

PRIMO CASO DI GENOTIPO RICOMBINANTE 2K/1B IN PAZIENTE ITALIANO CON INFEZIONE DA HCV: CARATTERIZZAZIONE COMPLETA DEL GENOMA MEDIANTE NGS

C. Perini¹, A. Ramuscello¹, G. Colavecchia¹, C. Scarparo³, P. Carraro¹, F. Cattelan², S. Panese², M. Favarato¹

¹UOC Laboratorio Analisi-UOS Diagnostica Molecolare, AULSS 3 Serenissima, Venezia

²UOC Malattie Infettive, AULSS 3 Serenissima, Venezia

³UOC Microbiologia, AULSS 3 Serenissima, Venezia

INTRODUZIONE

A gennaio del 2017 abbiamo eseguito quantificazione HCV-RNA e genotipizzazione in un paziente tossicodipendente italiano di 26 anni, contagiatosi nel 2016 per scambio di siringhe infette. Dati di tipizzazione virale pregressi indicavano un'infezione da genotipo 2a/2c. La genotipizzazione da noi condotta mediante Reverse Line Blot (nelle regioni 5' UTR e CORE) confermava questo risultato, mentre la tipizzazione in Real Time PCR nelle regioni 5'UTR e NS5b dava evidenza di due diversi genotipi: HCV 2 nella 5'UTR e HCV 1b nella NS5b. Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare e caratterizzare, prima con sequenziamento Sanger e poi con Whole Genome Sequencing (WGS) in NGS, il genotipo presente.

METODI

La genotipizzazione è stata effettuata su RNA estratto da 500 µL di plasma, utilizzando i kit VERSANT HCV Genotype 2.0 (Siemens) e Abbott RealTime HCV Genotype II (Abbott). Il sequenziamento diretto di 5'UTR e NS5b (ABL SA) è stato condotto su piattaforma ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem). Il WGS è stato eseguito su piattaforma MiSeq-DX (Illumina) usando il kit MiSeq v2 300 cycle; è stata effettuata la digestione di 20 µL di RNA totale con l'enzima DNase I (QIAGEN) e la deplezione dell'RNA ribosomiale (NEBNext® rRNA Depletion). L'RNA è stato retrotrascritto usando random primers e SuperScript™ IV First-Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific). La libreria è stata preparata con NEBNext Ultra Library Prep in combinazione con NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (NEB) e amplificata con il kit KAPA HiFi HotStart (KAPA Biosystems). Le reads del campione sono state processate mediante una pipeline custom.

RISULTATI

I sequenziamenti Sanger nelle regioni 5'UTR e NS5B hanno confermato un'omologia di sequenza del 97% (valore medio) per il genotipo 2k/1b nell'analisi di allineamento rispetto alla sequenza originale AY587845.1 dati ottenuti con il WGS hanno confermato il genoma ricombinante HCV 2k/1b del campione. Sono state ottenute 633.876 reads totali, di cui 6.875 attribuite ad HCV. Il punto di ricombinazione nel genoma è stato localizzato nel gene NS2, posizioni nucleotidiche 3160-3180 (genoma di riferimento H77). La coverage è di 99.3% con una profondità media di 103X.

CONCLUSIONI

Le diverse potenzialità delle tecnologie utilizzate hanno permesso di identificare e caratterizzare il genotipo ricombinante 2k/1b, descritto per la prima volta a San Pietroburgo nel 2002 ma ancora mai riscontrato in pazienti di nazionalità italiana. L'analisi WGS ottimizzata ha permesso di confermare il genotipo ricombinante e localizzare il punto di rottura. Un'analisi filogenetica potrà fornire ulteriori elementi per definire l'origine del ricombinante.