



Titolo  
**Infezioni respiratorie virali nel paziente critico**

Responsabile: Alberta Azzi

**Obiettivi del progetto**

Il progetto dal titolo “Infezioni respiratorie virali nel paziente critico” presentato nel 2011 ha una durata prevista di 3 anni. Il suo obiettivo principale è quello di determinare la frequenza di infezioni respiratorie virali nel paziente critico, la fonte di infezione, la gravità e, per quanto riguarda l’infezione da HSV, il suo reale significato (patogeno primario o marker con significato prognostico negativo), nonché il ruolo di coinfezioni virali (e anche di coinfezioni batteriche e virali). Oltre all’individuazione di eventuali patogeni respiratori virali, un’altro obiettivo del progetto è quello di cercare eventuali biomarcatori dell’infezione, attraverso lo studio dei profili di espressione di geni cellulari coinvolti nella produzione di citochine pro-infiammatorie e nella risposta antivirale. Inoltre lo studio si prefigge anche di sviluppare metodi innovativi high throughput, in grado di dare contemporaneamente numerose informazioni (dalla identificazione del virus alla tipizzazione e alla identificazione di marker molecolari di resistenza agli antivirali o di patogenicità), a costi più contenuti, oltre che dotati della necessaria sensibilità e specificità. Nel primo anno, per il quale è stato chiesto il finanziamento, l’attività è stata rivolta proprio a quest’ultimo aspetto, in quanto preliminare per il raggiungimento degli obiettivi indicati.

**Materiali e metodi**

**Virus**

Lo studio è stato indirizzato alla ricerca dei seguenti virus respiratori: virus influenzali di tipo A e di tipo B, virus parainflenzali 1-4, Virus respiratorio sinciziale, Metapneumovirus umano, Coronavirus umani (OC43, 229E, NL63, HKU1), Rhinovirus, Adenovirus.

Dal National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) sono stati ottenuti i ceppi di riferimento per la maggior parte dei virus considerati per ora nello studio, tranne che per virus influenzali e Adenovirus, per i quali i ceppi erano già disponibili nel laboratorio.

Studio in silico: sono state scaricate le sequenze dell’intero genoma (circa 50) di ciascun virus depositate in Genbank che sono state allineate tramite BioEdit per cercare le possibili regioni bersaglio per le tecniche di amplificazione.



Sono state scelte le coppie di primers, indicate nella tabella 1, per la ricerca dei suddetti virus con metodi di amplificazione, utilizzabili in formato multiplex.

Tabella 1 Principali coppie di primers scelti per lo studio e dimensione dei relativi ampliconi

virus	primers	Lunghezza amplicone	Annealing
Virus influenzali di tipo A	5'gAgTCTTCTAACMgAggTCgAAACgTA'3 5'gggCACggTgAgCgTRAA'3	194 bp	55°C
Virus parainflenzali 1,3	5'gAgACTCTgAgCTgTTTTTAAC'3 5'gCTgTACTTTCAAATCTCCA'3	71 bp	55°C
Virus parainflenzali 2,4	5'CAAATAATTATgggTTgggTCA'3 5'AAAATACCCgTTTACTATATA'3	87 bp	55°C
Virus respiratorio sinciziale	5'AATACAgCCAAATCTAACCAACTTA'3 5'gCCAaggAAgCATgCAATAAA'3	94 bp	60°C
Metapneumovirus umano	5'CAAATgTgACATTgCTgATCTgAA'3 5'CTgCCgCACAACATTTAggAA'3	79 bp	60°C
Coronavirus 229E, NL63	5'CAACgTATgTgTgCTATAggC'3 5'gTATTAACTATTTCAgCaggAC'3	74 bp	55°C
Coronavirus OC43, HKU1	5'TggTggCTgggATgATATgT'3 5'ggCATAgCACgATCACACTTAgg'3	96 bp	60°C
Rhinovirus	5'AgTCCTCCggCCCCTgAA'3 5'gAAACACggCACCCCAAAGT'3	179 bp	62°C

con le coppie di primers scelte sono state allestite le seguenti reazioni di amplificazione

RT-PCR

RT-PCR one step

RT PCR real time con intercalante Sybr Green.

Reazioni di amplificazione: RT-PCR one step: 50°C 20 min

95°C 5 min



*Università degli Studi di Firenze*  
Dipartimento di Sanità Pubblica  
Direttore: prof. Nicola Comodo

45 cicli (95°C 15 sec, 55°C/60°C 45 sec, 72°C 30sec)  
72°C 7 min

real time con intercalante Sybr Green (dopo RT-PCR): 94°C 10 min

40 cicli (95°C 30 sec, 55° 30 sec, 72°C 1 min, 72° 15 sec(Acquiring FAM/Sybr))  
Melt: 65°C-95°C

La reazione per la ricerca di adenovirus e rhinovirus è stata anche saggiata con successo per quanto riguarda i rhinovirus su un gruppo di 60 campioni clinici di varia provenienza, già testati nel nostro laboratorio con kit commerciali basati sull'utilizzo di RT-PCR real time. La reazione per la ricerca di Adenovirus invece deve essere ottimizzata.

Poiché attualmente esistono farmaci antivirali solo contro i virus influenzali, sono state messe a punto delle metodiche per l'individuazione di eventuali ceppi resistenti, basate su una PCR real time seguita da analisi HRM. Complessivamente a questo proposito sono stati analizzati 61 campioni (ottenuti da 57 pazienti) risultati positivi al virus A (H3N2) durante la stagione influenzale 2008/09 e durante l'ultima stagione influenzale 2011/12.

Le mutazioni prese in esame ed analizzate sono la mutazione S31N (nucleotide G806A) localizzata nel dominio transmembrana del canale ionico M2, nota per conferire resistenza ad amantadina e rimantadina e la mutazione E119V (nucleotide A356T) localizzata nel dominio strutturale del gene NA, mutazione che conferisce resistenza ad oseltamivir nei virus A(H3N2). Le reazioni sono state messe a punto su ceppi precedentemente caratterizzati nel nostro laboratorio tramite pyrosequencing. I campioni sono stati prima amplificati con RT-PCR utilizzando i primers specifici appositamente disegnati e successivamente analizzati mediante real-time PCR-HRM. L'analisi tramite HRM, condotta utilizzando il rotor-gene 6000, prevede l'utilizzo di intercalanti di terza generazione in grado di saturare il DNA. L'HRM permette di distinguere i vari ampliconi sfruttando la diversa Temperatura di Melting (Tm) della sequenza.

Tra i campioni analizzati, 55 (51 pazienti) hanno mostrato la mutazione S31N e i restanti 6 sono risultati wild-type. Per quanto riguarda la suscettibilità ad oseltamivir, su un totale di 61 campioni analizzati, 2 hanno mostrato la mutazione E119V. L'applicazione della RT real-time PCR-HRM consente di distinguere i ceppi con sequenze wild-type da ceppi con la mutazione e anche di individuare la presenza di popolazioni virali miste, in circa 3 ore e a costi limitati.



Infine è iniziato anche lo studio sull'applicazione della spettrometria di massa all'analisi degli acidi nucleici virali; questo approccio è finora applicato alla ricerca della mutazione E119V associata a resistenza ad oseltamivir nei virus influenzali A (H3N2). A questo proposito, dopo una RT-PCR, viene utilizzata una reazione di primer extension e il prodotto della reazione viene analizzato mediante MALDI/TOF. La reazione di primer extension nelle condizioni finora applicate non risulta abbastanza efficiente e deve quindi essere ottimizzata.

### **Pubblicazioni**

R. Arvia, F. Corcioli, L. Simi, C. Orlando, R. De Santis, M. Facchini, I. Donatelli, A. Azzi. Monitoring the susceptibility to oseltamivir of Influenza A(H1N1) 2009 virus by nested-PCR and pyrosequencing during the pandemic and in the season 2010–2011, *J Virol Methods*. 2012 Sep;184:113-116.

R. Arvia, F. Corcioli, A. Azzi.

High resolution melting analysis as a tool to detect molecular markers of antiviral resistance in influenza A viruses. (submitted)