

Ricerca corrente IZS VE 10/19

Sequenziamento di terza generazione: sviluppo di strategie innovative per l'identificazione e la caratterizzazione di virus prioritari per il settore avicolo

Responsabile scientifico: Isabella Monne

I virus dell'influenza aviaria (IAV), la bronchite infettiva (IBV) e la malattia di Newcastle (NDV) sono responsabili delle patologie virali di maggiore rilevanza sanitaria ed economica per il settore avicolo su scala globale e, nel caso di IAV, anche per la sanità pubblica dato il suo potenziale zoonosico.

Tali infezioni sono causate da virus ad RNA che si caratterizzano per un'estrema variabilità genetica. Le metodiche molecolari classiche, basate sull'amplificazione di un target specifico e il sequenziamento Sanger, si sono dimostrate inadeguate all'identificazione delle molteplici varianti conosciute ed emergenti di tali patogeni e all'analisi della diversità delle popolazioni virali all'interno di un campione. Lo studio delle popolazioni virali e l'identificazione di patogeni emergenti hanno beneficiato delle tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS) dette anche tecnologie di sequenziamento di seconda generazione; tuttavia, tali strumenti hanno evidenziato notevoli limiti che ne hanno in parte impedito l'uso a fini diagnostici, quali costi elevati, lunghi tempi di analisi e ridotta dimensione delle read.

Il presente progetto ha lo scopo di esplorare le potenzialità del sequenziamento di terza generazione per la caratterizzazione di IAV, IBV ed NDV. Verranno quindi sviluppati protocolli basati sull'utilizzo dello strumento MinION, Oxford Nanopore Technologies (ONT). Il MinION si caratterizza, rispetto agli strumenti di prima e seconda generazione, per alcune peculiarità che lo rendono un candidato ideale per identificare e sequenziare i suddetti virus aviari: minor costo di investimento iniziale e manutenzione della strumentazione, brevi tempi di analisi, ridotto costo per campione nel caso di multiplexing, sequenze di lunghezza maggiore (diverse kilobasi) e portabilità del sistema che si adatta alle indagini di campo dato il peso di soli 100 g. Gli obiettivi specifici del progetto sono quindi riassumibili in:

- sviluppo e valutazione delle performance di protocolli di sequenziamento di terza generazione basati sull'amplificazione target di geni "informativi" per IAV, IBV e NDV
- sviluppo e valutazione della performance di protocolli di sequenziamento diretto degli acidi nucleici basati sulla tecnologia di terza generazione.