

Diagnosi molecolare e sequenziamento di ceppi EIAV



UOC Virologia

Antonella Cersini

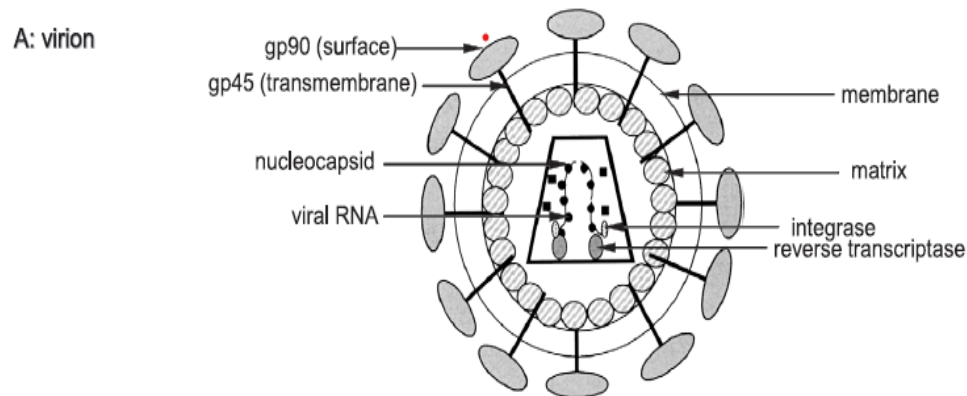


Caratteristiche del genoma AIE(1)

Famiglia:
Retroviridae

Genere:
Lentivirus

Leroux C. et al.(2004);
Vet. Res.; Vol. 35: pp.485-
512



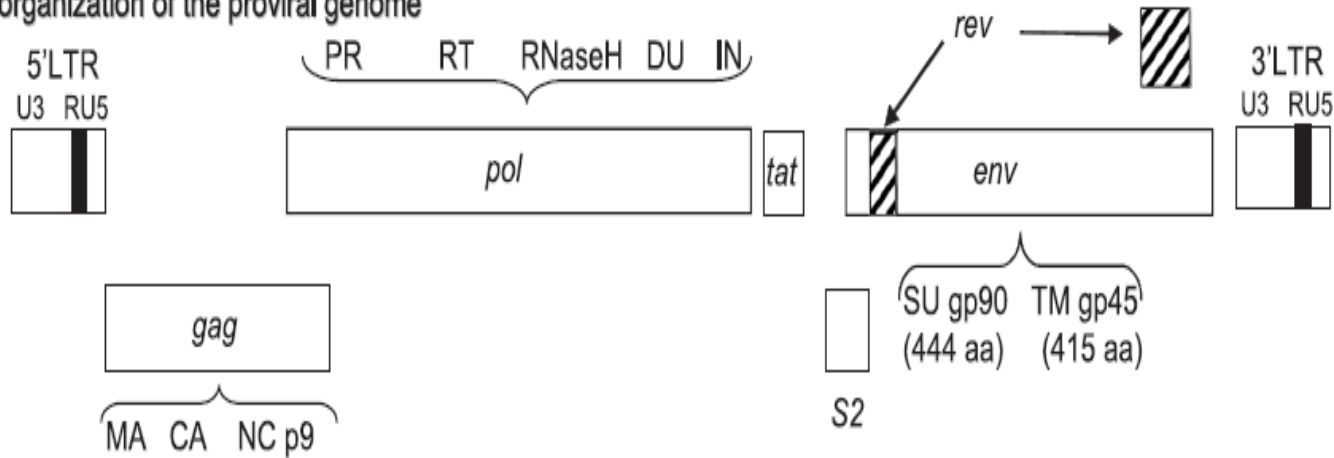
Dimensioni: 8,2 Kb

Composizione: RNA a singolo filamento



Regione del genoma codificante per *gag* (2)

B: organization of the proviral genome



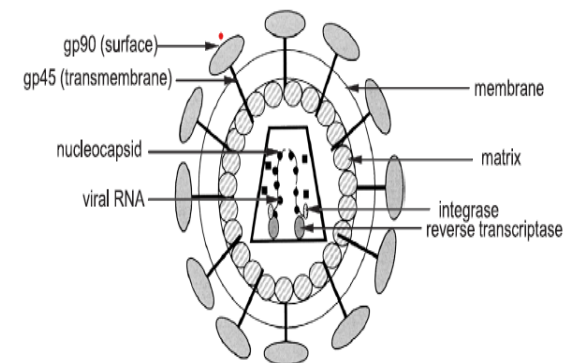
Leroux C. et al.(2004); Vet. Res.; Vol. 35: pp.485-512

MA: corrisponde alla **p15**, proteina di membrana che interagisce con la matrice del virus

CA: corrisponde alla **p26**, proteina del capside

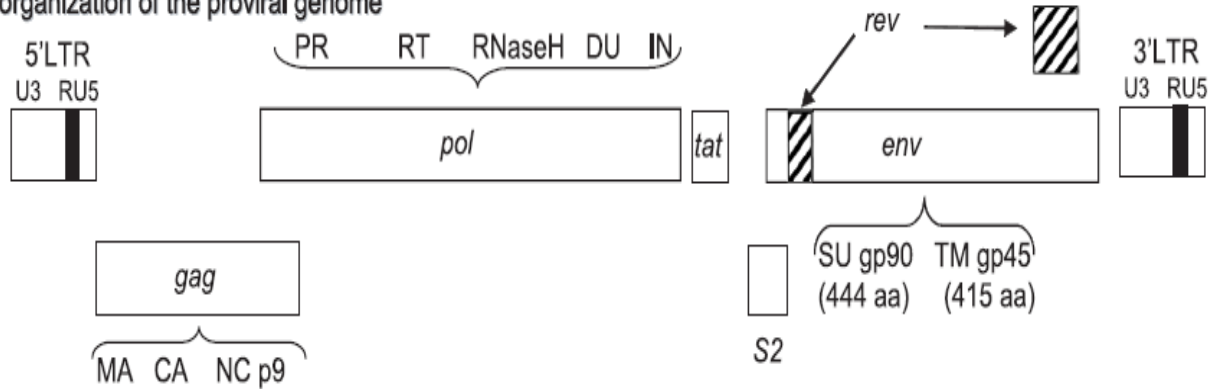
NC: corrisponde a **p11** e **p9**, proteine del nucleocapside aventi la funzione di legare il genoma ad RNA al capside virale (matrix).

A: virion

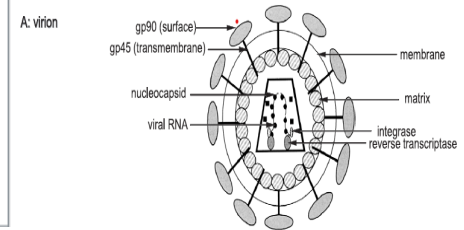


Regione del genoma codificante per *pol*(3)

B: organization of the proviral genome



Leroux C. et
al.(2004); Vet. Res.;
Vol. 35: pp.485-512



PR: corrisponde alla **p12**, proteasi virale fondamentale per la maturazione delle poliproteine

RT-Rnase H: corrisponde alla **p66**, la reverse trascrittasi RNA dipendente essenziale per la conversione del genoma virale ad RNA in DNA

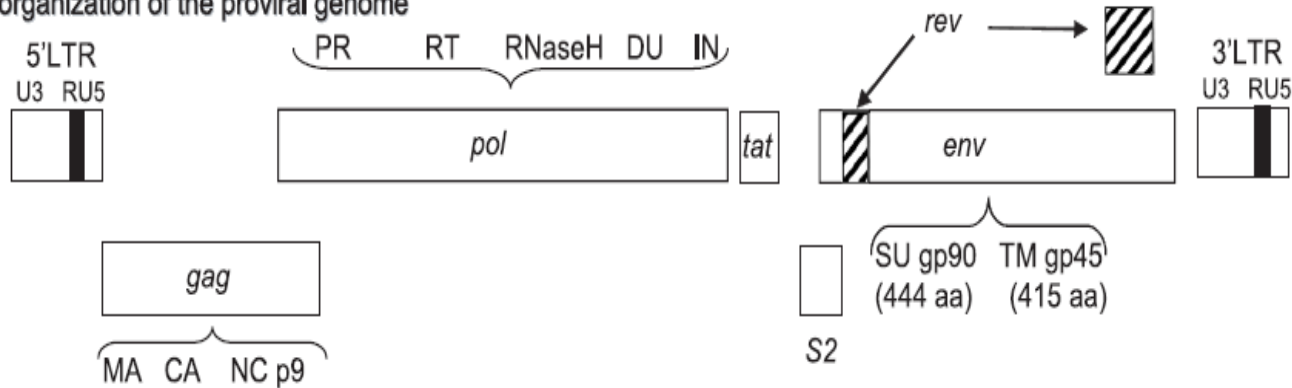
DU: corrisponde alla **p15**, dUTPase essenziale per la replicazione del virus nei monociti in divisione che stanno trasformandosi in macrofagi

IN: integrasi, permette l'integrazione del genoma virale a DNA nella cellula ospite



Regione del genoma codificante per *env* (4)

B: organization of the proviral genome

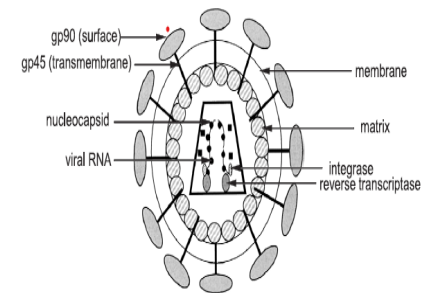


Leroux C. et al.(2004);
Vet. Res.; Vol. 35:
pp.485-512

SU: corrisponde a **gp90**, la glicoproteina di superficie del capside virale. **gp90** interagisce con il recettore della cellula ospite ed è fortemente soggetta a mutazioni a livello delle sue regioni variabili (da V1 a V8).

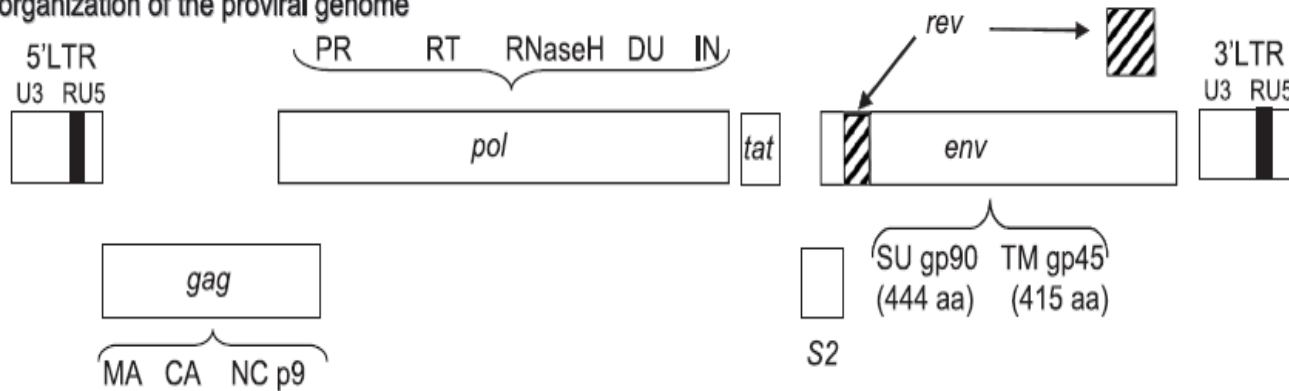
TM: corrisponde a **gp45**, la glicoproteina transmembrana

A: virion



I geni accessori nel genoma di EIAV: *tat*, *rev* ed *S2* (5)

B: organization of the proviral genome



Leroux C. et al.(2004);
Vet. Res.; Vol. 35:
pp.485-512

Tat: codifica per la proteina TAT altamente conservata, definita «**transattivatore della trascrizione**». Infatti, TAT legandosi alla ciclina T1, agisce sulle sequenze LTR inducendo la trascrizione del genoma virale.

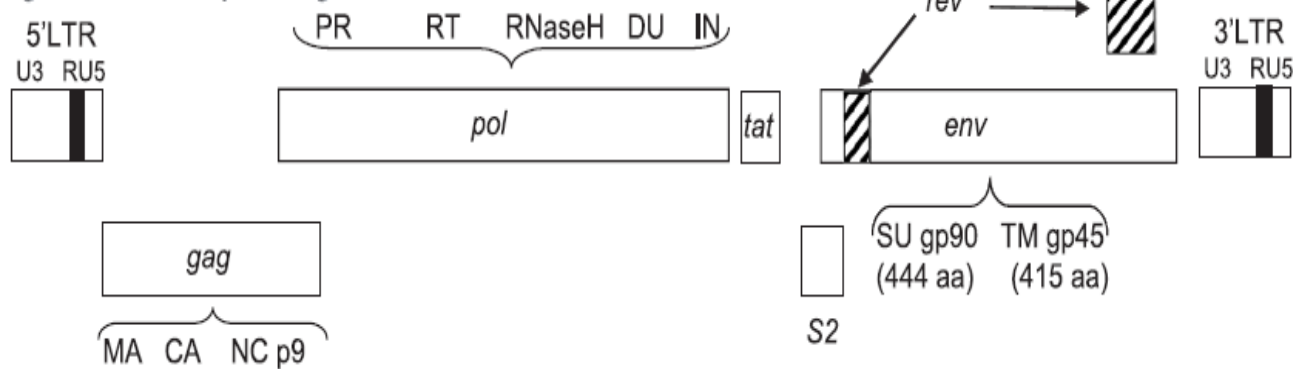
S2: codifica per la proteina S2 la cui funzione è ancora da chiarire, ma presenta una composizione in amminoacidi simile alle **nucleoproteine** per cui si ritiene che, legandosi a *gag*, permetta il passaggio dei genomi virali ad RNA dal nucleo al citoplasma

Rev: codifica per una proteina definita «**regolatore dell'espressione delle proteine virali**» ed agisce in combinazione con S2 garantendo il trasporto dei genomi virali ad RNA dal nucleo al citoplasma



Composizione e funzione delle *LTR* (6)

B: organization of the proviral genome



Leroux C. et al.(2004); Vet. Res.; Vol. 35: pp.485-512

Le ***LTR (Long Terminal Repeat)***, presenti alle estremità 3' e 5' terminali, sono fondamentali e ben conservate in quanto servono come «**siti di inizio della trascrizione del genoma virale**» In **U3** sono presenti sequenze con funzione di promotore.

In **U3** ed **U5** sono presenti: a) **siti di attacco dei ribosomi** necessari per la trascrizione in proteine dei genomi virali; b) **siti di attacco per le proteine cellulari necessarie per la attivazione della trascrizione** sia per il genoma a DNA che ad RNA (methylated DNA-binding protein); c) **le sequenze enhancer che potenziano la trascrizione del genoma a DNA**



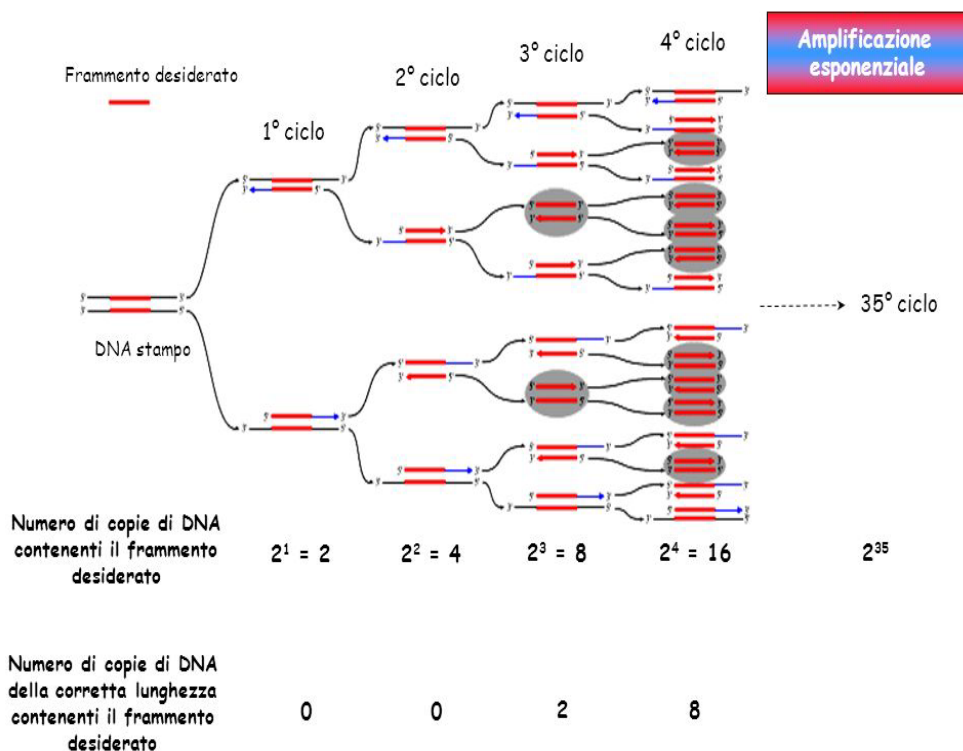
Target selezionati per i protocolli di Nested PCR (1)

Una volta studiata l'organizzazione del genoma del virus AIE sono state individuate

diverse regioni genomiche – definite **target-** con la caratteristica di essere conservate in modo tale da poterle amplificare nei protocolli di **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Infatti i **target conservati** vengono riconosciuti da specifiche coppie di sequenze nucleotidiche -definite **primer** -che permettono di avviare la reazione di PCR garantendo la **amplificazione esponenziale dello stesso target virale**

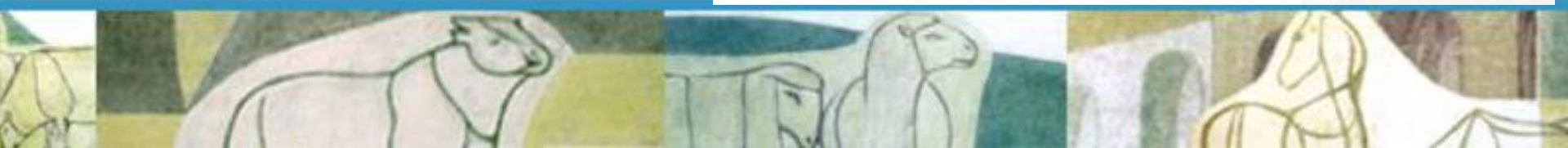
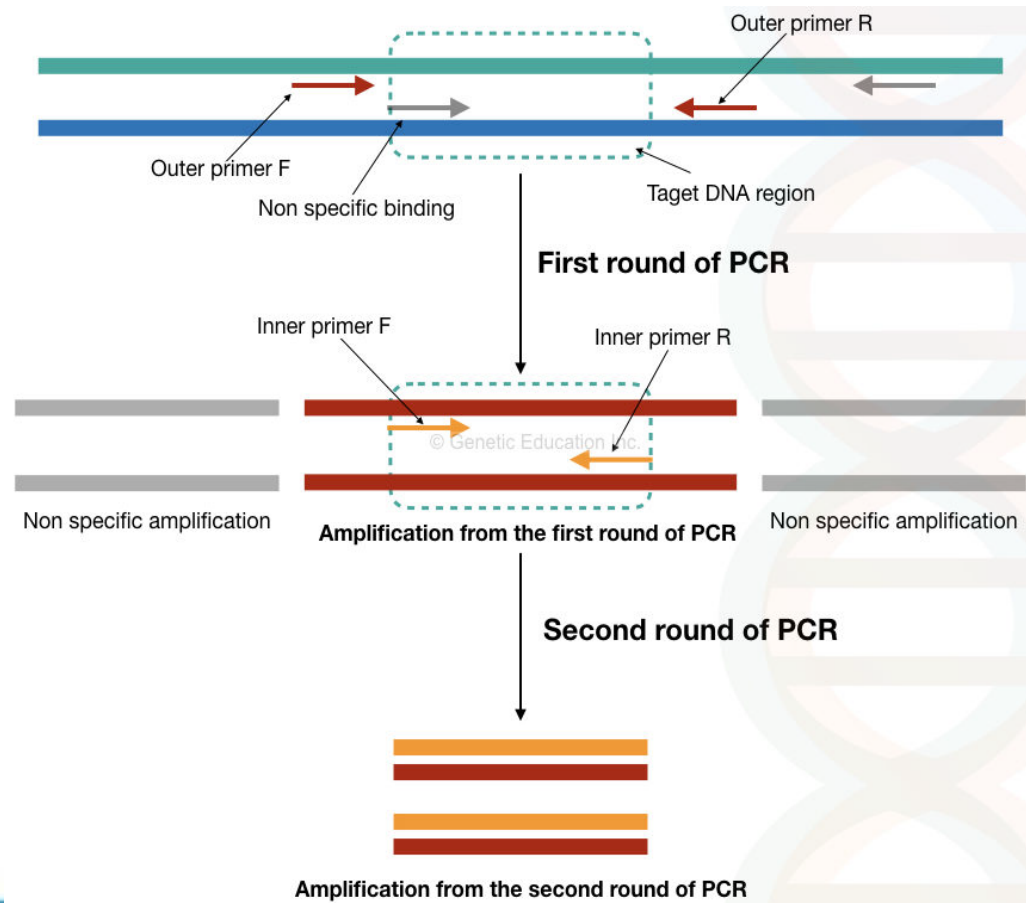
I primi 4 cicli della PCR in dettaglio



Target selezionati per i protocolli di Nested PCR (2)

Sono stati selezionati due protocolli di Nested PCR che possono essere eseguiti sia su **DNA virale (DNA provirale)** che su **RNA virale** estratti dai campioni in esame

Va specificato, come riportato nell'immagine, che nei protocolli di Nested PCR viene utilizzata una prima coppia di primer - **primer esterni**- che portano ad un **primo prodotto di PCR** ed una seconda coppia di primer - **primer interni**- specifici per il primo prodotto di PCR che portano ad un **secondo prodotto di PCR**



1° Protocollo di Nested PCR: target *LTR-tat* (1)

Jian-Bao Dong et al.; Arch Virol. (2012). Volume 157: 2105-2111

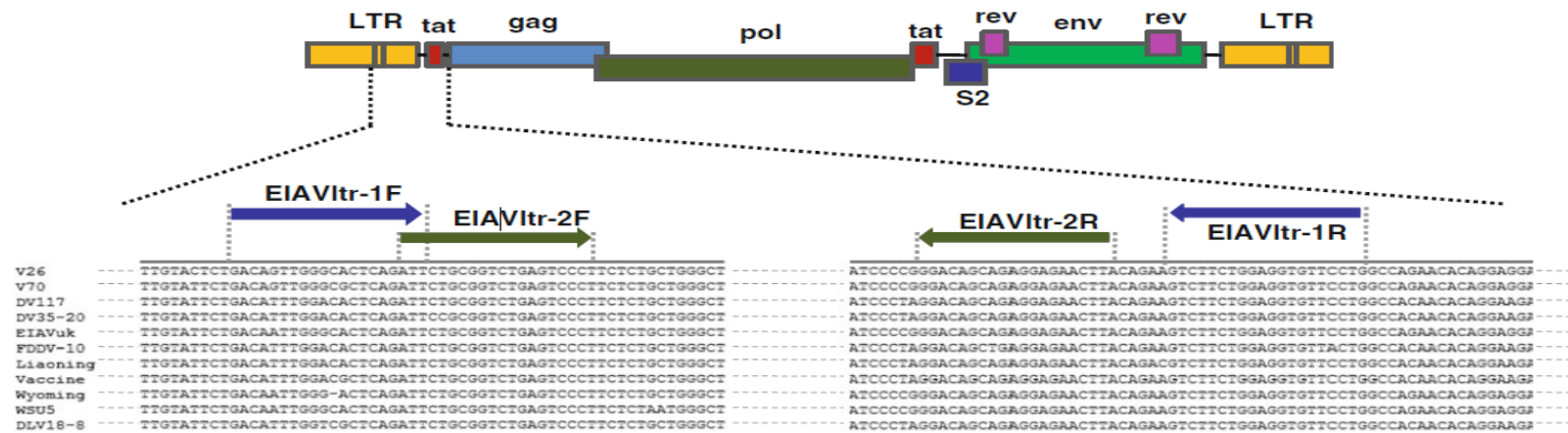


Fig. 1 Primer designing for nested PCR. Sequence alignments were made using the LaserGene sequence analysis package. Primers were designed by using the Oligo 6.31 program. International sequences are as follows: V26 (AB008197), V70 (AB008196), DV117

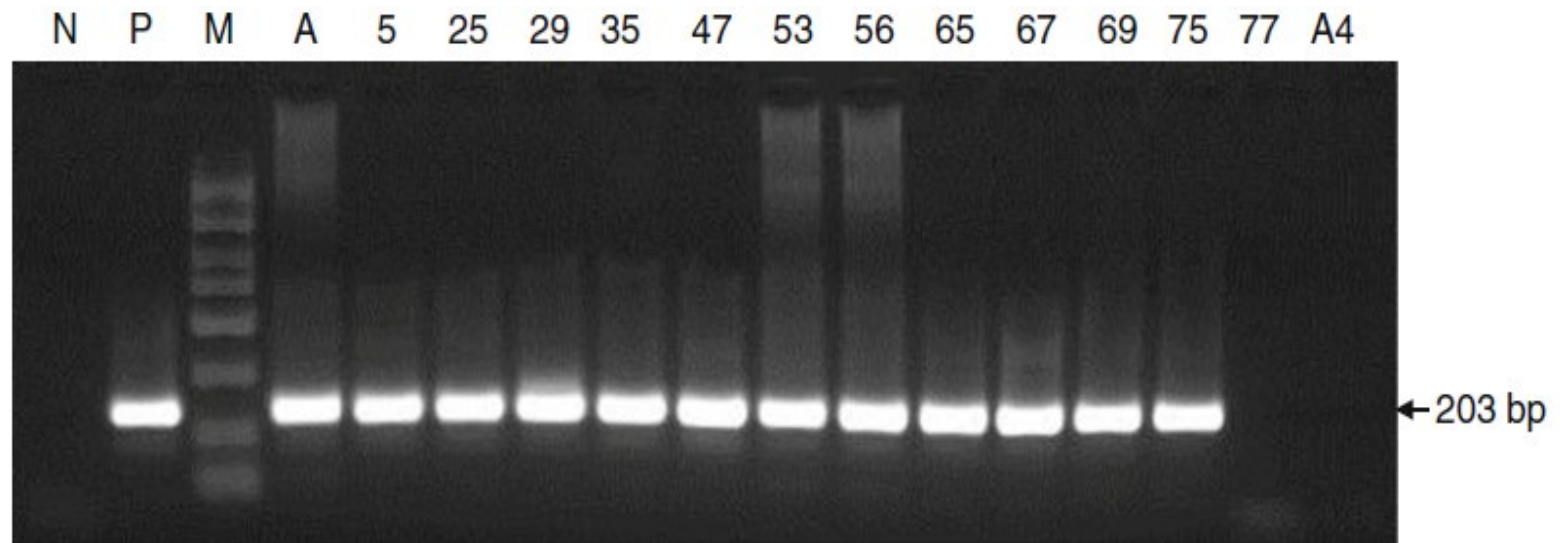
(HM141912), DV35-20 (HM141911), EIAVuk (AF016316), FDDV-10 (GU385360), Liaoning (AF327877), Vaccine Strain (AF327878), Wyoming (AF033820), WSU5 (AF247394), DLV18-8 (HM141923)

Table 1 Primer sets and reaction conditions for nested PCR

	Primer name	Oligonucleotide sequence	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
Outer primers	EIAVltr-1F	5'- GACAGTTGGGCACTCAGATT -3'	52	246
	EIAVltr-1R	5'- CAGGAACACCTCCAGAAGAC -3'		
Inner primers	EIAVltr-2F	5'- ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT -3'	58	198 to 203
	EIAVltr-2R	5'- TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC -3'		

1° Protocollo di Nested PCR: target *LTR-tat* (2)

Jian-Bao Dong et al.; Arch Virol. (2012). Volume 157: 2105-2111



L' amplificato finale del protocollo di Nested PCR *LTR-tat* è una banda di **203bp** interna alla regione del genoma codificante per *LTR-tat*

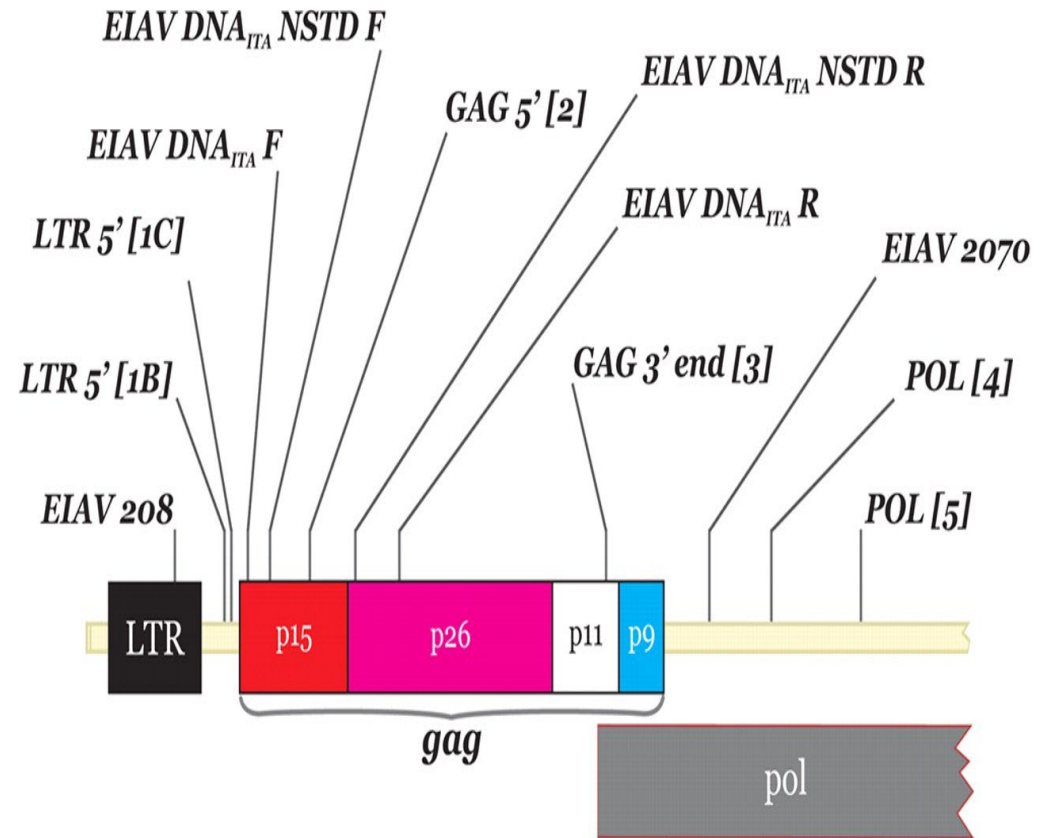


2° Protocollo di Nested PCR: target *gag* (1)

Katia Cappelli et al. Journal of Clinical Microbiology (2011); pp: 27-33

La prima coppia di basi, disegnata all'interno di *gag*, porta ad un amplificato di **547bp** utilizzando la coppia di primer EIAV DNAITAF – GACATGGAGGCAAAGCGCTCA/ EIAV DNAITAR – CTGCCCAGGCACCACATCTA

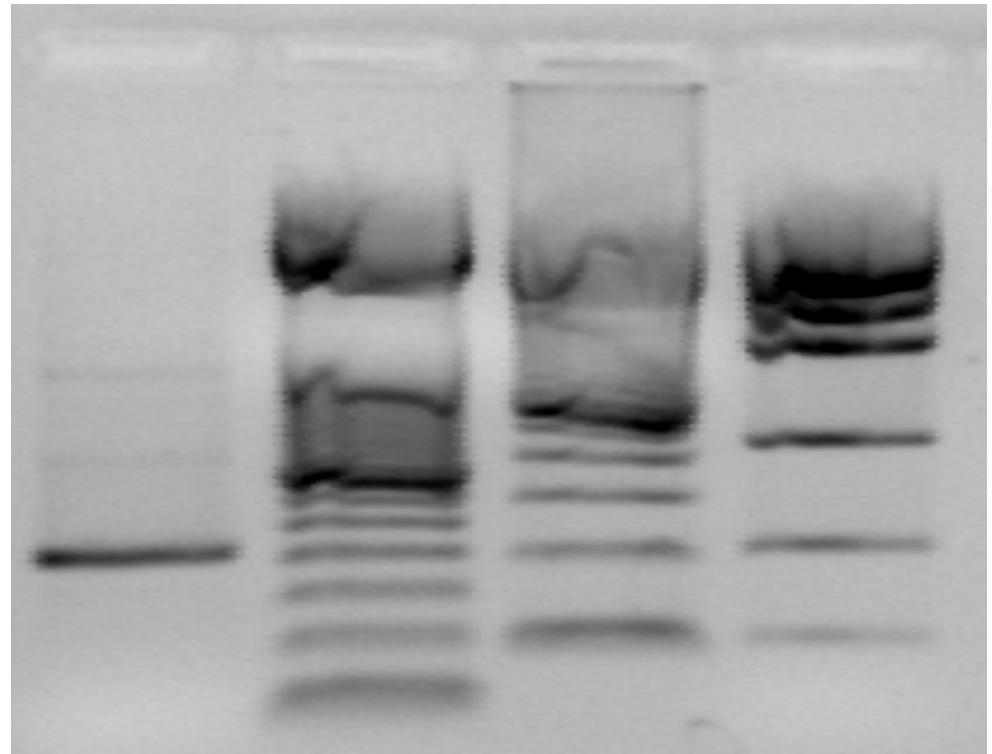
La seconda coppia di basi, disegnata all'interno del prodotto di 547bp della 1°PCR, porta ad un amplificato di **313bp** impiegando la coppia di basi EIAV DNAITA NSTDF -TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG/ EIAV DNAITA NSTDR - TTTCTGTTTCCAGCCCCATC



2° Protocollo di Nested PCR: target *gag* (2)

Katia Cappelli et al. Journal of Clinical Microbiology (2011); pp: 27-33

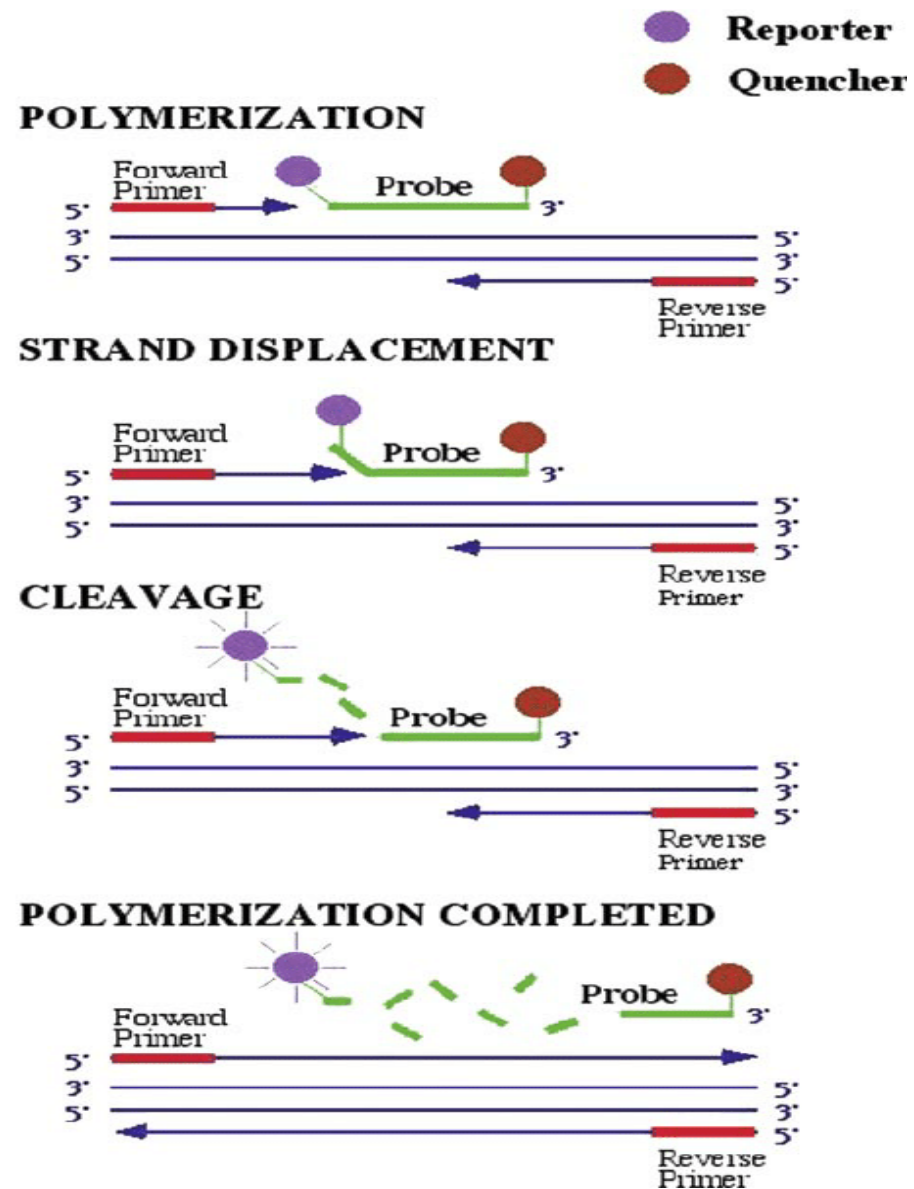
L'amplicato finale del protocollo di Nested PCR *gag* è una banda di **313bp** interna alla regione del genoma codificante per *gag*



Real Time PCR: sonda TaqMan (1)

La sonda TaqMan presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' un altro fluoroforo denominato "Quencer". Quando il reporter viene eccitato dal raggio laser emette fluorescenza che è schermata dal "Quencer" dato che i 2 fluorofori sono vicini.

Quando è presente la sequenza target (porzione del genoma virale considerata), la sonda TaqMan si ibridizza al corrispondente target. Contemporaneamente, la TaqPolimerasi continua ad allungare il filamento di DNA complementare alla stessa sequenza target fino a quando incontra il "Reporter". A questo punto, la TaqPolimerasi taglia la sonda con conseguente emissione di fluorescenza.

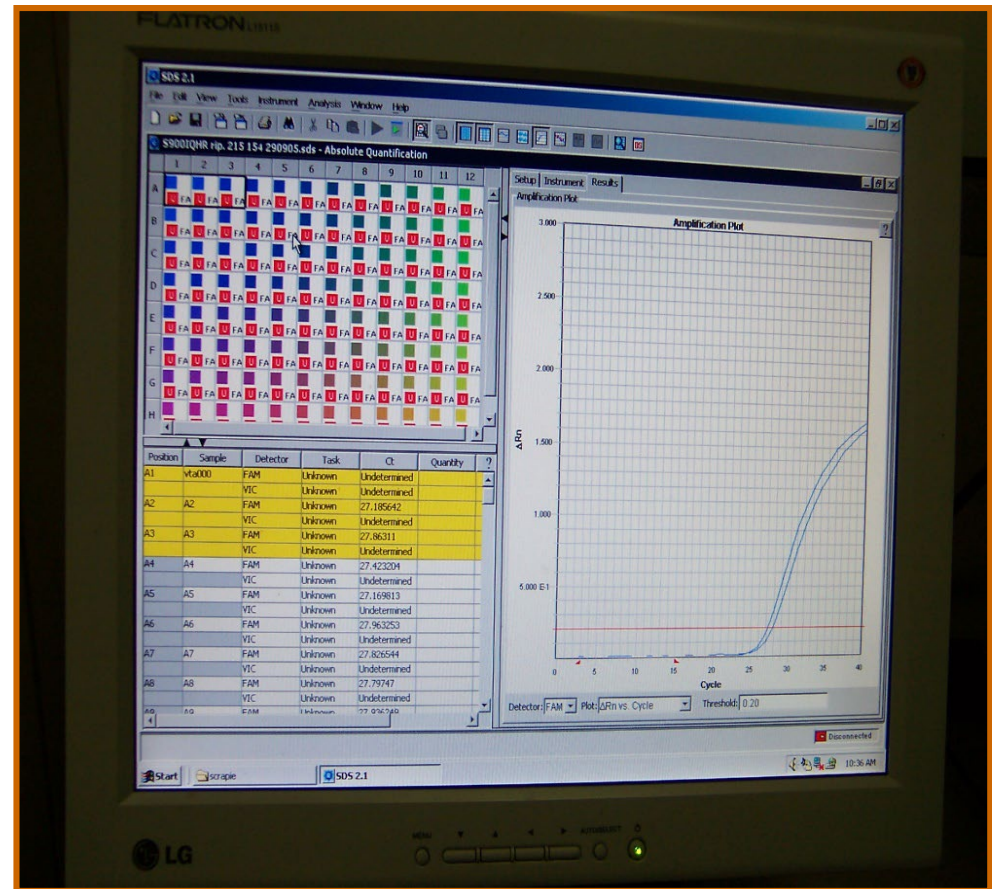


Real Time PCR: sonda TaqMan (2)

La fluorescenza emessa dal “Reporter” registrata ed elaborata dal software, viene visualizzata nello schermo dell'apparecchio sotto forma di una curva con andamento esponenziale

L'emissione di fluorescenza aumenta ad ogni ciclo di PCR in maniera proporzionale al taglio della sonda e quindi alla concentrazione dell'amplificato

Inoltre, la sonda garantisce la specificità del prodotto di PCR evitando la presenza di amplificati aspecifici

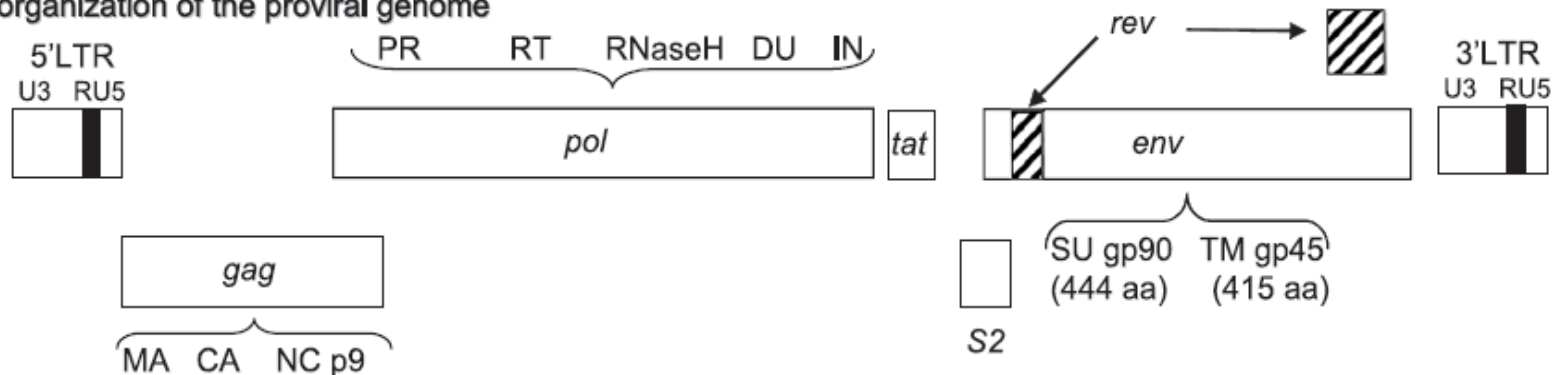


Real Time PCR a sonda TaqMan: target *tat* (1)

E' stato selezionato un protocollo di Real Time PCR (fornito dal Dr. F.R. Cook (Gluck Center, KY, USA) che può essere eseguito sia su **DNA virale (DNA provirale)** che su **RNA virale** estratti dai campioni in esame

Il protocollo di Real Time PCR è stato disegnato mediante il **multiallineamento delle sequenze**, altamente conservate, **dell'esone 1 del gene *tat*** pubblicate in GenBank (Accession Numbers: AB008197, AF327877, AF033820, JX480631, JX480632, JX480633, JX480634)

B: organization of the proviral genome



Real Time PCR a sonda TaqMan: target *tat* (2)

La regione amplificata dell'**esone 1** del gene ***tat*** è di **119bp**

La posizione e le sequenze dei primer e della sonda sono riferite alla sequenza riportata in GenBank n. AF016316 del ceppo EIAVuk

MKIII Forward: 5'-GGCGCCCGAACAGGGACC-3' (EIAVuk da 310 a 327 nucleotide)

MKIII Reverse: 5'-TGGCCAGGAACACCTCCAGAAGAC-3' (EIAuk da 405 a 428 nucleotide)

Probe EIAV (Locked Nucleic Acid – LNA) Fluorescent: 5' –FAM- T[+G]A ACC T[+G]G [+C]TG ATC G[+T]AG[+G]A-3' BHQ 1 (EIAVuk da 353 a 373)

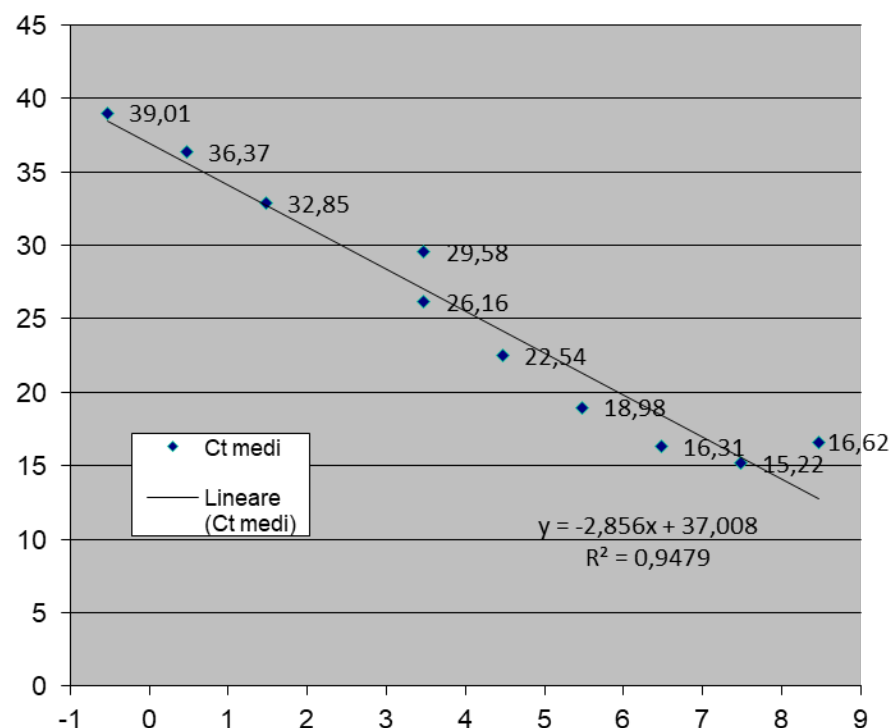


Real Time PCR a sonda TaqMan: target *tat* (3)

Il protocollo di Real Time PCR specifico per *tat* può essere

- a) **qualitativo: presenza/assenza del target *tat* e quindi presenza/assenza del virus nel campione**
- b) **quantitativo: N° di copie target (*tat*) presenti nel campione e quindi riconducibili al N° di genomi virali/campione**
- c) **Standard: plasmide contenente il target *tat* e di cui sono state allestite diluizioni scalari caratterizzate ciascuna da uno specifico N° di copie target**

Curva standard AIE



Tipologia di matrici su cui vengono applicati i protocolli molecolari (Nested PCR e Real Time PCR) (1)

Sangue intero

Buffy coats (strato leucocitario-piastrinico)

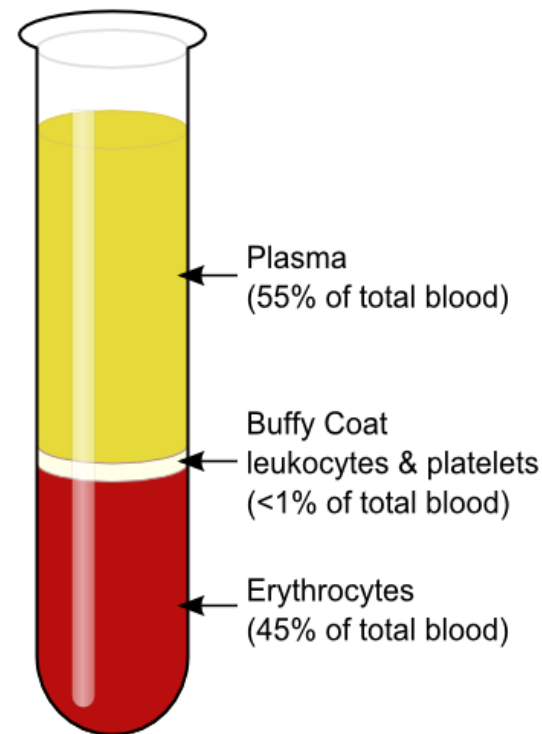
Leucociti

Monociti

Macrofagi

Linee cellulari suscettibili all'infezione con AIE virus

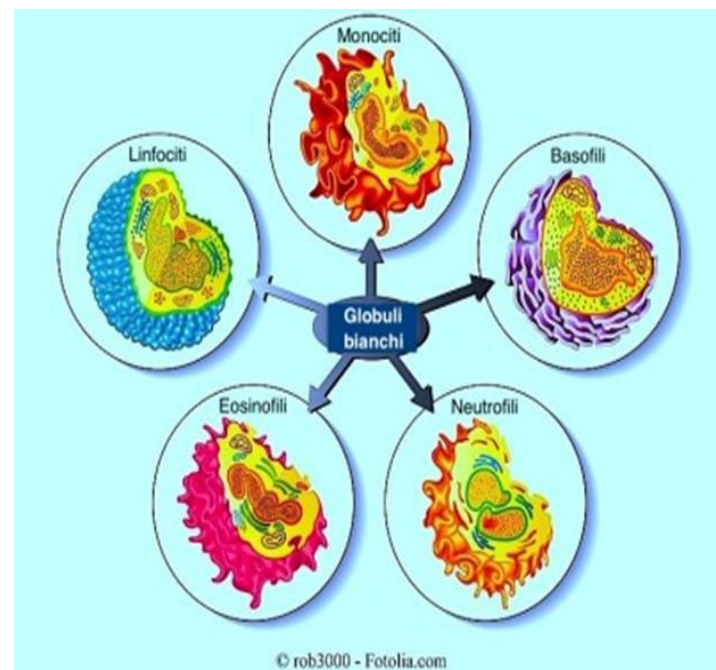
Organi (come per esempio milza)



Tipologia di matrici su cui vengono applicati i protocolli molecolari (Nested PCR e Real Time PCR) (2)

Nell'ambito della ricerca corrente IZSLT 09/17 «Studio del ruolo dell'immunità innata del cavallo nel controllo dell'infezione dell'anemia infettiva equina» sono stati esaminati con i metodi molecolari appena descritti le seguenti tipologie di campioni in modo tale da verificare la presenza/assenza del virus AIE:

- a) **59 surnatanti cellulari** derivati da **37 campioni di milza di cavalli sierologicamente positivi** su cui è stato effettuato l'**isolamento dei leucociti**
- b) **96 surnatanti cellulari e 8 criolisati** derivati da **leucociti di 8 cavalli sierologicamente positivi**
- c) **16 surnatanti cellulari** derivati da **7 campioni di leucociti**, prelevati, a cadenze temporali, da un **soggetto sieroriproduttore**



I leucociti o globuli bianchi si differenziano anche in monociti da cui derivano i macrofagi



Schema di lavoro dei campioni per i protocolli di Nested PCR e di Real Time PCR: **preparazione dei campioni (1)**

Organi, buffy coats e sangue intero: devono essere **omogenati meccanicamente in ATL** (soluzione ricca in detergenti con la funzione di rompere le membrane cellulari) mediante il **Tissue Lyser II** (Qiagen) ed utilizzando biglie di acciaio da 5 mm di diametro.

Colture cellulari, leucociti, monociti e macrofagi: **non necessitano di omogenazione** ma possono essere direttamente estratti

**Provette da 2 ml
utilizzate per
l'estrazione degli
acidi nucleici**



Schema di lavoro dei campioni per i protocolli di Nested PCR e di Real Time PCR: **estrazione degli acidi nucleici (RNA e DNA) (2)**

L' estrazione degli acidi nucleici (sia RNA che DNA) viene effettuata mediante l'impiego di estrattori automatizzati, come il **QIA Symphony** e lo **Zinext**, che utilizzano kit commerciali basati su cattura degli acidi nucleici mediante biglie magnetiche.

Questi kit hanno il vantaggio di ottenere acidi nucleici altamente purificati e quindi privi di inibenti (gruppo eme, acidi grassi, ferro) che potrebbero incidere sul corretto funzionamento dei protocolli di Nested PCR e di Real Time PCR

Inoltre, contengono una proteina-carrier- in grado di proteggere l'RNA dall'azione delle RNasi presenti nei campioni biologici



QIA Symphony



ZINEXTS



Attuazione dei protocolli molecolari Nested PCR da stampo a RNA e da stampo a DNA (3)

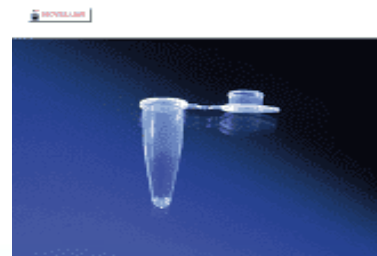
Per l'allestimento delle reazioni Nested PCR partendo da **stampo ad RNA** occorre effettuare:

- a) **sintesi del DNA copia (cDNA)** – High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific) utilizzando 30 µl di RNA
- b) **Nested PCR per i target *LTR-tat* (203bp) e *gag* (313bp).** Per la Nested PCR deve essere allestita la 1° reazione di PCR utilizzando 5 µl di cDNA e la 1° coppia di primer esterni al target e poi la 2° reazione di PCR utilizzando 5 µl del prodotto della 1° reazione di PCR e la 2° coppia di primer interni, ossia in grado di appaiarsi alle sequenze nucleotiche complementari presenti nel prodotto della 1° reazione di PCR. Il kit utilizzato è Platinum™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) la cui TaqPolimerasi ha la funzione di **correzione di bozze** e quindi riduce enormemente l'inserimento di nucleotidi non complementari allo stampo. Funzione importante per il sequenziamento dei prodotti di Nested PCR.
- c) I prodotti delle Nested PCR vengono visualizzati mediante corsa elettroforetica (Qiaxcell)

Verity™ 96-Well Fast Thermal Cycler - amplificatore



Da stampo a DNA si effettuano i passaggi riportati nel punto b) saltando la fase di sintesi del cDNA



Provette da
0,2ml per PCR

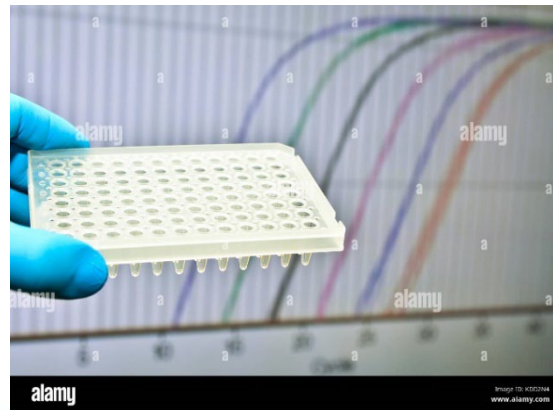
Attuazione del protocollo molecolare Real Time PCR **target tat** da stampo a RNA e da stampo a DNA (4)

Per l'allestimento della reazione di Real Time PCR per il **target tat** da **stampo ad RNA** occorre effettuare:

- a) **sintesi del DNA copia (cDNA)** – High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific) utilizzando 30 µl di RNA
- b) **Real Time PCR target tat.** Per l'allestimento della Real Time PCR target tat viene impiegato come stampo 5µl di cDNA ed il kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific)
- c) **Se si parte da stampo a DNA,** si effettua direttamente la **Real Time PCR target tat** utilizzando 5µl di DNA **estratto**, saltando la fase di sintesi del cDNA



QuantStudio 7 Flex Real Time PCR System, Applied Biosystems, Thermofisher Scientific



Piastra Real Time PCR



Sequenziamento Sanger dei prodotti di Nested PCR *LTR-tat* (1)

Gli amplificati, ottenuti con il protocollo di Nested PCR *LTR-tat*, sono risultati **idonei per il sequenziamento Sanger** in quanto rappresentano **una regione di 203bp del genoma virale meglio conservata e non soggetta a mutazioni e ricombinazioni** ma, comunque, adatta per identificare i ceppi EIAV circolanti rilevati nei campioni dei surnatanti cellulari esaminati nell'ambito della ricerca corrente IZSLT 09/17

Principio su cui si basa il Sequenziamento Sanger

L'amplificato *LTR-tat* di 203 bp viene sottoposto ad uno specifico protocollo di PCR in cui i reagenti sono costituiti da: a) i primer *LTR-tat* (relativi alla 2° reazione di Nested PCR); b) la DNA Polimerasi; c) miscela dei 4 deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); d) **miscela dei 4 dideossinucleotidi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcati ciascuno con un fluoroforo diverso** e, nella miscela di reazione, sono presenti in concentrazione stechiometricamente inferiore rispetto ai deossinucleotidi.

I dideossinucleotidi, ciascuno marcato con uno specifico fluoroforo, impediscono il legame con un altro deossinucleotide a causa della mancanza del gruppo –OH sul carbonio 2' e 3'



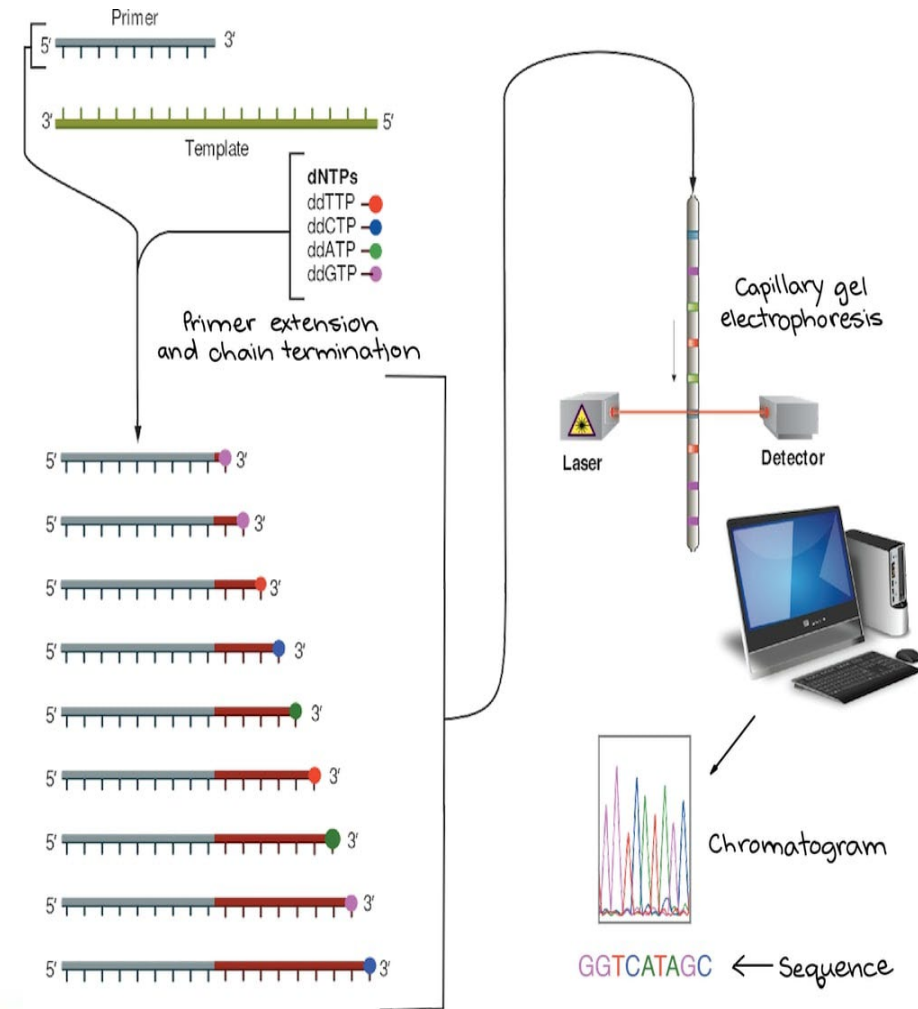
Sequenziamento Sanger dei prodotti di Nested PCR *LTR-tat* (2)

L'incorporazione di ciascun dideossinucleotide lungo il filamento di DNA in estensione ne **causa la terminazione prima del raggiungimento della fine della sequenza di DNA stampo**

Si genera così una serie di **frammenti marcati**, ossia **frammenti di DNA di lunghezza diversa interrotti in corrispondenza della incorporazione dei dideossinucleotidi** e questo avviene **casualmente**

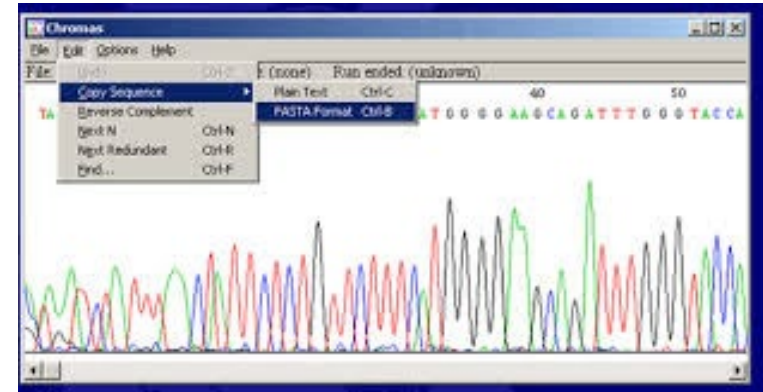
I **frammenti marcati** vengono separati elettroforeticamente in modo tale da identificare il **nucleotide marcato alla loro estremità** in base al **fluoroforo associato**

Si ottiene così il **cromatogramma**, **sequenza di picchi colorati corrispondenti ai dideossinucleotidi marcati**, che viene elaborato dal software in **sequenza di nucleotidi**



Schema di lavoro per il sequenziamento Sanger degli amplificati Nested PCR *LTR-tat*

- 1) **Purifica dei prodotti di Nested PCR *LTR-tat* (203bp)** mediante QIAquick PCR Purification kit (Qiagen); questo passaggio serve per eliminare i reagenti della Nested PCR rimasti (TaqPolimerasi, Buffer, primer)
- 2) **Reazione di marcatura con i dideossinucleotidi marcati** mediante Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, version 3.1 (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific) ed utilizzando i primer della seconda reazione di amplificazione per il protocollo di Nested PCR *LTR-tat*
- 3) **Rimozione dei componenti della reazione di marcatura non utilizzati** (dideossinucleotidi marcati, deossinucleotidi, primer, TaqPolimerasi, Buffer di reazione)
- 4) **Sequenziamento automatizzato** utilizzando **ABI PRISM 310 Genetic Analyzer** (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific)
- 5) **Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state sia analizzate che comparate con quelle presenti NCBI GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizzando il programma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)



Cromatogramma che viene elaborato dal software in sequenza nucleotidica



ABI PRISM 310 Genetic Analyzer



Risultati sequenziamento Sanger dei prodotti della Nested PCR *LTR-tat*

Sono stati rilevati i seguenti ceppi AIE:

- 1) ceppo AIE con **identità di sequenza 89% e query-cover 100%** con la sequenza Accession Number **LC185347.1** (*Equine infectious anemia virus* DNA long terminal repeat, clone EIAV-Mongolia). Rilevato da milza di 1 soggetto, **focolaio Taranto**
- 2) ceppo AIE con **identità di sequenza 95% e query-cover 99%** con la sequenza Accession Number **GQ996593** (*Equine infectious anemia virus strain 273-091-Austria*). Rilevato dai leucociti e milze di 2 degli 8 soggetti, **focolaio Frosinone** e sangue e leucociti del **soggetto sieroriproduttore**)
- 3) ceppo AIE con **identità di sequenza 89,90% e query.cover 95%** con la sequenza Accession Number **JX480652.1** (*Equine infectious anemia virus isolate F3 clone –Irlanda*). Rilevato da sangue di 1 dei 3 soggetti, **focolaio Cassino**

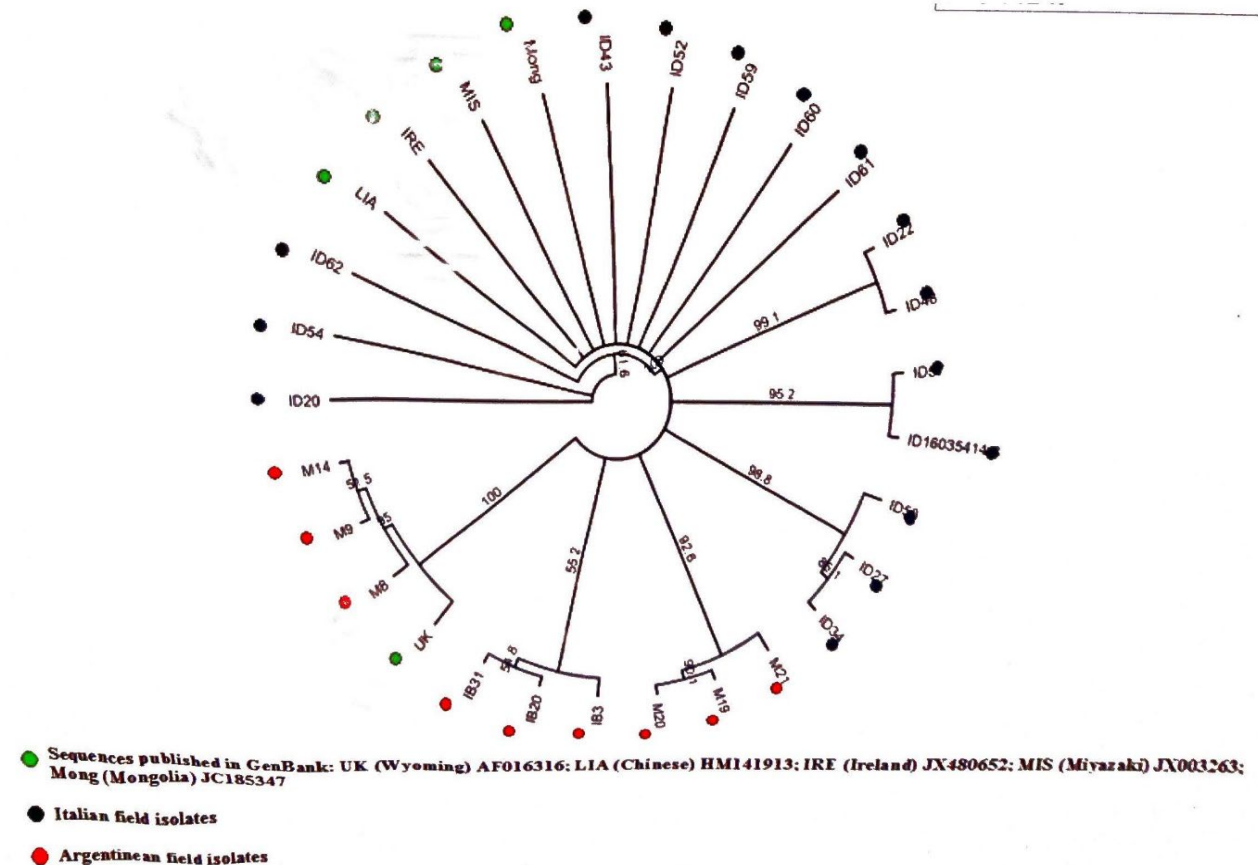


18 WAVLD (2018) Characterisation of a portion of LTR-TAT Exon1 Equine Infectious Anaemia virus genomic sequences suggest co-circulation of multiple monophyletic groups within a formerly endemic area of Italy

Questo risultato conferma la circolazione in Italia di ceppi correlati ai ceppi Asiatici (isolati Liaoning, Miyazaki, Mongolia), ai ceppi del nuovo mondo (isolati Wyoming, Argentina) ed ai ceppi Irlandesi.

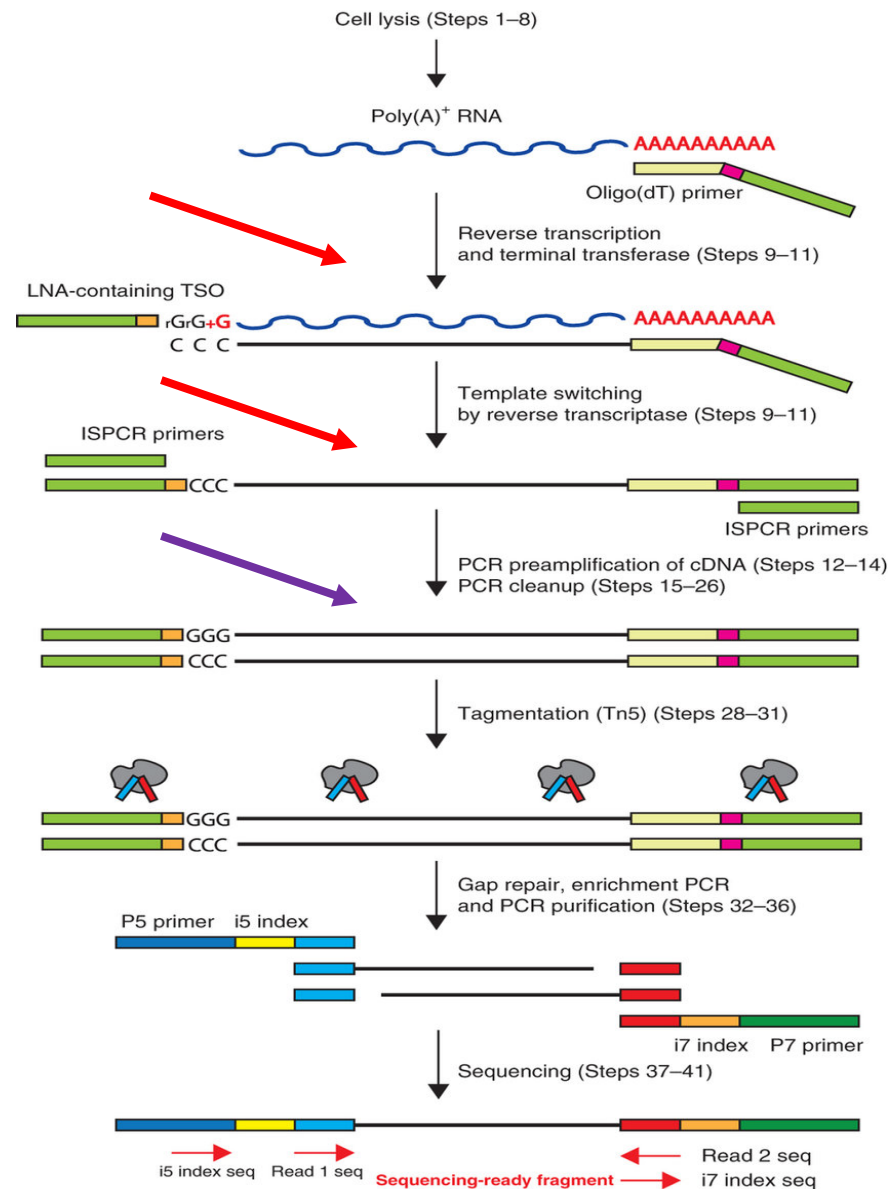
Come è stato anche rilevato nello studio 2018 dove sono stati esaminati gli amplificati *LTR-tat* ottenuti da campioni di sangue intero raccolti tra il 2008 ed il 2016 da cavalli e muli

Suggerendo multiple introduzioni del virus AIE in Italia, che successivamente hanno portato alla evoluzione di ceppi geneticamente distinti (9 gruppi monofiletici)



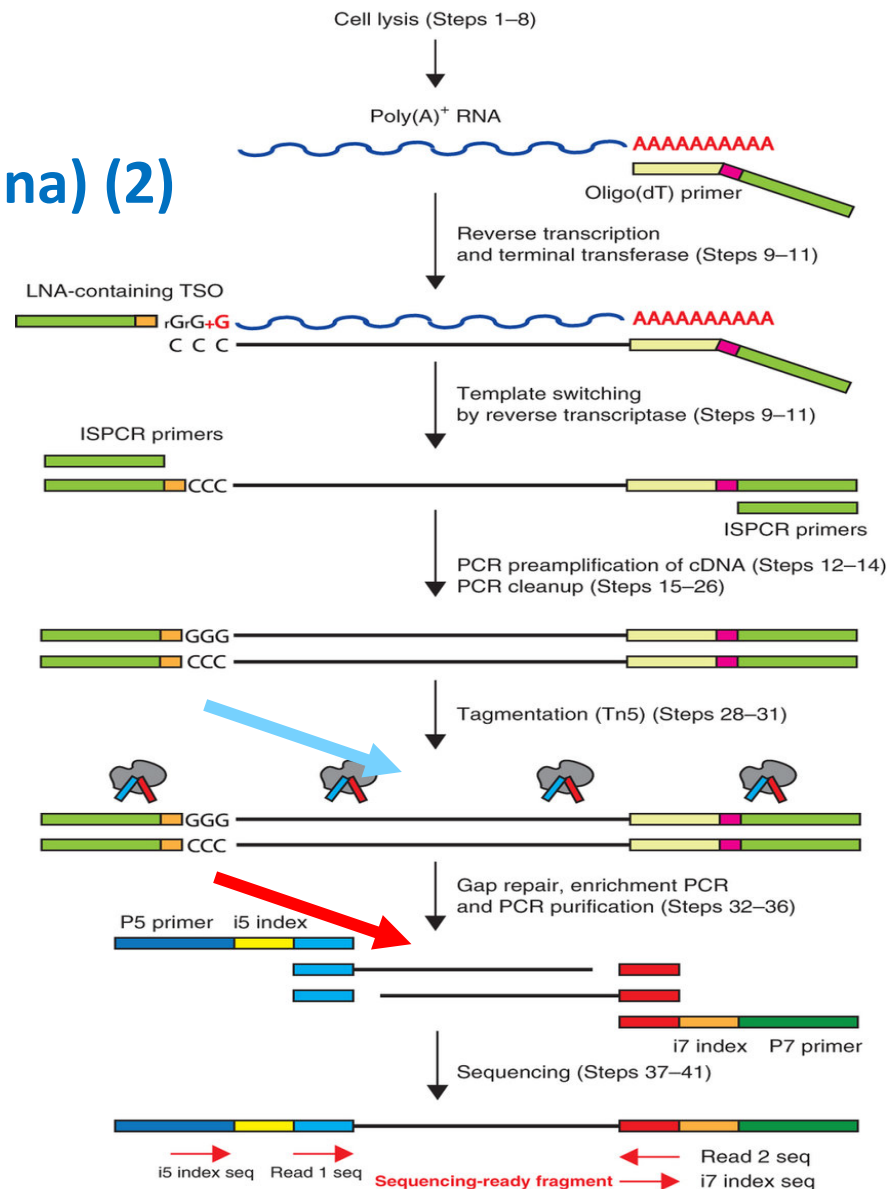
NGS: Protocollo NEXTERA (Illumina) (1)

- 1) **Concentrazione del virus** mediante filtri Centricon con taglio molecolare di 100KDa partendo da 10 ml di coltura cellulare
- 2) **Estrazione dell'RNA** e sua **quantificazione** mediante **Qubit**
- 3) Come indicato dalle **frecce rosse** **sintesi del DNA copia (cDNA)** –partendo dall'RNA - effettuata in **due fasi successive** utilizzando il kit Thermo Scientific Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis kit
- 4) Come indicato dalla **freccia viola** **purifica del cDNA**, che comprende anche il **genoma virale** trascritto da RNA a DNA, mediante il kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey Nagel) e sua **quantificazione** con il **Qubit**



NGS: Protocollo NEXTERA (Illumina) (2)

- 5) Come indicato dalla **freccia celeste**, si passa alla fase di produzione della libreria - **protocollo NEXTERA** -, in cui il cDNA viene frammentato mediante l'impiego di trasposoni P5-fase di tagmentazione
- 6) Come indicato dalla **freccia rossa**, si continua con la fase di produzione della libreria, mediante una reazione di ligasi in cui ai frammenti di DNA dotati del tag P5 in posizione 5' viene legata alla loro estremità 3' il tag P7 (adattatore di sequenziamento)
- 7) Sempre come indicato dalla **freccia rossa**, si continua con la fase di produzione della libreria, e si esegue una reazione di PCR utilizzando primer specifici per i tag P5 e P7 in modo tale da amplificare i frammenti di DNA dotati di entrambi i tag P5/P7

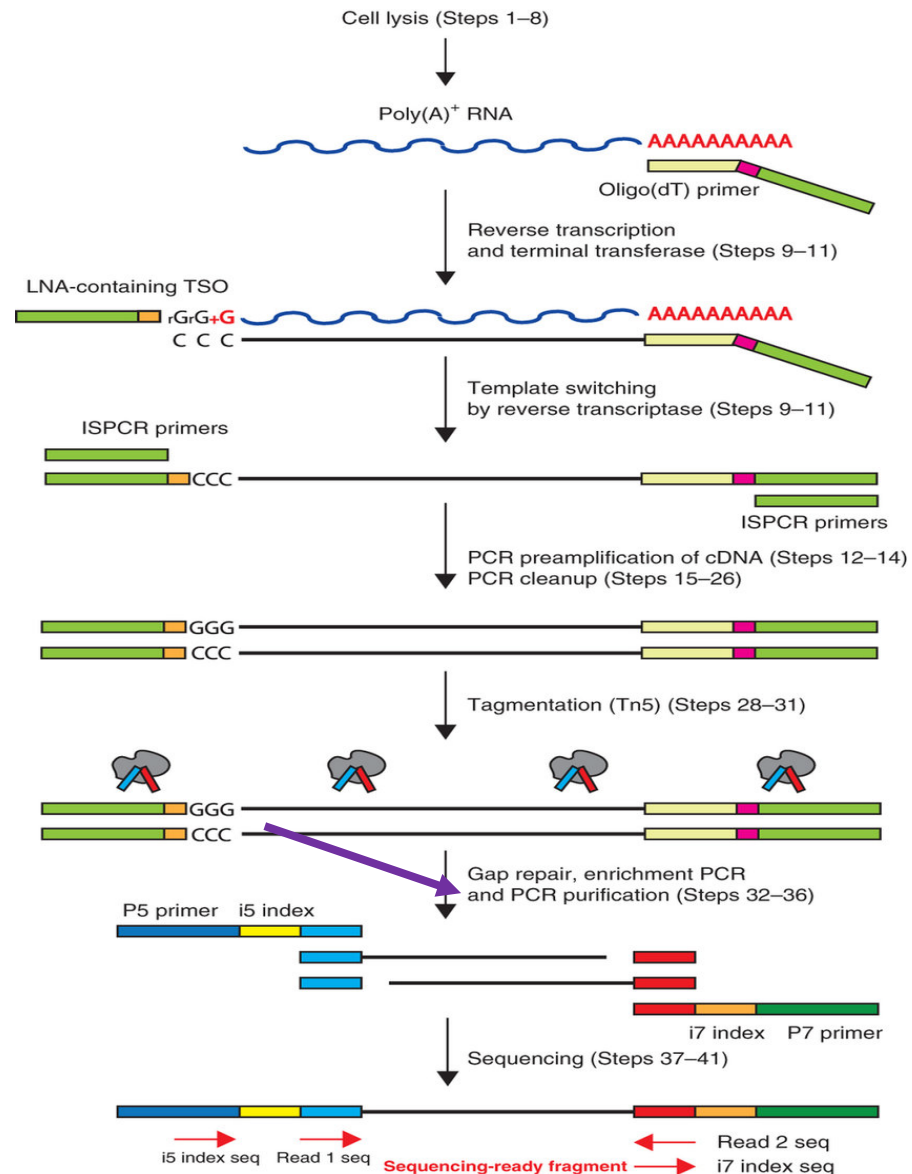


NGS: Protocollo NEXTERA (Illumina) (3)

8) Come indicato dalla **freccia viola**, si prosegue con la fase di **CLEAN-UP** della libreria in modo tale da **selezionare i frammenti di circa 400 – 450bp**

9) Si **quantificano** i frammenti di circa 400-450bp mediante il **Qubit**

10) Si passa alla fase **MiSeq Run**, effettuata all'interno di apposite **celle di sequenziamento – flow cell**. In questa fase di sequenziamento vanno fissati i parametri del sequenziamento massivo in modo tale da ottenere **stringhe di sequenze**, denominate **Reads**, che, non contenendo **sequenze** identiche ripetute, mantengono una **buona qualità nella composizione in nucleotidi**. Per AIE virus sono state ottenute sequenze caratterizzate da dimensioni comprese tra **9.000.000 a 37.000.000 Megabasi**



Campioni analizzati in NGS

(presso Università degli Studi di Torino, Prof S. Rosati e Dott. L. Bertolotti, Raffaella Conti) (1)

Sono stati selezionati per essere sottoposti ad NGS , in base alla positività alla Real Time PCR ed ai valori di RT-activity, **3 campioni**:

- a) **surnatante** relativo alla **raccolta R4** ottenuta dai leucociti del **soggetto n.1** proveniente da focolaio **Frosinone**
- b) **surnatante** relativo alla **raccolta R4** ottenuta dai leucociti del **soggetto n.2** proveniente da focolaio **Frosinone**
- c) **surnatante** relativo alla **raccolta R3** ottenuta dai leucociti di un prelievo di sangue del **soggetto sieroprodotto**

CAMPIONE	Rt-Activity	Real Time Cook stampo a DNA	Real Time Cook stampo a RNA
18014006/1 R4 (A+E) 18h 13/03/2018	ESITO NEGATIVO per tutte le incubazioni e letture effettuate.	41,96	35,5
18014006/2 R4 (A+E) 18h 13/03/18	Incubazione overnight e lettura allo spettrofotometro dopo 2 ore: 0,868 Concentrazione in picogrammi/pozzetto: 0,233pg/pozzetto	Positivo sulle altre raccolte, in attesa delle provette portate a Torino per ripetere sulla R4 la Real Time	Positivo sulle altre raccolte, in attesa delle provette portate a Torino per ripetere sulla R4 la Real Time
18043590/1 PBMC R3 08/06/2018	Incubazione overnight e lettura allo spettrofotometro dopo overnight: 3,9035 Concentrazione in picogrammi/pozzetto: 2,4373pg/pozzetto Per la raccolta R3 va segnalato che <u>il risultato migliore</u> è stato ottenuto con l'incubazione di 3 ore e lettura allo spettrofotometro dopo 2 ore: 0,2192 Pari alla concentrazione in picogrammi/pozzetto: 3,1010 pg/pozzetto	36,1	30,1

Tabella Criteri di selezione dei campioni: Real Time positiva ed elevati valori di Retrotrascrittasi virale; quest'ultima indice di replicazione virale in atto



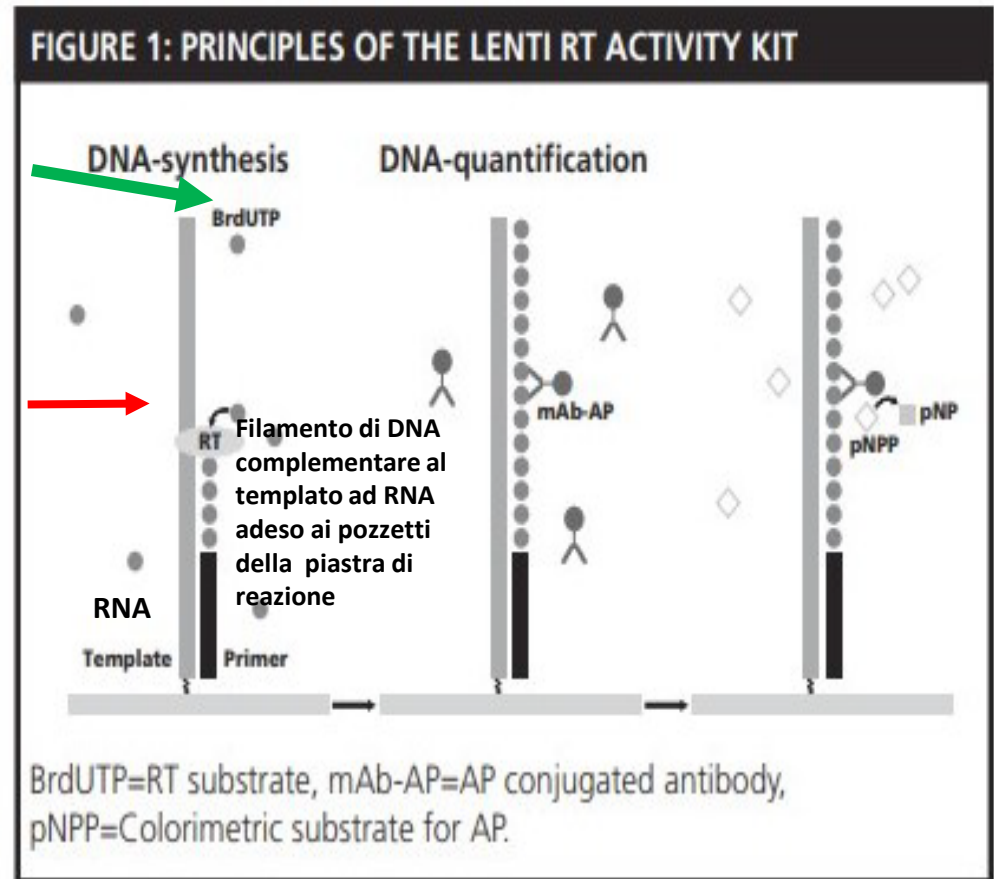


Lenti RT Activity kit (CAVIDI, Uppsala, Sweeden)(1)

Come abbiamo già visto, il test della RT-activity, abbinato ai risultati positivi delle Nested PCR e della Real Time, è servito come elemento di selezione dei campioni idonei per lo studio in NGS

In dettaglio, il test **RT-activity** serve per **verificare la presenza della replicazione virale sulle raccolte dei surnatanti delle colture cellulari dei leucociti**, prelevate settimanalmente, utilizzando l'**ELISA Lenti RT-activity kit**

Il principio del kit consiste nel **rilevare l'attività della trascrittasi inversa (indicata con la freccia rossa)**, un enzima specifico di tutti i retrovirus, attraverso un **metodo colorimetrico che evidenzia l'incorporazione del nucleotide marcato (indicato dalla freccia verde -5-bromo-3-deoxyribouridine5'-triphosphate – BrdUTP-) in un filamento di DNA complementare al template ad RNA** adeso alla base dei pozzetti della piastra di reazione



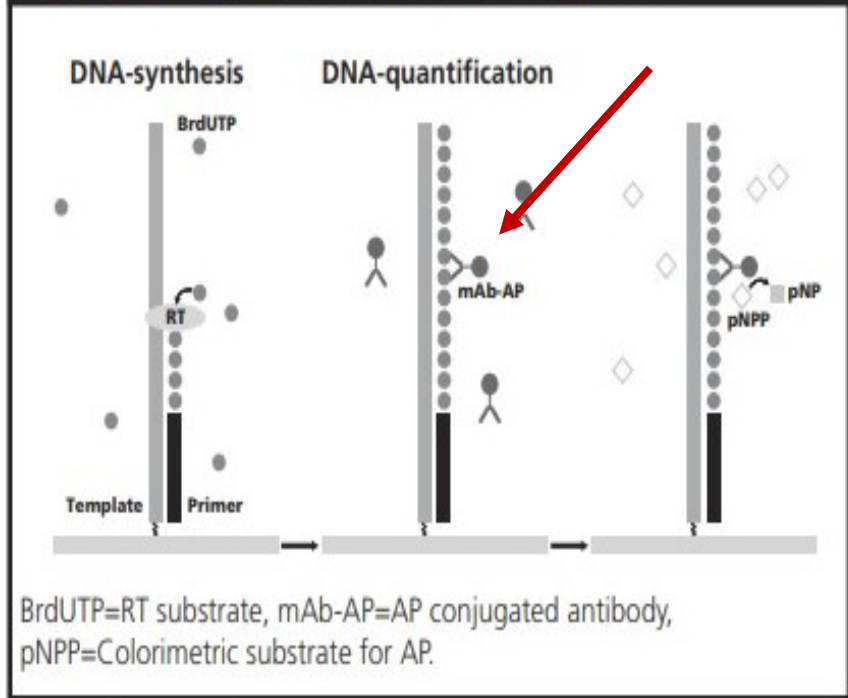
Lenti RT Activity kit (CAVIDI, Uppsala, Sweeden)(2)

Le molecole a doppio filamento RNA/DNA con nucleotide marcato – **BrdUTP** – vengono riconosciute e legate **dall'anticorpo anti nucleotide marcato coniugato alla fosfatasi alcalina (freccia marrone) - mAB-AP**

Con l'aggiunta del substrato della fosfatasi alcalina è possibile **non soltanto rilevare, ma anche quantificare la attività della trascrittasi inversa (RT-activity)**

La quantificazione della attività della trascrittasi inversa (RT-activity) presente nel campione analizzato è possibile tramite confronto con i valori di trascrittasi inversa, a diverse concentrazioni/pozzetto della piastra di reazione, di un apposito standard costituito dalla trascrittasi inversa del virus HIV umano (HIV-1RT) ricombinante

FIGURE 1: PRINCIPLES OF THE LENTI RT ACTIVITY KIT



PROTOCOL B - SCREENING FOR RT ACTIVITY

Dilution step:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pg/well	59.7	26.5	11.8	5.24	2.33	1.04	0.460	0.205	0.0909	0.0404	0.0180	0.0080
pg/ml	5970	2653	1179	524.1	232.9	103.5	46.0	20.5	9.09	4.04	1.80	0.798

REF 22003-03

Standard HIV-1RT



Lenti RT Activity kit (CAVIDI, Uppsala, Sweeden): protocollo operativo (1)

I campioni vengono analizzati in doppio ed il volume di surnatante delle colture cellulari di leucociti da esaminare è pari a **10 µl**

L'avvenuta incorporazione del nucleotide marcato **BrdUTP** viene misurata mediante la lettura del valore dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di **405 (A₄₀₅)**, tramite **Multiscan Fc (Thermo Scientific)**, eseguita a diversi tempi di incubazione dopo l'aggiunta del substrato della fosfatasi alcalina: **a) 2ore;** **b) 3 ore;** **c) 24 ore**



Multiscan FC (themo Scientific)

FIGURE 3: SET-UP OF THE POLY A PLATES FOR PROTOCOL B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	①	9	17	25	33	41	49	57	65	73	Ⓢ1	Ⓢ9
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	Ⓢ2	Ⓢ10
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	Ⓢ3	Ⓢ11
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	Ⓢ4	Ⓢ12
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	Ⓢ5	Bb
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	Ⓢ6	Bb
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	Ⓢ7	Bb
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	Ⓢ8	Bb

① = Sample number

Ⓢ = Buffer blank

Ⓢ1 = HIV-1 rRT Standard

Schema caricamento piastra contenente lo standard HIV-1RT

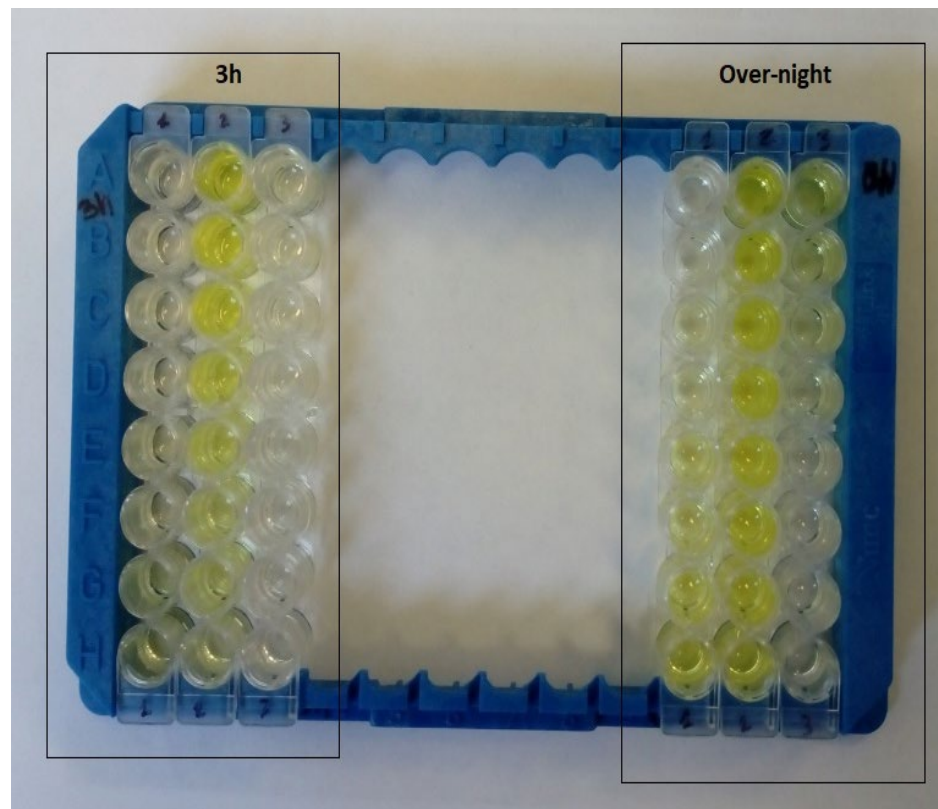


Lenti RT Activity kit (CAVIDI, Uppsala, Sweeden): protocollo operativo (2)

I valori delle A_{405} dei campioni analizzati sono ritenuti validi quando presentano un valore almeno doppio rispetto a quello dell' A_{405} del bianco

Per assegnare a ciascun campione il valore di A_{405} esatto devono essere considerati i seguenti parametri: a) la media del valore di trascrittasi inversa (RT-activity) delle due repliche del campione; b) come valori di trascrittasi inversa (RT-activity) più elevati da considerare come definitivi sono quelli delle incubazioni a 2 e 24 ore

Per la valutazione della quantità di trascrittasi inversa (RT-activity) prodotta dal campione, deve essere confrontato il valore dell' A_{405} del campione con i valori delle A_{405} di specifiche diluizioni scalari dello standard a concentrazione nota di trascrittasi inversa (RT-activity). Standard: costituito da trascrittasi inversa del virus HIV umano (HIV-1RT) ricombinante



RT-activity dei campioni nella piastra del kit ELISA Lenti RT-Activity



Lenti RT Activity kit (CAVIDI, Uppsala, Sweeden): risultati ottenuti (3)

I migliori risultati della attività di trascrittasi inversa sono stati:

- 1) **0,118 pg/pozzetto** per il surnatante relativo alla **raccolta R4** ottenuta dai **leucociti** del **soggetto n.1** proveniente dal focolaio **Frosinone**
- 2) **0,233 pg/pozzetto** per il surnatante relativo alla **raccolta R4** ottenuta dai **leucociti** del **soggetto n. 2** proveniente dal focolaio **Frosinone**
- 3) **3,1010 pg/pozzetto** per il surnatante relativo alla **raccolta R3** ottenuta dai **leucociti** del **soggetto sieroriproduttore**

Componenti Kit

2 piastre **Poly-A**

1 **Lenti Sample Diluition Buffer**

2 **Lenti RT Reaction Components**

1 **Lenti Reconstitution Buffer**

1 **HIV-1 rRT Standard Lenti**

1 pastra **Wash Buffer HS concentrato**

2 pellicole adesive

2 copri piastra in plastica



Incubatore

