acqua per poter verificare l’avvenuta estrazione.

## Reazioni di one-step real-time RT-PCR

I campioni precedentemente estratti e conservati a −80 °C sono stati analizzati mediante one-step real-time RT-PCR, con lo strumento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA - USA), la quale si basa sulla chimica TaqMan.

Questo metodo di prova ha lo scopo di rilevare la presenza di tutti i tipi di enterovirus, attraverso l’amplificazione di una sequenza specifica di RNA virale, situata nella regione non codificante al 5’ del genoma virale (van Doornum et al., 2007). Invece, per la verifica del controllo di processo è stata allestita una reazione di one-step real-time RT-PCR specifica.

*Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di enterovirus*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione uso** | **Quantità** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 11,25 µl |
| Ultrasense Reaction Mix (5X) | 1X | 5 µl |
| Primer\_rhient-For EV (10 µM) | 0,4 µM | 1 µl |
| Primer\_P1.4taq-Rev EV (10 µM) | 0,4 µM | 1 µl |
| Probe\_Entpr1 (10 µM) | 250 nM | 0,5 µl |
| RNA Ultrasense Enzyme Mix | / | 1,25 µl |

Tabella 4 – Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di enterovirus

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer\_rhient-For EV | 5’ CCTCCGGCCCCTGA 3’ |
| Primer\_P1.4taq-Rev EV | 5’ GATTGTCACCATAAGCAGCC 3’ |
| Probe\_Entpr1 | 5’ FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGT-TAMRA 3’ |

Tabella 5 – Sequenze di primer e sonda per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di enterovirus (van Doornum et al., 2007)

*Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di mengovirus*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione uso** | **Quantità** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 9,62 µl |
| Ultrasense Reaction Mix (5X) | 1X | 5 µl |
| Primer Mengo 110 For (10 µM) | 0,5 µM | 1,25 µl |
| Primer Mengo 209 Rev (10 µM) | 0,9 µM | 2,25 µl |
| Probe Mengo 147 (10 µM) | 250 nM | 0,63 µl |
| RNA Ultrasense Enzyme Mix | / | 1,25 µl |

Tabella 6 - Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di Mengoviruis

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer Mengo 110 For | 5’ GCGGGTCCTGCCGAAAGT 3’ |
| Primer Mengo 209 Rev | 5’ GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC 3’ |
| Probe Mengo 147 | 5’ FAM-ATCACATTACTGGCCGAAGC-MGB 3’ |

Tabella 7 - Sequenze di primer e sonda per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di mengovirus (UNI EN ISO 15216-2:2019 - UNI Ente Italiano di Normazione)

*Procedimento della reazione di one-step real-time RT-PCR*

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite seguendo le indicazioni contenute nella Tabella 4 e nella Tabella 6. La miscela di reazione è stata distribuita in ciascun pozzetto, in ragione di 20 µl per ciacun controllo e per ciacun campione. In seguito, sono stati aggiunti:

* 5 µl di acqua deionizzata sterile, nel pozzetto identificato come controllo negativo di real-time PCR (No Template Control, NTC);
* 5 µl di controllo negativo di estrazione/processo, nel pozzetto identificato come controllo negativo di estrazione/processo;
* 5 µl di RNA di ciascun campione, nei pozzetti identificati come campioni;
* 5 µl di controllo positivo di estrazione/processo, nel pozzetto identificato come controllo positivo di estrazione/processo;
* 5 µl di controllo positivo di amplificazione, nei pozzetti identificati come controllo positivo di amplificazione (positivi real-time PCR).

Infine, la micropiastra da 96 pozzetti è stata trasferita nello strumento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), sul quale è stato impostato, rispettivamente, il profilo termico riportato in Tabella 8, per la ricerca del target enterovirus e quello relativo alla Tabella 9, per la ricerca del tagret mengovirus.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Step** | | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Retrotrascrizione | | 50 °C | 20 minuti | 1 |
| Pre-riscaldamento | | 95 °C | 5 minuti | 1 |
| Amplificazione | Denaturazione | 95 °C | 15 secondi | 45 |
| Annealing/estensione | 60 °C | 1 minuto |

Tabella 8 – Profilo termico della reazione di one-step real-time PCR per la ricerca di enterovirus

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Step** | | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Retrotrascrizione | | 55 °C | 60 minuti | 1 |
| Pre-riscaldamento | | 95 °C | 5 minuti | 1 |
| Amplificazione | Denaturazione | 95 °C | 15 secondi | 45 |
| Annealing/estensione | 60 °C | 1 minuto |
| 65 °C | 1 minuto |

Tabella 9 – Profilo termico della reazione di one-step real-time PCR per la ricerca di mengovirus

*Lettura ed interpretazione dei risultati*

L’esito della reazione di one-step real-time RT-PCR è stato consultato mediante il software dello strumento, sfruttando il grafico di fluorescenza.

L’analisi dei risultati è stata eseguita valutando l’andamento delle curve di amplificazione, associate ai campioni e a tutti i controlli, prodotte dalla lettura di un detector, associato alla sonda specifica per la porzione del genoma di virus ricercato. Tale analisi è stata eseguita valutando la presenza o l’assenza di curve di amplificazione all’interno dei campioni e di tutti i controlli.

Per la verifica del controllo di processo, si considera accettabile un’efficienza di recupero > 1% per il target mengovirus, rispetto ad una curva standard, appositamente caricata per ciascuna corsa. Essa è stata calcolata mediante il confronto del Ct (threshold cycle) ottenuto dal campione, con il Ct standard del controllo di processo, alla medesima diluizione.

La prova è stata considerata valida, quando tutti i controlli manifestavano il comportamento riportato in Tabella 10.

|  |  |
| --- | --- |
| **Controllo** | **Esito** |
| NTC | Neg |
| Controllo negativo di estrazione/processo | Neg |
| Controllo positivo di estrazione/processo | Pos |
| Controllo positivo di real-time PCR | Pos |

Tabella 10 – Esiti attesi dei controlli delle reazioni di one-step real-time PCR

I campioni sono stati considerati positivi, nel caso in cui la curva di amplificazione ad essi associata intersecasse la *threshold.* Quest’ultima è una retta parallela all’asse delle ascisse, la cui intersezione con ciascuna curva di amplificazione, permette di determinare il ciclo soglia. Essa è settata automaticamente dal software dello strumento o manualmente, in modo da eliminare la fluorescenza di background ed intersecare la curva di amplificazione nella regione iniziale del suo andamento esponenziale. I campioni sono stati considerati positivi in real-time PCR, nel caso in cui fossero associati ad un determinato valore di Ct, determinato dall’unione della sonda al genoma target. I campioni in esame sono stati, invece, considerati negativi nel caso in cui non presentassero alcun valore di Ct ad essi associato.

## Sequenziamento

Questa metodica sfrutta l’amplificazione di una sequenza specifica di RNA virale, situata nella regione di giunzione del genoma codificante per le proteine del capside (regione VP3/VP1).

La metodica si articola nelle seguenti fasi:

* preparazione del campione (vedere paragrafo 3.2);
* estrazione dell’acido nucleico (vedere paragrafo 3.3);
* amplificazione del target da sequenziare
* allestimento di una reazione di retrotrascrizione (RT) dell’RNA;
* allestimento di una reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico mediante PCR;
* allestimento di una reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico mediante seminested PCR;
* analisi dei prodotti di reazione mediante elettroforesi capillare di screening;
* genotipizzazione mediante metodica Sanger
* purificazione enzimatica del prodotto amplificato;
  + - * reazione di sequenza mediante marcatori fluorescenti (cycle sequencing);
      * purificazione dei prodotti della reazione di sequenza;
      * elettroforesi capillare;
      * lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi.

### Amplificazione del target da sequenziare

#### Reazione di retrotrascrizione dell’RNA

*Reagenti per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 7,5 µl |
| Buffer trascrittasi (10X) | 1X | 2 µl |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 mM | 1 µl |
| Cocktail primer (40 µM) | 10 µM | 5 µl |
| RNase Inhibitor (40 U/µl) | 1 U/µl | 0,5 µl |
| Trascrittasi Inversa (200 U/µl) | 10 U/µl | 1 µl |

Tabella 11 – Reagenti per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer AN32 | 5’ GTY TGC CA 3’ |
| Primer AN33 | 5’ GAY TGC CA 3’ |
| Primer AN34 | 5’ CCR TCR TA 3’ |
| Primer AN35 | 5’ RCT YTG CCA 3’ |

Tabella 12 – Sequenze di primer per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809)

*Procedimento per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA*

La reazione è stata eseguita secondo le indicazioni riportate in Tabella 11.

In ciascuna provetta da 0,2 ml sono stati distribuiti 17 µl della miscela di reazione. In seguito, sono stati aggiunti:

* 5 µl di acqua deionizzata sterile, nella provetta indicata come controllo negativo di RT;
* 5 µl di controllo negativo di estrazione nella provetta identificata come controllo negativo di estrazione;
* 5 µl di estratto di ciascun campione;
* 5 µl di RNA estratto dal controllo positivo di estrazione nella provetta identificata come controllo positivo di estrazione.

Infine, le microprovette sono state trasferite in un termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 13.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Annealing | 22 °C | 10 minuti | 1 |
| Retrotrascrizione dell’RNA in cDNA | 42 °C | 30 minuti | 1 |
| Inattivazione enzima | 94 °C | 5 minuti | 1 |

Tabella 13 – Profilo termico della reazione di retrotrascrizione

#### Reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico mediante PCR

*Reagenti per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 2,5 µl |
| HotSatrtTaq Master mix kit (2X) | 1X | 12,5 µl |
| Primer SO224 F (10 µM) | 1 µM | 2,5 µl |
| Primer SO222 R (10 µM) | 1 µM | 2,5 µl |

Tabella 14 – Reagenti per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer SO224 F | 5’ GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT 3’ |
| Primer SO222 R | 5’ C ICC IGG IGG IAY RWA CAT 3’ |

Tabella 15 - Sequenze di primer per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809)

*Procedimento per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR*

La reazione di amplificazione è stata eseguita seguendo le indicazioni contenute nella Tabella 14.

Sono stati distribuiti 20 µl di master mix per ciascuna delle provette sterili da 0,2 ml, necessarie per la reazione di PCR. In seguito, sono stati aggiunti:

* 5 µl di controllo negativo della retrotrascrizione;
* 5 µl di controllo negativo di estrazione;
* 5 µl di controllo negativo di PCR (acqua deionizzata sterile);
* 5 µl di cDNA per ciascun campione;
* 5 µl di cDNA di controllo positivo di estrazione/PCR;

Infine, le microprovette sono state trasferite in un termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 16.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Attivazione iniziale | 95 °C | 15 minuti | 1 |
| Denaturazione | 94 °C | 30 secondi | 35 |
| Annealing | 42 °C | 30 secondi |
| Ramp | 60 °C | 0,4°C/secondo |
| Estensione | 60 °C | 45 secondi |
| Estensione finale | 72 °C | 10 minuti | 1 |

Tabella 16 – Profilo termico della reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR

#### Reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico mediante seminested PCR

*Reagenti della reazione di II^ amplificazione con seminested PCR*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 5 µl |
| HotSatrtTaq Master mix kit (2X) | 1X | 12,5 µl |
| Primer AN89 F (10 µM) | 0.5 µM | 1.25 µl |
| Primer AN88 R (10 µM) | 0.5 µM | 1.25 µl |

Tabella 17 – Reagenti per la reazione di II^ amplificazione con seminested PCR

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer AN89 F | 5’ CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG 3’ |
| Primer AN88 R | 5’ TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT 3’ |

Tabella 18 – Sequenze di primer per la reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico con seminested PCR (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809)

*Procedimento della reazione di II^ amplificazione con seminested PCR*

La reazione di amplificazione è stata eseguita seguendo le indicazioni contenute nella Tabella 17.

Sono stati distribuiti 20 µl di master mix per ciascuna delle provette sterili da 0,2 ml, necessarie per la reazione di PCR. In seguito, sono stati aggiunti:

* 5 µl di controllo negativo della retrotrascrizione, ottenuto dalla prima amplificazione;
* 5 µl di controllo negativo di estrazione, ottenuto dalla prima amplificazione;
* 5 µl di controllo negativo di PCR, ottenuto dalla prima amplificazione;
* 5 µl di controllo negativo di seminested PCR (acqua deionizzata sterile);
* 5 µl di DNA, per ciascun campione, ottenuto dalla prima amplificazione;
* 5 µl di DNA di controllo positivo di estrazione/PCR, ottenuto dalla prima amplificazione.

Infine, le microprovette sono state trasferite in un termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 19.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Attivazione iniziale | 95 °C | 15 minuti | 1 |
| Denaturazione | 94 °C | 30 secondi | 35 |
| Annealing | 60 °C | 1 minuto |
| Estensione | 72 °C | 1 minuto |
| Estensione finale | 72 °C | 10 minuti | 1 |

Tabella 19 – Profilo termico della reazione di II^ amplificazione con seminested PCR

#### Analisi dei prodotti della reazione mediante elettroforesi capillare di screening

*Reagenti per elettroforesi capillare mediante Qiaxcel DNA screening kit*

* QX DNA dilution buffer
* QX Mineral oil
* QX Washing buffer
* QX Separation buffer
* Cartuccia Qiaxcel DNA Screening
* QX Alignment Marker
* QX Size Marker

*Procedimento per l’analisi dei prodotti della reazione mediante elettroforesi capillare con Qiaxcel DNA screening kit*

Si è proceduto utilizzando lo strumento multicapillare QIAxcel (Qiagen, Hilden, Germania) come segue:

* inserire la cartuccia Qiaxcel DNA Screening nello slot dello strumento;
* sistemare una strip da 12 provette da 0,2 ml contenenti il QX Alignment Marker nella posizione “marker 1”;
* posizionare le provette da 0,2 ml contenenti l’amplificato e il Size Marker nella piastra da 96 posizioni, completando ogni fila da 12 posizioni con provette da 0,2 ml contenenti DNA dilution buffer;
* avviare, nel computer collegato allo strumento, il software “QIAxcel ScreenGel®” e selezionare il profilo di corsa AM420.

Al termine della corsa elettroforetica è stata visualizzata la corsa direttamente sul monitor del computer; l’immagine ed il report di corsa sono stati salvati.

*Modalità di calcolo*

L’analisi dei risultati è stata eseguita valutando la presenza o l’assenza di bande specifiche all’interno dei campioni e di tutti i controlli. Il campione è stato considerato positivo, se risultava visualizzabile la banda della dimensione attesa; tale banda è compresa tra 348 e 393 paia di basi (pb).

La prova è stata considerata valida, quando tutti i controlli manifestavano il comportamento riportato in Tabella 20.

|  |  |
| --- | --- |
| **Controllo** | **Esito** |
| Controllo negativo di RT | Neg |
| Controllo negativo di estrazione | Neg |
| Controllo negativo di PCR | Neg |
| Controllo negativo di seminested PCR | Neg |
| Controllo positivo di estrazione/PCR | Pos |

Tabella 20 – Esiti attesi dei controlli della reazione di Seminested PCR

Si è proseguito con il sequenziamento dei campioni solo se i controlli sono risulati conformi a quanto atteso.

### Genotipizzazione mediante metodica Sanger

#### Purificazione enzimatica del prodotto amplificato

*Reagenti della reazione di purificazione enzimatica del prodotto amplificato*

Per eliminare i residui di primer di amplificazione ed i dNTPs non incorporati nella precedente reazione*,* l’amplificato è stato trattato con ExoSAP-IT™ Express Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA). Per ciascun campione sono stati distribuiti 2 µl di reagente nei pozzetti di una micropiastra e successivamente sono stati aggiunti 5 µl di DNA amplificato per ciscun rispettivo pozzetto.

La micropiastra è stata, poi, trasferita nel termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 21

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Incubazione | 37 °C | 4 minuti | 1 |
| Inattivazione enzimatica | 80 °C | 1 minuto | 1 |
| Raffreddamento | 4 °C | ∞ |  |

Tabella 21 – Profilo termico della reazione di purificazione enzimatica del prodotto amplificato

#### Reazione di sequenza mediante marcatori fluorescenti (cycle sequencing)

Per ciascun campione è stata allestita una Forward Sequencing Mix ed una Reverse Sequencing Mix per la regione genomica target. Le mastermix di sequenziamento contenenti BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) e BigDye® Terminator v1.1 5X Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) sono state allestite come riportato in Tabella 22 ed in Tabella 23.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 3 µl |
| Big Dye Terminator Reaction Mix (2,5X) | 0,5X | 2 µl |
| Big Dye Terminator Sequencing Buffer (5X) | 0,5X | 1 µl |
| Primer AN89 F (1,6 µM) | 0,32 µM | 2 µl |

Tabella 22 – Reagenti per la reazione di sequenza Forward

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | / | 3 µl |
| Big Dye Terminator Reaction Mix (2,5X) | 0,5X | 2 µl |
| Big Dye Terminator Sequencing Buffer (5X) | 0,5X | 1 µl |
| Primer AN88 R (1,6 µM) | 0,32 µM | 2 µl |

Tabella 23 – Reagenti per la reazione di sequenza Reverse

Sono stati distribuiti 8 µl di Forward/Reverse Sequencing Mix nei pozzetti di una micropiastra da 96 pozzetti per sequenziatore e sono stati aggiunti 2 µl di prodotto di PCR purificato in ogni rispettivo pozzetto.

La micropiastra per sequenziatore è stata, poi, trasferita nel termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 24.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Denaturazione iniziale | 96 °C | 1 minuti | 1 |
| Denaturazione | 96 °C | 10 secondi | 25 |
| Annealing | 50 °C | 5 secondi |
| Estensione | 60 °C | 4 minuti |

Tabella 24 – Profilo termico delle reazioni di sequenza

#### Purificazione dei prodotti della reazione di sequenza

Prima dell’elettroforesi capillare la reazione di sequenza è stata purificata con una soluzione composta da BigDye Xterminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) contenente SAM™ Solution e XTerminator™ Solution (Tabella 25).

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Volume/campione** |
| SAM Solution | 45,00 |
| Big Dye Xterminator bead solution | 10,00 |

Tabella 25 – Reagenti per la reazione di purificazione dei prodotti della reazione di sequenza

Un volume di 55 µl di mastermix è stato aggiunto ad ogni pozzetto contenente un campione della piastra per sequenziatore, la quale è stata successivamente chiusa con una pellicola adesiva.

La micropiastra è stata agitata su un agitatore per piastre per 30 minuti a 18000 × rpm. Infine, la micropiastra è stata centrifugata a 1800 × g per 2 minuti.

#### Elettroforesi capillare

La piastra da 96 pozzetti è stata caricata nel sequenziatore automatico Applied Biosystems Seqstudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed è stata avviata l’elettroforesi capillare con modulo di corsa Medium BDX.

#### Lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi

Al termine della corsa, i dati grezzi delle sequenze forward e reverse di ciascun campione sono stati importati nel software MEGA version 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*) (Tamura et al., 2013). Tali sequenze sono state assemblate ed allineate e sono stati corretti eventuali errori di chiamata delle singole basi azotate, al fine di creare le sequenze consenso. Elaborazione ed interpretazione delle sequenze.

Le sequenze consenso definitive ottenute sono utilizzate per l’identificazione della specie e del tipo di enterovirus presente nel campione, mediante confronto con le sequenze presenti nella banca dati Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) di GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1 (https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/).

L’identificazione è stata assegnata a seguito dell’individuazione della sequenza disponibile che rispetto alla sequenza consenso in esame abbia mostrato: la maggior percentuale di identità nucleotidica (max identity), la maggior copertura della sequenza (query coverage) ed il minor vallore di “E value”, che misura la probabilità che l’allineamento, con la maggior identità, non sia stato ottenuto casualmente.

### Next Generation Sequencing (NGS) metabarcoding su piattaforma Illumina MiSeq

Questa metodica sfrutta il sequenziamento dell’amplicone della regione del genoma codificante per la proteina capsidica VP1, che consente di tipizzare i diversi tipi di enterovirus, eventualmente presenti all’interno di un singolo campione.

Inizialmente è stata eseguita un’amplificazione PCR della regione del gene di interesse, che consente di legare, alle estremità degli ampliconi ottenuti, degli adattatori (acidi nucleici esogeni). In seguito, mediante successiva amplificazione sono stati legati degli indici (sequenze di DNA uniche legate a frammenti all’interno di una libreria di sequenziamento). Adattatori ed indici consentono l’ordinamento a posteriori e l’identificazione dei diversi campioni sequenziati su una stessa corsa di sequenziamento.

Infine, il sequenziamento è stato effettuato mediante piattaforma Illumina MiSeq, sfruttando letture accoppiate a 250 bp, al fine di generare letture di alta qualità a lunghezza intera della regione.

La metodica si articola nelle seguenti principali fasi:

* preparazione del campione (vedere paragrafo 3.2);
* estrazione dell’acido nucleico (vedere paragrafo 3.3);
* amplificazione del target da sequenziare (vedere paragrafo 3.5.1)
* allestimento di una reazione di retrotrascrizione (RT) dell’RNA (vedere paragrafo 3.5.1.1);
* allestimento di una reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico mediante PCR (vedere paragrafo 3.5.1.2);
* allestimento di una reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico mediante seminested PCR (vedere paragrafo 3.5.1.3);
* analisi dei prodotti di reazione mediante elettroforesi capillare di screening (vedere paragrafo 3.5.1.4);
* quantificazione dsDNA di partenza;
* amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori;
* analisi dei prodotti di reazione mediante elettroforesi capillare di screening;
* purificazione dei prodotti di PCR;
* preparazione delle librerie di sequenziamento
* reazione di Index PCR;
* purificazione dei prodotti di PCR;
* quantificazione e controllo della qualità delle librerie di sequenziamento;
* normalizzazione e pooling delle librerie di sequenziamento;
* denaturazione, diluizione e miscelazione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX;
* diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX;
* corsa di sequenziamento;
* valutazione dei parametri di corsa;
* generazione del report di caratterizzazione.

#### Quantificazione dsDNA di partenza

La concentrazione del dsDNA da sequenziare è determinata attraverso quantificazione in fluorescenza mediante l’utilizzo di intercalanti, utilizzando un fluorimetro da banco Quantifluor (Promega, Madison, Wisconsin, Stati Uniti).

*Procedimento per la quantificazione del dsDNA di partenza*

* Si è proceduto con la calibrazione dello strumento:
* preparazione di un bianco utilizzando 199 μl di QuantiFluor ONE dsDNA Dye ed 1 µl di TE 1X;
* preparazione della soluzione di standard aggiungendo 1 μl dello standard QuantiFluor® ONE Lambda DNA a 199 μl di QuantiFluor® ONE dsDNA Dye;
* agitazione dei controlli mediante vortex;
* incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti al buio;
* calibrazione dello strumento, selezionando il canale Blue, tramite la lettura del bianco e della soluzione standard (400 ng/µl).
* I campioni da quantificare sono stati preparati aliquotando per ciacuno 198 μl di QuantiFluor ONE dsDNA Dye ed aggiungendo 2 μl di campione.
* Agitazione dei campioni mediante vortex.
* Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti al buio.
* Per ciascun campione è stata misurata la fluorescenza e quindi il quantitativo di dsDNA misurato in ng. Per determinare la concentrazione del campione in ng/µl, il valore fornito dallo strumento è stato diviso per i µl di campione aggiunti (in questo caso 2 µl).

#### Amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori

*Reagenti per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale** | **Volume/campione** |
| Kapa HiFi HotStart ReadyMix (2X) | 1X | 12,5 µl |
| Primer AN232 F metabar (1 µM) | 0,2 µM | 5 µl |
| Primer AN233 R metabar (1 µM) | 0,2 µM | 5 µl |

Tabella 26 - Reagenti per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagente** | **Sequenza** |
| Primer AN232 F metabar | 5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGCACTGACAGCA 3’ |
| Primer AN233 R metabar | 5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTACTGGACCACCTGG 3’ |

Tabella 27 - Sequenze di primer per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809)

*Procedimento per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori*

La reazione di amplificazione è stata eseguita seguendo le indicazioni contenute nella Tabella 26.

Sono stati distribuiti 22,5 µl di master mix per ciascuna delle provette sterili da 0,2 ml, necessarie per la reazione di PCR. In seguito, sono stati aggiunti:

* 2,5 µl di controllo negativo di PCR (acqua deionizzata sterile);
* 2,5 µl di DNA ad una concentrazione di 5 ng/µl, per ciascun campione.

Infine, le microprovette sono state trasferite in un termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 28.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Attivazione iniziale | 95 °C | 3 minuti | 1 |
| Denaturazione | 95 °C | 30 secondi | 25 |
| Annealing | 55 °C | 30 secondi |
| Estensione | 72 °C | 30 secondi |
| Estensione finale | 72 °C | 5 minuti | 1 |

Tabella 28 – Profilo termico della reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori

##### Analisi dei prodotti della reazione mediante elettroforesi capillare di screening

*Reagenti per elettroforesi capillare mediante Qiaxcel DNA High Resolution kit*

* QX DNA dilution buffer
* QX Mineral oil
* QX Washing buffer
* QX Separation buffer
* Cartuccia Qiaxcel DNA High Resolution
* QX Alignment Marker 15 bp/3 kb
* QX Size Marker

*Procedimento per l’analisi dei prodotti della reazione mediante elettroforesi capillare con Qiaxcel DNA screening kit*

Si è proceduto utilizzando lo strumento multicapillare QIAxcel (Qiagen, Hilden, Germania) come segue:

* inserire la cartuccia Qiaxcel DNA High Resolution nello slot dello strumento;
* sistemare una strip da 12 provette da 0,2 ml contenenti il QX Alignment Marker 15 bp/3 kb nella posizione “marker 1”;
* trasferire 5 µl di ciascun campione amplificato in nuove provette/strip da 0,2 ml contenenti 5 µl di dilution buffer ed il Size Marker (FX174/HaeIII oppure 50-800 bp) nella piastra da 96 posizioni, completando ogni fila da 12 posizioni con provette da 0,2 ml contenenti DNA dilution buffer;
* avviare, nel computer collegato allo strumento, il software “QIAxcel ScreenGel®” (Qiagen, Hilden, Germania) e seguire le indicazioni su schermo dopo aver selezionato nel setup del processo il Process Profile “Default NGS High Resolution”.

Al termine della corsa elettroforetica è stata visualizzata la corsa direttamente sul monitor del computer; l’immagine ed il report di corsa sono stati salvati.

*Modalità di calcolo*

L’analisi dei risultati è stata eseguita valutando la presenza o l’assenza di bande specifiche all’interno dei campioni e del controllo. Il campione è stato considerato positivo, se risultava visualizzabile la banda della dimensione attesa; tale banda è compresa tra 415 e 460 paia di basi (pb).

La prova è stata considerata valida, quando il controllo negativo di PCR ha riportato esito negativo.

#### Purificazione dei prodotti di PCR

*Reagenti per la purificazione dei prodotti di PCR*

* AMPure XP beads
* Etanolo all’80%
* RSB (Resuspension Buffer)

*Procedimento per la purificazione dei prodotti di PCR*

* La strip/piastra con i prodotti di PCR è stata centrifugata a 1000 × g per 1 minuto.
* Un volume di 25 µl di prodotto di PCR residuo, per ciscun campione, è stato trasferito in una nuova piastra MIDI.
* Le AMPure XP beads sono state vortexate per 30 secondi e ne sono stati aggiunti 20 µl, in ogni pozzetto.
* Ciascun pozzetto è stato pipettato delicatamente per 10 volte ed è seguita un’incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
* La piastra è stata posta sul magnetic stand per 2 minuti ed è stato rimosso ed eliminato il surnatante.
* Lasciando la piastra sul magnetic stand sono stati aggiunti, in ciascun pozzetto, 200 µl di etanolo all’80% ed è seguita un’incubazione della piastra sul magnetic stand per 30 secondi.
* Il supernatante è stato rimosso ed eliminato.
* Lasciando la piastra sul magnetic stand il lavaggio con etanolo all’80% è stato riprtuto ed infine tutti i residui di etanolo sono stati rimossi ed eliminati.
* La piastra è stata lasciata ad asciugare a temperatura ambiente per 10 minuti, sul magnetic stand.
* La piastra è stata rimossa dal magnetic stand e sono satti aggiunti 52,5 µl di RSB in ogni pozzetto, per risospendere le biglie.
* La piastra è stata lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 2 minuti.
* La piastra è stata, poi, posta sul magnetic stand e lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 2 minuti.
* Infine, 50 µl di surnatante sono stati trasferiti in una nuova piastra PCR da 96 pozzetti.

#### Preparazione delle librerie di sequenziamento

##### Reazione di Index PCR

*Reagenti per la reazione di Index PCR*

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Volume/campione** |
| H2O DNAsi/RNAsi free | 10 µl |
| Kapa HiFi HotStart ReadyMix (2X) | 25 µl |
| Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) | 5 µl |
| Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) | 5 µl |

Tabella 29 - Reagenti per la reazione di tagmentazione

*Procedimento per la reazione di Index PCR*

La reazione di Index PCR è stata eseguita nel seguente modo:

* sono stati trasferiti 5 µl di DNA, di ciascun campione, in una piastra da 96 pozzetti;Tabella 27
* in ciascun pozzetto, sono stati aggiunti i reagenti riportati in Tabella 29;
* la piastra è stata ricoperta con pellicola e centrifugata a 1000 × g per 1 minuto;

Infine, la piastra è stata trasferita in un termociclatore ProFlex™ PCR Thermal Cycler System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA) ed il profilo termico è stato impostato secondo i parametri riportati in Tabella 30.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Step** | **Temperatura** | **Tempo** | **N° cicli** |
| Attivazione iniziale | 95 °C | 3 minuti | 1 |
| Denaturazione | 95 °C | 30 secondi | 8 |
| Annealing | 55 °C | 30 secondi |
| Estensione | 72 °C | 30 secondi |
| Estensione finale | 72 °C | 5 minuti | 1 |

Tabella 30 – Profilo termico della reazione di PCR della regione VP1 del gene di interesse

##### Seconda purificazione dei prodotti di PCR

*Reagenti per la seconda purificazione dei prodotti di PCR*

* AMPure XP beads
* Etanolo all’80%
* RSB (Resuspension Buffer)

*Procedimento per la seconda purificazione dei prodotti di PCR*

* La strip/piastra con i prodotti di PCR è stata centrifugata a 280 × g per 1 minuto.
* Un volume di 50 µl di prodotto di PCR residuo, per ciscun campione, è stato trasferito in una nuova piastra MIDI.
* Le AMPure XP beads sono state vortexate per 30 secondi e ne sono stati aggiunti 56 µl, in ogni pozzetto.
* Ciascun pozzetto è stato pipettato delicatamente per 10 volte ed è seguita un’incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
* La piastra è stata posta sul magnetic stand per 2 minuti ed è stato rimosso ed eliminato il surnatante.
* Lasciando la piastra sul magnetic stand sono stati aggiunti, in ciascun pozzetto, 200 µl di etanolo all’80% ed è seguita un’incubazione della piastra sul magnetic stand per 30 secondi.
* Il supernatante è stato rimosso ed eliminato.
* Lasciando la piastra sul magnetic stand il lavaggio con etanolo all’80% è stato riprtuto ed infine tutti i residui di etanolo sono stati rimossi ed eliminati.
* La piastra è stata lasciata ad asciugare a temperatura ambiente per 10 minuti, sul magnetic stand.
* La piastra è stata rimossa dal magnetic stand e sono satti aggiunti 27,5 µl di RSB in ogni pozzetto, per risospendere le biglie.
* La piastra è stata lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 2 minuti.
* La piastra è stata, poi, posta sul magnetic stand e lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 2 minuti.
* Infine, 25 µl di surnatante sono stati trasferiti in una nuova piastra PCR da 96 pozzetti.

##### Quantificazione e controllo della qualità delle librerie di sequenziamento

La quantificazione delle librerie di sequenziamento è stata eseguita con QuantiFluor® ONE dsDNA System ed il controllo della qualità mediante QIAxcel Advanced System e cartuccia Qiaxcel DNA High Resolution.

*Reagenti e procedimento per la quantificazione delle librerie di sequenziamento*

Vedere paragrafo 3.5.3.1.

*Reagenti e procedimento per il controllo della qualità dei prodotti della reazione tramite elettroforesi capillare mediante Qiaxcel DNA High Resolution kit*

Vedere paragrafo 3.5.3.2.1.

Al termine della corsa elettroforetica è stato visualizzato un elettroferogramma nel quale in ascissa erano poste le dimensioni dei frammenti espressi in paia di basi (pb) e in ordinata le unità di fluorescenza (FU). Le librerie sono state considerate idonee nel caso in cui mostrassero un profilo di distribuzione dei frammenti compreso tra 495 e 540 pb.

La concentrazione nM, di ogni singola libreria, è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

660 g/mol = peso molecolare DNA

##### Normalizzazione e pooling delle librerie di sequenziamento

*Reagenti per la normalizzazione ed il pooling delle librerie di sequenziamento*

* RSB (Resuspension Buffer)

*Procedimento per la normalizzazione ed il pooling delle librerie di sequenziamento*

* Ciascuna libreria è stata inizialmente portata a 10 nM, utilizzando RSB e partendo da un volume iniziale fisso di 5 µl.
* È stato poi creato un unico pool, mischiando pari volume (5 µl) di ciascuna libreria ed è poi stato quantificare con QuantiFluor® (vedere paragrafo 3.5.3.1)
* Il singolo pool è stato portato da 10 nM a 4 nM, utilizzando RSB, partendo da un volume iniziale fisso di 5 µl ed è stato quantificato con QuantiFluor® (vedere paragrafo 3.5.3.1).
* Il controllo Phix è stato preparato a 4 nM aggiungendo 2 µl di Phix (10 nM) a 3 µl di RSB.

##### Denaturazione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX

*Reagenti per la denaturazione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX*

* NaOH 0,2 N
* HT1 (Hybridization Buffer)

*Procedimento per la denaturazione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX*

* In una nuova provetta da 1,5 ml, sono stati aggiunti 5 µl di libreria pool a 4 nM e 5 µl di NaOH 0,2 N.
* In una nuova provetta da 1,5 ml, sono stati aggiunti 5 µl di Phix a 4 nM e 5 µl di NaOH 0,2 N.
* Entrambe le preparazioni sono state incubate a temperatura ambiente, per 5 minuti.
* In entrambe le provette da 1,5 ml, sono stati aggiunti 990 µl di HT1, per interrompere la denaturazione.

Al termine di questo processo, le librerie pool ed il Phix risultano essere concentrate 20 pM.

##### Diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX

*Reagenti per la diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX*

* HT1 (Hybridization Buffer)

*Procedimento per la* *diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo PhiX*

* Le librerie di sequenziamento ed il controllo Phix sono stati diluiti come riportato in Tabella 31, a seconda della concentrazione finale utilizzata.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Concentrazione finale 4 pM** | **Concentrazione**  **finale 6 pM** |
| Libreria denaturata a 20 pM | 120 µl | 180 µl |
| HT1 | 480 µl | 420 µl |

Tabella 31 - Reagenti e volumi per la diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo

* Ad un volume di 570 µl delle librerie di sequenziamento sono stati aggiunti 30 µl del controllo Phix, al fine di ottenere la concentrazione consigliata del controllo al 5% di Phix.
* Il pool ottenuto è stato incubato a 96 °C per 2 minuti.
* Infine, la provetta contenente il pool è stata miscelata per inversione e posta in ghiaccio per 5 minuti.

#### Corsa di sequenziamento

Per la corsa di sequenziamento è stato utilizzato il sistema MiSeq™ - Illumina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts – USA)

*Reagenti per la corsa di sequenziamento*

* MiSeq® Reagent Nano Kit v2 (500 cicli)
* Cartuccia v2 500 cicli
* MiSeq® v2 Nano flow cell

*Procedimento per la corsa di sequenziamento*

* La lista della corsa (“sample sheet”) è stata creata con il programma “Local Run Manager”.
* I parametri di corsa sono stati settati attraverso la modalità “GenerateFastQ”, come riportato in Tabella 32.

|  |  |
| --- | --- |
| **Oggetto** | **Settaggio** |
| Library Prep kit | Nextera XT |
| Index kit | Nextera XT Index |
| Index reads | 2 |
| Adapter trimming | ON |
| MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 cicli) | 251 + 251 |

Tabella 32 – Parametri settaggio corsa di sequenziamento

* La cartuccia è stata scongelata e miscelata per inversione.
* Il processo è stato avviato dal programma MiSeq control software.
* La flow cell è stata caricata, dopo esser stata sciacquata ed asciugata.
* Un volume di 600 µl di libreria è stato caricato nel pozzetto Load Sample della cartuccia.
* La cartuccia è stata caricata nel sequenziatore ed è stata avviata la corsa di sequenziamento.

#### Valutazione dei parametri di corsa

I parametri di corsa che sono stati valutati sono:

* Cluster Density (rilevabile sul monitor del Miseq);
* Clusters Passing Filter (rilevabile sul monitor del Miseq);
* percentuale di basi con Q-Score >30 (rilevabile sul monitor del Miseq);
* Error Rate PhiX (<6%) (rilevabile mediante Sequencing Analysis Viewer - SAV).

##### Valutazione dell’idoneità dei singoli campioni e trimming delle reads

##### I campioni sono stati considerati idonei in seguito alla valutazione del report di qualità fornito dal tool FastQC, mediante il Genome Detective Virus Tool (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/>). I campioni, infatti, sono stati adattati dal tool stesso, mediante apposito trimming e scarto delle sequenze di qualità inferiore ai criteri prestabiliti. In seguito (Figura 2, Figura 3 e Figura 4) è stato riportato un esempio di report FastQC di un campione con qualità accettabile.

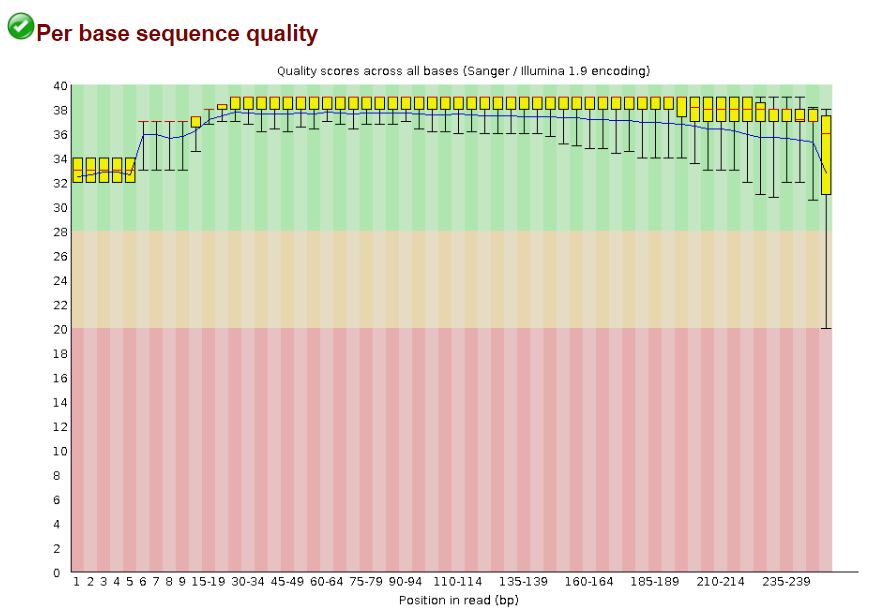


Figura 2 – Per base sequence quality

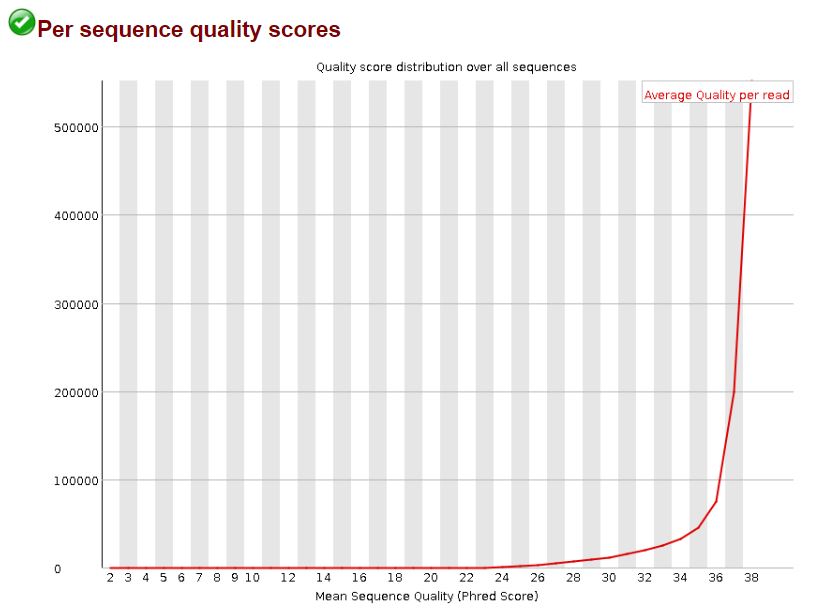


Figura 3 – Per sequence quality scores

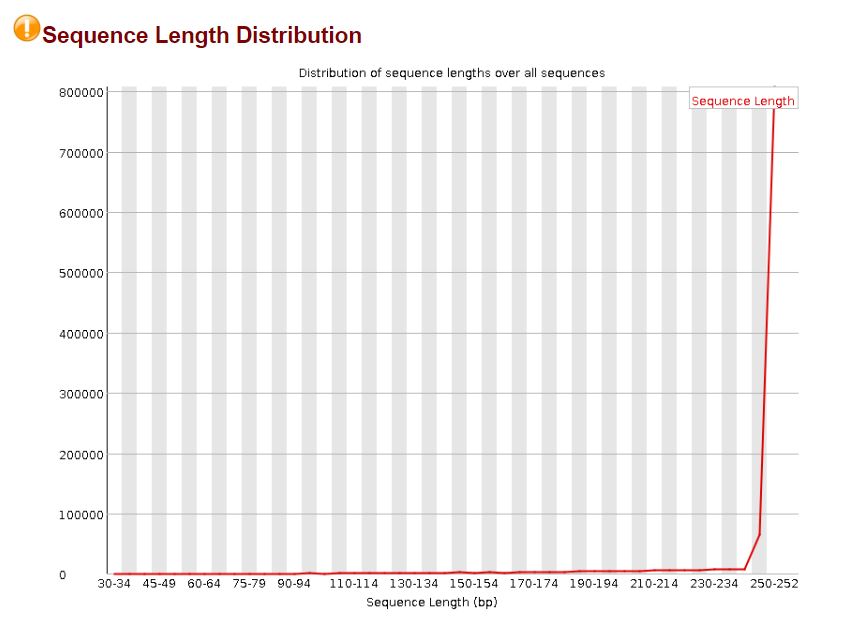


Figura 4 – Sequence Length Dostribution

#### Generazione del report di caratterizzazione

In seguito al caricamento dei file fastq R1 e R2, per ciascun campione analizzato, su Genome Detective Platform (<https://www.genomedetective.com/db/ui/submit>), selezionando il protocollo “Default Viral Analysis” e la tecnologia di sequenziamento “Illumina PE (Paired-End)” è stata fatta partire l’analisi.

La piattaforma genera, infine, un report con gli specifici dettagli relativi a: qualità delle reads, identificazioni di specie e tipi e relative sequenze. In seguito, è riportato l’esito delle identificazioni di un campione con i relativi parametri, quali numero di resds, coverage e % di identità (Figura 5).

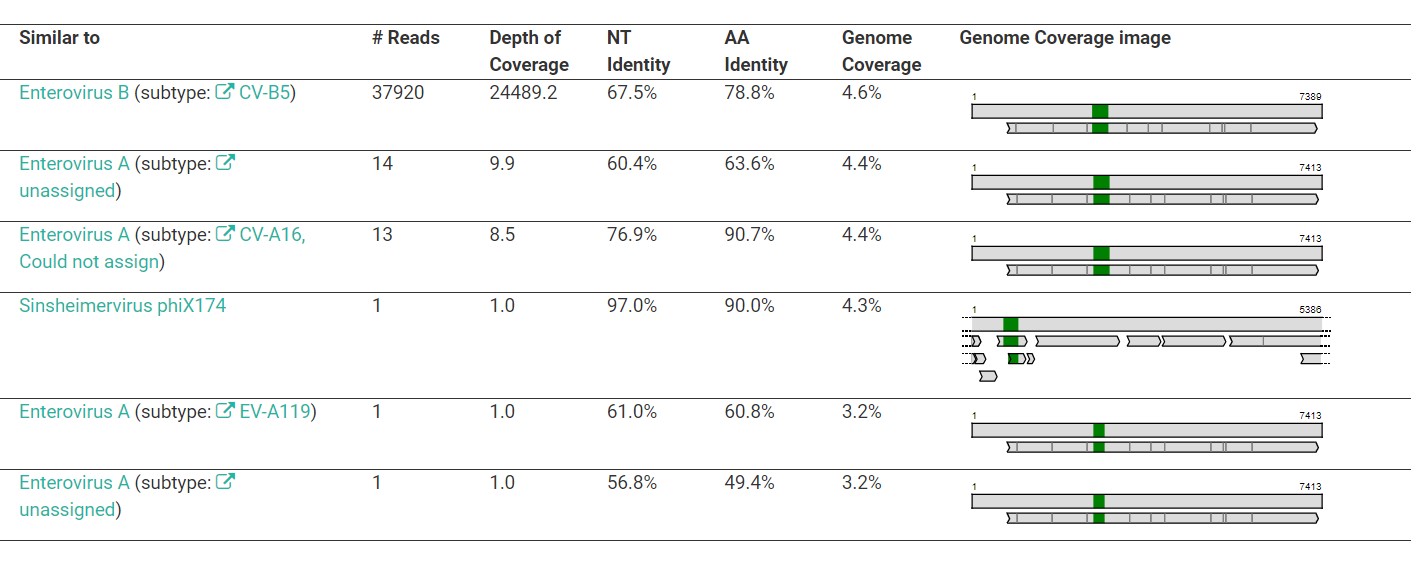


Figura 5 – Identificazioni di specie virali rilevate in un campione di refluo analizzato

## STATISTICA

# Risultati

## Reazioni di one-step real-time RT-PCR

Le prove sono state considerate valide dal momento che tutti i controlli delle reazioni hanno manifestato il comportamento atteso ed il controllo di processo (mengovirus) è risultato accettabile per tutti i campioni (efficienza di recupero > 1%).

La rilevazione di enterovirus mediante one-step real-time RT-PCR di screening ha evidenziato gli esiti riportati in Tabella 33, ovvero una positività riscontata in 89 campioni su 305 totali testati.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Sito prelievo** | **n. campioni esito postivo** | **n. campioni esito negativo** |  |
|  |
| Depuratore Verziano (BS) | 46 | 85 |  |
| Depuratore Cremona | 23 | 103 |  |
| Depuratore Bergamo | 20 | 28 |  |
|  | 89 | 216 | **Totale** 305 |

Tabella 33 – Esiti one-step real-time RT-PCR di enterovirus – parte 1

Gli 89 campioni di reflui positivi ad enterovirus hanno riportato esito positivo (Ct < 39,00) in 61 campioni e debolmente positivo (Ct > 39,00) in 28 campioni, come riportato in Tabella 34.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Esito** | **n. campioni** |  |
| Positivo (Ct < 39,00) | 61 |  |
| Debolmente positivo (Ct > 39,00) | 28 |  |
|  | 89 | **Totale** |

Tabella 34 – Esiti one-step real-time RT-PCR di enterovirus – parte 2

## Sequenziamento

Le amplificazioni dell’acido nucleico mediante PCR effettuate, hanno permesso di ottenete degli amplificati idonei a proseguire le indagini per la tipizzazione molecolare in x campioni su 89 campioni positivi emersi dallo screening. Nelle figure (n=4) sono riportati i profili delle bande ottenute mediante elettroforesi capillare dei campioni tipizzabili e pertanto sequenziati.

# discussione

EV sono virus altamente diffusi in tutti i continenti. enterovirus B è stato il più rilevato specie in tutto il mondo, mentre le altre specie hanno mostrato differenze continente-specifiche, con enterovirus C più rilevato in Africa e enterovirus A più rilevato in Asia. Echovirus 30 era di gran lunga il tipo più rilevato, soprattutto negli studi condotti in Europa. Tipi di EV nelle specie enterovirus B, compreso l’echovirus 30, sono stati spesso rilevati in gruppi di pazienti con infezioni neurologiche e in liquido cerebrospinale, mentre i tipi di enterovirus C sono stati spesso trovati nei campioni di feci (Brouwer et al., 2021).

# conclusioni

# Indice delle figure

Figura 1 - Poliovirus al microscopio elettronico (Details - Public Health Image Library - PHIL) 3

Figura 2 – Per base sequence quality 39

Figura 3 – Per sequence quality scores 39

Figura 4 – Sequence Length Dostribution 40

Figura 5 – Identificazioni di specie virali rilevate in un campione di refluo analizzato 40

# Indice delle tabelle

[Tabella 1 - Tipi di enterovirus umani per specie. CVA, coxsackievirus A; CVB, coxsackievirus B; EV, enterovirus; E, echovirus; PV, poliovirus (Brouwer et al., 2021) 4](#_Toc146100178)

[Tabella 2 – Riepilogo delle manifestazioni cliniche assocciate ad enterovirus (https://www.msdmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/enterovirus/panoramica-sulle-infezioni-da-enterovirus; Murray et al., 2021) 7](#_Toc146100179)

[Tabella 3 – Riepilogo campioni di acque reflue analizzate 13](#_Toc146100180)

[Tabella 4 – Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di enterovirus 17](#_Toc146100181)

[Tabella 5 – Sequenze di primer e sonda per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di enterovirus (van Doornum et al., 2007) 17](#_Toc146100182)

[Tabella 6 - Reagenti per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di Mengoviruis 17](#_Toc146100183)

[Tabella 7 - Sequenze di primer e sonda per la reazione di one-step real-time RT-PCR per la ricerca di mengovirus (UNI EN ISO 15216-2:2019 - UNI Ente Italiano di Normazione) 17](#_Toc146100184)

[Tabella 8 – Profilo termico della reazione di one-step real-time PCR per la ricerca di enterovirus 18](#_Toc146100185)

[Tabella 9 – Profilo termico della reazione di one-step real-time PCR per la ricerca di mengovirus 18](#_Toc146100186)

[Tabella 10 – Esiti attesi dei controlli delle reazioni di one-step real-time PCR 19](#_Toc146100187)

[Tabella 11 – Reagenti per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA 20](#_Toc146100188)

[Tabella 12 – Sequenze di primer per la reazione di retrotrascrizione dell’RNA (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809) 21](#_Toc146100189)

[Tabella 13 – Profilo termico della reazione di retrotrascrizione 21](#_Toc146100190)

[Tabella 14 – Reagenti per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR 21](#_Toc146100191)

[Tabella 15 - Sequenze di primer per la reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809) 22](#_Toc146100192)

[Tabella 16 – Profilo termico della reazione di I^ amplificazione dell’acido nucleico con PCR 22](#_Toc146100193)

[Tabella 17 – Reagenti per la reazione di II^ amplificazione con seminested PCR 23](#_Toc146100194)

[Tabella 18 – Sequenze di primer per la reazione di II^ amplificazione dell’acido nucleico con seminested PCR (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809) 23](#_Toc146100195)

[Tabella 19 – Profilo termico della reazione di II^ amplificazione con seminested PCR 24](#_Toc146100196)

[Tabella 20 – Esiti attesi dei controlli della reazione di Seminested PCR 25](#_Toc146100197)

[Tabella 21 – Profilo termico della reazione di purificazione enzimatica del prodotto amplificato 25](#_Toc146100198)

[Tabella 22 – Reagenti per la reazione di sequenza Forward 26](#_Toc146100199)

[Tabella 23 – Reagenti per la reazione di sequenza Reverse 26](#_Toc146100200)

[Tabella 24 – Profilo termico delle reazioni di sequenza 27](#_Toc146100201)

[Tabella 25 – Reagenti per la reazione di purificazione dei prodotti della reazione di sequenza 27](#_Toc146100202)

[Tabella 26 - Reagenti per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori 30](#_Toc146100203)

[Tabella 27 - Sequenze di primer per la reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori (https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809) 30](#_Toc146100204)

[Tabella 28 – Profilo termico della reazione di amplificazione PCR della regione VP1 del gene di interesse e ligazione degli adattatori 31](#_Toc146100205)

[Tabella 29 - Reagenti per la reazione di tagmentazione 34](#_Toc146100206)

[Tabella 30 – Profilo termico della reazione di PCR della regione VP1 del gene di interesse 34](#_Toc146100207)

[Tabella 31 - Reagenti e volumi per la diluizione delle librerie di sequenziamento e del controllo 37](#_Toc146100208)

[Tabella 32 – Parametri settaggio corsa di sequenziamento 38](#_Toc146100209)

[Tabella 33 – Esiti one-step real-time RT-PCR di enterovirus – parte 1 43](#_Toc146100210)

[Tabella 34 – Esiti one-step real-time RT-PCR di enterovirus – parte 2 43](#_Toc146100211)

# Bibliografia

Archimbaud, C., Chambon, M., Bailly, J.L., Petit, I., Henquell, C., Mirand, A., Aublet-Cuvelier, B., Ughetto, S., Beytout, J., Clavelou, P., Labbé, A., Philippe, P., Schmidt, J., Regagnon, C., Traore, O., Peigue-Lafeuille, H., 2009. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis: Enterovirus Meningitis and Management. J. Med. Virol. 81, 42–48. https://doi.org/10.1002/jmv.21330

Berger, J.R., Chumley, W., Pittman, T., Given, C., Nuovo, G., 2006. Persistent Coxsackie B encephalitis: Report of a case and review of the literature. J Neurovirol 12, 511–516. https://doi.org/10.1080/13550280601090546

Brouwer, L., Moreni, G., Wolthers, K.C., Pajkrt, D., 2021. World-Wide Prevalence and Genotype Distribution of Enteroviruses. Viruses 13, 434. https://doi.org/10.3390/v13030434

Details - Public Health Image Library(PHIL) [WWW Document], n.d. URL https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=235 (accessed 8.1.23).

Enterovirus surveillance guidelines : guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative [WWW Document], n.d. URL https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809 (accessed 9.19.23).

EpiCentro, n.d. Poliomielite [WWW Document]. URL https://www.epicentro.iss.it/polio/ (accessed 9.16.23).

Frantzidou, F., Kamaria, F., Dumaidi, K., Skoura, L., Antoniadis, A., Papa, A., 2008. Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. European Journal of Neurology 15, 995–997. https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02233.x

Genome Detective Virus Tool [WWW Document], n.d. URL https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/ (accessed 9.19.23).

Goto, K., Sanefuji, M., Kusuhara, K., Nishimura, Y., Shimizu, H., Kira, R., Torisu, H., Hara, T., 2009. Rhombencephalitis and Coxsackievirus A16. Emerg. Infect. Dis. 15, 1689–1691. https://doi.org/10.3201/eid1510.090594

Jubelt, B., 2013. Enterovirus Infections, in: Jackson, A.C. (Ed.), Viral Infections of the Human Nervous System. Springer Basel, Basel, pp. 117–142. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0425-7\_6

Jubelt, B., Lipton, H.L., 2014. Enterovirus/Picornavirus infections, in: Handbook of Clinical Neurology. Elsevier, pp. 379–416. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00018-3

Kitamura, N., Adler, C., Wimmer, E., 1980. STRUCTURE AND EXPRESSION OF THE PICORNAVIRUS GENOME. Ann NY Acad Sci 354, 183–201. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27967.x

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2021. Medical microbiology, Ninth edition. ed. Elsevier, Edinburg London New York Osford Philadelphia St. Louis Sydney.

Panoramica sulle infezioni da enterovirus - Malattie infettive - Manuali MSD Edizione Professionisti [WWW Document], n.d. URL https://www.msdmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/enterovirus/panoramica-sulle-infezioni-da-enterovirus (accessed 9.19.23).

Pellegrinelli, L., Bubba, L., Primache, V., Pariani, E., Battistone, A., Delogu, R., Fiore, S., Binda, S., 2017. Surveillance of poliomyelitis in Northern Italy: Results of acute flaccid paralysis surveillance and environmental surveillance, 2012-2015. Hum Vaccin Immunother 13, 332–338. https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1264726

Rovida, F., Campanini, G., Piralla, A., Adzasehoun, K.M.G., Sarasini, A., Baldanti, F., 2013. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. Diagn Microbiol Infect Dis 77, 231–235. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.020

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30, 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T.J., Kaiser, L., 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. Infect Genet Evol 14, 282–293. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016

Thompson, K.M., Kalkowska, D.A., Badizadegan, K., 2021. Hypothetical emergence of poliovirus in 2020: part 2. exploration of the potential role of vaccines in control and eradication. Expert Rev Vaccines 20, 449–460. https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1891889

UNI EN ISO 15216-2:2019 - UNI Ente Italiano di Normazione [WWW Document], n.d. URL https://store.uni.com/uni-en-iso-15216-2-2019 (accessed 8.1.23).

van Doornum, G.J.J., Schutten, M., Voermans, J., Guldemeester, G.J.J., Niesters, H.G.M., 2007. Development and implementation of real-time nucleic acid amplification for the detection of enterovirus infections in comparison to rapid culture of various clinical specimens. J Med Virol 79, 1868–1876. https://doi.org/10.1002/jmv.21031