

Progetto di ricerca: Allestimento di metodi molecolari per la diagnosi quali-quantitativa delle diverse specie di Torquetenovirus (TTV) e studio del loro ruolo nel paziente trapiantato di organo solido.

Proponente: Prof. Fabrizio Maggi

Relazione finale (anno 2020)

In questo anno di progetto sono state portate a termine tutte le attività che erano state proposte e che di seguito vengono elencate.

1) Incremento della raccolta di campioni biologici da pazienti trapiantati di fegato

Questa attività, iniziata nel primo anno di finanziamento, è stata proseguita anche nell'anno scorso ed ha portato ad un notevole incremento del materiale raccolto. Ad oggi sono conservati oltre 8000 campioni di sangue (fra plasma e sangue intero) provenienti da circa 250 pazienti. In particolare, per ogni paziente, è conservato un campione pre-trapianto e prelievi post-trapianto ai seguenti giorni: +2, +4, +6, +8, +10, +12, +14, +30, +40, +50, +60, +70, +80, e +90. I campioni ottenuti sono residui della normale attività di laboratorio, sono aliquotati e conservati a -80°, il tutto in ottemperanza a quanto deliberato dal Comitato Etico di Area Vasta Nord Ovest. Al momento circa il 70% dei campioni di plasma e sangue intero sono stati estratti e il DNA ottenuto, utilizzato come materiale per misurare la quantità di TTV, è conservato in aliquote a -80°C.

2) Sviluppo e messa a punto di protocolli molecolari per la rilevazione/quantificazione delle diverse specie di TTV

Come è noto, la misura della viremia di Torquetenovirus (TTV) è stata recentemente proposta e validata come bio-marcatore predittivo della comparsa di complicanze infettive e/o di rigetto nel medio e lungo periodo in pazienti trapiantati di organo solido. Tuttavia, una delle principali caratteristiche del virus è la sua elevata variabilità genetica che rende TTV, da questo punto di vista, molto simile a virus come il papillomavirus di cui si conoscono più di 200 genotipi. Gli isolati di TTV che infettano l'uomo sono attualmente classificati all'interno della famiglia Anelloviridae, nel genere *Alphatorquevirus* in 29 specie caratterizzate da un elevato grado di variabilità genomica

inter-specie (**Tabella 1**). All'interno di ciascuna specie sono compresi numerosi ceppi virali così che, nel complesso, il numero totale di isolati di TTV attualmente conosciuti è ben oltre 100. Il significato di questa enorme variabilità del virus è ancora poco chiaro: dimostrata è l'esistenza di co-infezioni con multiple specie nel sangue della maggior parte dei soggetti infettati da TTV, ma ancora sconosciuta è la patogenesi, il significato clinico, e la relazione con la funzionalità del sistema immune di ogni singola specie. Lo studio delle variabilità genetica di TTV è complicato anche dal fatto che al momento non esistono metodi molecolari in grado di identificare e quantificare in modo specifico ciascuna delle 29 specie di TTV. Uno degli obiettivi di questo studio è stato quindi quello di allestire metodi molecolari che consentissero la diagnosi specifica di ciascuna specie virale provvedendo quindi un utile strumento all'indagine sul ruolo della variabilità di TTV nei pazienti trapiantati.

Tabella 1. Tassonomia della famiglia Anelloviridae

<i>Famiglia</i>	<i>Genere</i>	<i>No. di specie incluse nel genere</i>	<i>Virus rappresentativo</i>
<i>Anelloviridae</i>	<i>Alphatorquevirus</i>	29	TTV dell'uomo e dello scimpanzè
	<i>Betatorquevirus</i>	9	TTMV dell'uomo
	<i>Deltatorquevirus</i>	1	TTV della tupaia
	<i>Epsilontorquevirus</i>	1	TTV della scimmia tamarin
	<i>Etatorquevirus</i>	1	TTV del gatto
	<i>Gammatorquevirus</i>	2	TTMDV dell'uomo
	<i>Iotatorquevirus</i>	2	TTV del suino
	<i>Thetatorquevirus</i>	1	TTV del cane
	<i>Zetatorquevirus</i>	1	TTV della scimmia douroucouli

Per ottenere questo risultato sono state condotte le seguenti attività:

a) *Analisi filogenetica delle sequenze di TTV*: le attività di tipo bioinformatico hanno consentito i) l'individuazione di tutte le sequenze di TTV presenti in GenBank e la loro analisi filogenetica; ii) la clusterizzazione delle sequenze all'interno di ciascuna delle 29 specie in cui TTV è attualmente classificato; iii) l'analisi molecolare delle sequenze presenti all'interno di ciascuna specie; iv) lo studio di primers e/o probes in grado di amplificare in modo specifico ciascuna specie virale. Quest'ultimi sono elencati nella **Tabella 2**.

Tabella 2. Lista dei primers e probes

Nome	Sequenza (5' -> 3')	Posizione nt	Dimensioni (bp)
TTV_1F_qPCR	ACAGATCTTTGTGACATGGTGC	1285 - 1306	103
TTV_1R_qPCR	GGAAGTTCACAACCACAGAGTC	1387 - 1366	
TTV_2F_qPCR	ATCACAGTCAGAATAGGAGCCCCTAA	1031 - 1056	201
TTV_2R_qPCR	TGGGAGTATGCTAAGAATGTCGTTATAGTC	1231 - 1202	
TTV_3F_qPCR	GCAACCGCATGTGACTTGCAAT	1310 - 1331	79
TTV_3R_qPCR	GCCCCAATATCTGGAAGTTGACA	1388 - 1366	
TTV_4F_qPCR	GTTATTCTTGCAACAGTGTATGCA	1300 - 1323	118
TTV_4R_qPCR	TTAGATTGTTGTAAGCACTTCCTAAAAC	1417 - 1390	
TTV_5F_qPCR	TTGTGGTTATAGAGGCAACGGT	1195 - 1216	89
TTV_5R_qPCR	AAGAACCTGGAAGTTGCAACAG	1283 - 1262	
TTV_6F_qPCR	CAACCGCATGCAACTTGC	1325 - 1342	103
TTV_6R_qPCR	ATGCTCACTTTGTCGTTATAGATTGA	1427 - 1402	

TTV_7F_qPCR	TCCCCCTAGTAACTATCAGTGCCT	1323 - 1346	113
TTV_7R_qPCR	GTTATACCAGTAGGGATCTAAAATCTG	1435 - 1409	
TTV_8F_qPCR	AACCTGCCGCTCGTTAACAT	1309 - 1328	104
TTV_8R_qPCR	TTGCTCAACACCTGGAAGTTTAC	1412 - 1390	
TTV_9F_qPCR	GACGTTACACTGTTTAACTCAAC	1334 - 1357	100
TTV_9R_qPCR	GCAGAACTTGAATGTTACACAA	1433 - 1411	
TTV_10F_qPCR	TTAACATAAATGCCGTTGCGG	1336 - 1356	115
TTV_10R_qPCR	ATAGAGAGGAAGTTGTTGTAGACG	1450 - 1427	

TTV_11F_qPCR	ATTTGTGACACTACACTGCTCAAC	1185 - 1208	106
TTV_11R_qPCR	AAAGAACTTGAAATGTTACACAAACG	1290 - 1265	
TTV_12F_qPCR	CTTGAACGTTATTGCGGCTGACTT	1333 - 1356	105
TTV_12R_qPCR	AGGAAGCCGTTGTAAATGGAAG	1437 - 1416	
TTV_13F_qPCR	TCCAAGTGAACCTAACCGCAGC	1224 - 1245	131
TTV_13R_qPCR	AAATTGCGGAAGGTCTATATTGAGAC	1354 - 1329	
TTV_14F_qPCR	TGCGACGTTAACCTTGTGCAA	1343 - 1363	98
TTV_14R_qPCR	ACTTGGAAGGTCACACAAGGAGT	1440 - 1418	
TTV_15F_qPCR	TTGTAACCTTTCGCGTCAACTGC	1327 - 1348	88
TTV_15R_qPCR	AACACCTGGAAGGTGGTGCAA	1414 - 1394	
TTV_16F_qPCR	CTATTTGAAGACAAGTGGTACACTCA	1282 - 1307	146
TTV_16R_qPCR	TTCTTGCAGTACCTGGAAG	1427 - 1407	
TTV_17F_qPCR	TTGCGGTTTACCGCAGCTT	1320 - 1338	91
TTV_17R_qPCR	AAGGCTCTTGCAGAAGTGGGA	1410 - 1390	
TTV_18F_qPCR	CGAGTGACCGCAGCTGACTT	1329 - 1348	79
TTV_18R_qPCR	GTAATACTTGAAGGTGAAGCAAGG	1407 - 1383	
TTV_19F_qPCR	CGTTAATCTTGTGTCACTTTCGCGG	1332 - 1354	93
TTV_19R_qPCR	ACCTGGAAGGTGTAGCAAGGG	1424 - 1404	
TTV_20F_qPCR	TTGTGGTTAGCCTAGCTTCCTT	1243 - 1264	89
TTV_20R_qPCR	GAAATTTTGCAGAAGTGGGAAGG	1331 - 1309	
TTV_21F_qPCR	AACCTGTTGTCACTTTCGCGGT	1175 - 1195	97
TTV_21R_qPCR	CTCGCAATACCTGAAATGTCATGC	1271 - 1248	
TTV_22F_qPCR	TGGTACTGCGGCTGACTTTC	1563 - 1583	81
TTV_22R_qPCR	CTTCAACACTTGAACGTTGTG	1643 - 1621	
TTV_23F_qPCR	GTTTCCGCTTGCAGCCTAACA	1341 - 1361	109
TTV_23R_qPCR	CTGCTATGTTAAGATTGCCGTAATAG	1449 - 1424	
TTV_24F_qPCR	TTTCTGCGGCTAGCTTCATGC	1247 - 1267	81
TTV_24R_qPCR	TGTCTTCAACACCTGGAAGG	1327 - 1307	
TTV_1-24P_qPCR	FAM/ TCCGTTCKGCTCACCACWAAC /BHQ1		TTV specie 1...24

TTV_27F_PCR	AGAATCTTACAAGTCAGTGACCCGGC	2365 - 2390	478
TTV_27R_PCR	TGGGTGTTAGGAAAAAGCAGGTCCTC	2842 - 2817	

TTV_28F_PCR	ACAGCCCATACTTTTTAACACCGCGA	1655 - 1680	722
TTV_28R_PCR	TGACACTCTTTTAAGACTTGCCGAGCT	2376 - 2350	
TTV_29F_PCR	ACAGAAACAGGTGGTCTCGCTCCAA	1078 - 1102	324
TTV_29R_PCR	CTTGTAGTTGGAAGAGGCCCATGCT	1401 - 1377	

b) Produzione di standard positivi per ogni protocollo di PCR specie-specifica: sono stati prodotti standard positivi di amplificazione che consentono la quantificazione assoluta di quelle specie per le quali è stata possibile la messa a punto di un protocollo quantitativo. Per far questo, amplificati sono stati ottenuti per ogni singola specie, l'amplificato è stato sequenziato per confermarne l'appartenenza alla specie e successivamente sottoposto a clonaggio. I cloni ottenuti sono stati valutati spettrofotometricamente e quantificati. Diluizioni dei singoli cloni sono state usate in ogni singola reazione di PCR come controlli positivi di reazione e per costruire la curva standard per la quantificazione della viremia della specie.

c) Allestimento di protocolli di amplificazione per la rilevazione di ogni singola specie: protocolli di PCR sono stati messi a punto determinando, per ogni singola amplificazione, concentrazione di primers/probes, temperatura di annealing e numero di cicli più adatti per ottenere più specifiche e sensibili reazioni. Per ogni protocollo è stato poi calcolato il limite di sensibilità, risultato per tutte le reazioni intorno alle 100 copie/ml di DNA di TTV rilevato per ogni singola specie.

L'insieme di tutte queste attività ha consentito lo sviluppo di protocolli di PCR per la determinazione quantitativa delle specie di TTV da 1 a 24 e qualitativa delle specie da 25 a 29.

3) Applicazione di protocolli specie-specifici su campioni di sangue di pazienti trapiantati di fegato.

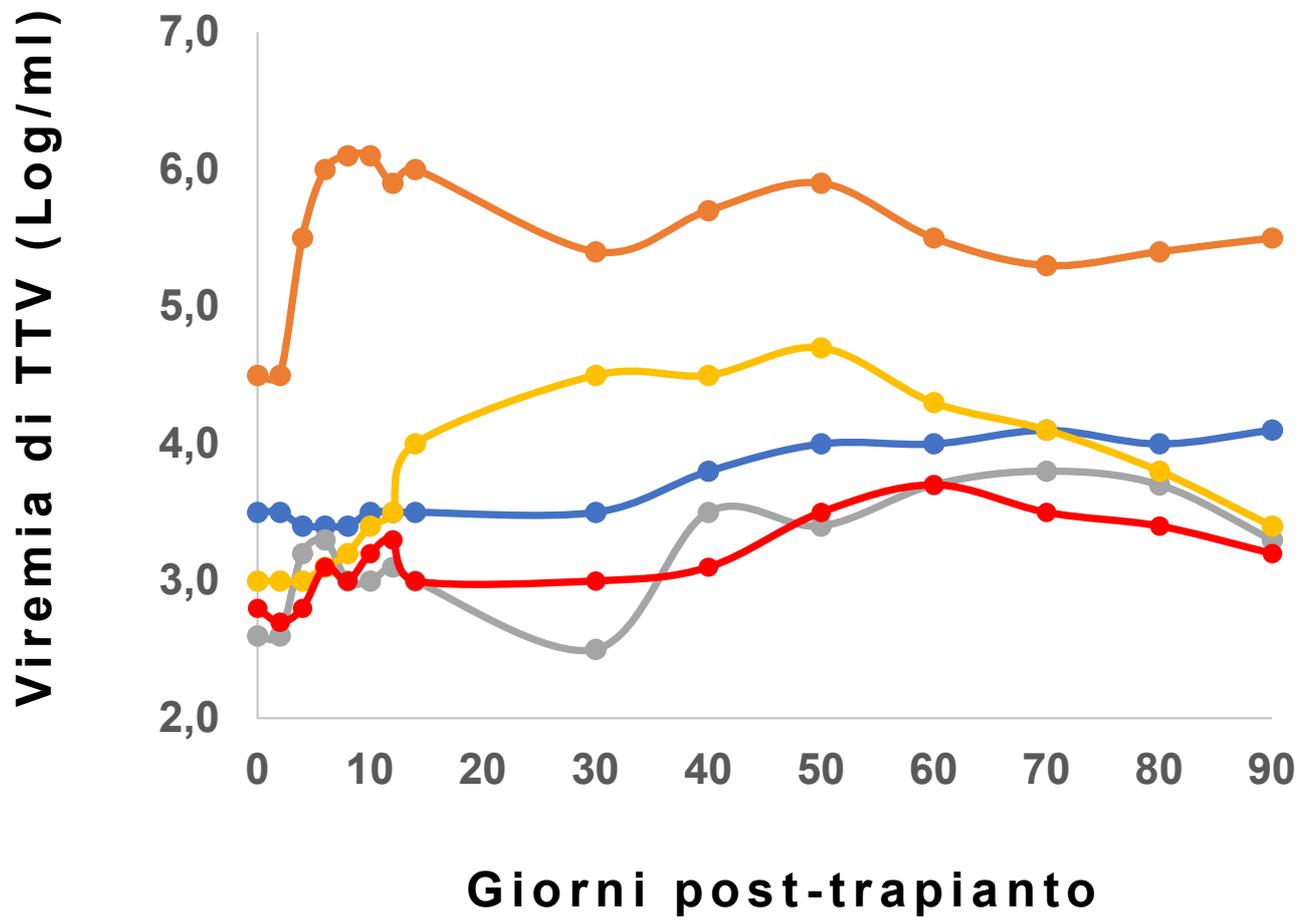
In questa parte dello studio sono state ricercate le specie TTV 1, 3, 13, 15 e 24 nei 100 pazienti trapiantati. Per prima cosa è stata studiata la prevalenza delle diverse specie. Come mostrato in **Tabella 2** la prevalenza è risultata molto diversa: in particolare la specie TTV 13 era presente nell'82% dei soggetti esaminati, seguita da TTV 3 (65%) e TTV 15 (47%). Meno rappresentate sono risultate le specie TTV 1 e TTV 24 presenti, rispettivamente nel 12% e nel 10% dei pazienti.

Tabella 2. Prevalenza delle specie di TTV 1, 3, 13, 15, e 24 nei 100 pazienti arruolati nello studio

Specie	No. pazienti	No. positivi
TTV 1	100	12
TTV 3	100	65
TTV 13	100	82
TTV 15	100	47
TTV 24	100	10

La **Figura 2** mostra l'andamento delle diverse varianti di TTV nel follow-up post-trapianto dei 100 pazienti esaminati. Si evidenzia un diverso andamento nel tempo delle specie di TTV: in particolare la specie 24 (in arancio) mostra i titoli più alti ed un andamento in aumento nei primi 15 giorni post-trapianto seguito da un successivo calo e una relativa stabilità nel follow-up più lungo. La specie 15 (in giallo) mostra invece dei titoli che incrementano fino al giorno 50 post-trapianto e che poi discendono per tornare al giorno 90 ai livelli basali. La specie 1 (in grigio) evidenzia un andamento trifasico con un aumento nei primi giorni, un calo successivo che raggiunge il minimo al giorno 30 e poi di nuovo un incremento di viremia. Le altre due specie (TTV13 in blu e TTV3 in rosso) mostrano un andamento sostanzialmente stabile per tutto il periodo di follow-up.

Figura 2.



Conclusioni

Il progetto ha portato al conseguimento di alcuni importanti risultati.

1. Lo sviluppo di protocolli molecolari volti alla determinazione quali-quantitativa delle diverse specie di TTV. Tali metodi non sono disponibili in letteratura, rappresentano un importante novità ed un indispensabile strumento per tutti gli studi futuri su TTV.
2. La determinazione, per la prima volta, della prevalenza di alcune specie di TTV in pazienti trapiantati. Ad oggi infatti non esistono lavori che abbiano studiato la prevalenza e le dinamiche delle singole specie di TTV nella popolazione dei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido e questo è in assoluto il primo report su questa linea di ricerca.
3. La dimostrazione che l'andamento nel tempo della viremia delle diverse specie di TTV è diversa. Ciò risulta estremamente importante ed apre interessanti prospettive nella ricerca di varianti del virus che possano, meglio di altre, essere utilizzate come marcatori dello status del sistema immunitario nel setting di soggetti immunodepressi.

Pubblicazioni.

1. Spezia PG, Macera L, Mazzetti P, *et al.* Redondovirus DNA in human respiratory samples. *Journal of Clinical Virology* 2020;1 31:104586.
2. Focosi D, Spezia PG, Macera L, *et al.* Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clinical Microbiology and Infection* 2020; 26:1406-10.

Prof. Fabrizio Maggi

