



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE E TRASLAZIONALE
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE E MEDICINA TRASLAZIONALE

Microbiologia e Virologia

CICLO
XXXVIII

Enterovirus nel periodo post-pandemico: isolamento e caratterizzazione di
una variante di Echovirus 11 ad alta patogenicità

Leonardo Sclavi

Francesca Caccuri
Arnaldo Caruso

Sommario

Introduzione.....	1
Enterovirus.....	1
Classificazione	3
Struttura	5
Ciclo replicativo.....	7
Echovirus 11.....	14
Scopo della tesi.....	17
Materiali e metodi	18
Design dello studio retrospettivo sui virus respiratori.....	18
Rilevazione dei virus respiratori.....	18
Colture cellulari	19
Isolamento, titolazione e propagazione virale	19
Next generation sequencing e genotipizzazione.....	21
Analisi delle quasi-specie	22
Digital droplet PCR (ddPCR)	23
Analisi genetica	24
Analisi dell'apoptosi.....	25
Esperimenti di Surface Plasmon Resonance (SPR).....	26
Analisi statistica dei dati.....	27
Risultati	28
Diffusione dei virus respiratori nel periodo pre e post-pandemia da SARS CoV-2.....	28
Diffusione stagionale dei virus respiratori	30
Genotipizzazione dei Rhinovirus ed Enterovirus	31
Caratteristiche molecolari del nuovo isolato ricombinante di Echovirus 11.....	34
Stabilità genomica del ceppo Leonard di Echovirus 11 durante la propagazione in vitro	36
Il ceppo Leonard mostra un effetto citopatico maggiore rispetto al ceppo prototipo Gregory.....	37
Il ceppo Leonard ha la capacità di indurre l'apoptosi estrinseca	40
Il ceppo Leonard induce l'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi legandosi direttamente al recettore FAS	42
Discussione	46
Bibliografia.....	50

Introduzione

Enterovirus

Gli Enterovirus sono un genere di piccoli virus a RNA (15–30 nm) appartenenti alla famiglia dei *Picornaviridae* e associati a una varietà di patologie umane. Questi virus sono caratterizzati da un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva (+) e dalla mancanza di un involucro lipidico esterno, motivo per cui vengono definiti “virus nudi”. Questi virus si trasmettono principalmente per via oro-fecale o respiratoria e a partire da questi siti primari di replicazione — nel tratto gastrointestinale o respiratorio — possono poi diffondersi e infettare altri tessuti e organi, incluso il sistema nervoso centrale^{1,2}. La poliomielite, causata dal poliovirus, rappresenta storicamente la malattia più nota associata agli enterovirus. Tuttavia, sebbene la maggior parte delle infezioni da questi virus risulti essere asintomatica, altre specie di enterovirus non poliomielitici (NPEV) possono provocare un’ampia gamma di patologie, con manifestazioni cliniche e livelli di gravità variabili, che si osservano più frequentemente nei neonati, nei bambini piccoli e negli individui immunocompromessi³. Coxsackievirus, Echovirus e numerosi altri enterovirus rappresentano le principali cause virali di meningite asettica. Inoltre, possono provocare sepsi neonatale, encefalite, paralisi flaccida acuta (AFP), sindrome febbrile aspecifica, malattia mani-piedi-bocca (HFMD), herpangina, pleurodinia, pericardite e miocardite^{4,5}.

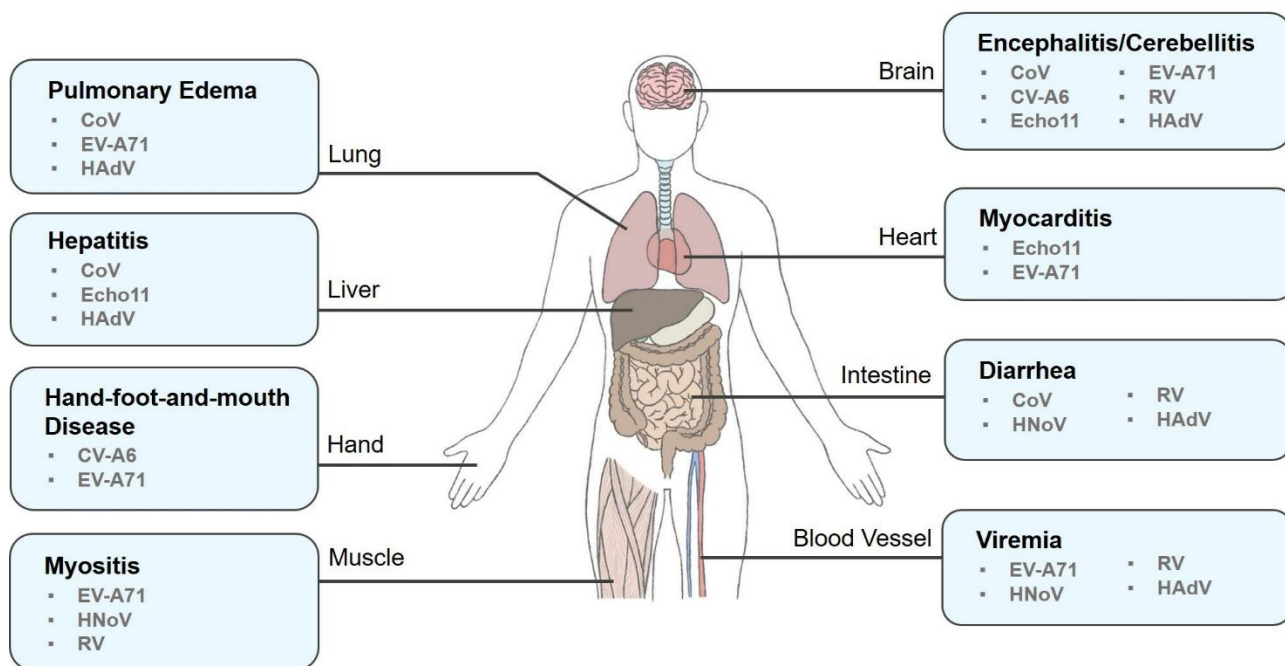


Figura 1. Patologie associate ad infezioni da virus enterici, tra cui enterovirus EV-A71, Echo 11, CV-A6⁶.

Gli enterovirus mostrano spesso modelli stagionali di incidenza sia nei climi temperati che in quelli tropicali, anche se la stagionalità è tipicamente più marcata nei primi, con un picco di infezioni in estate e all'inizio dell'autunno⁵.

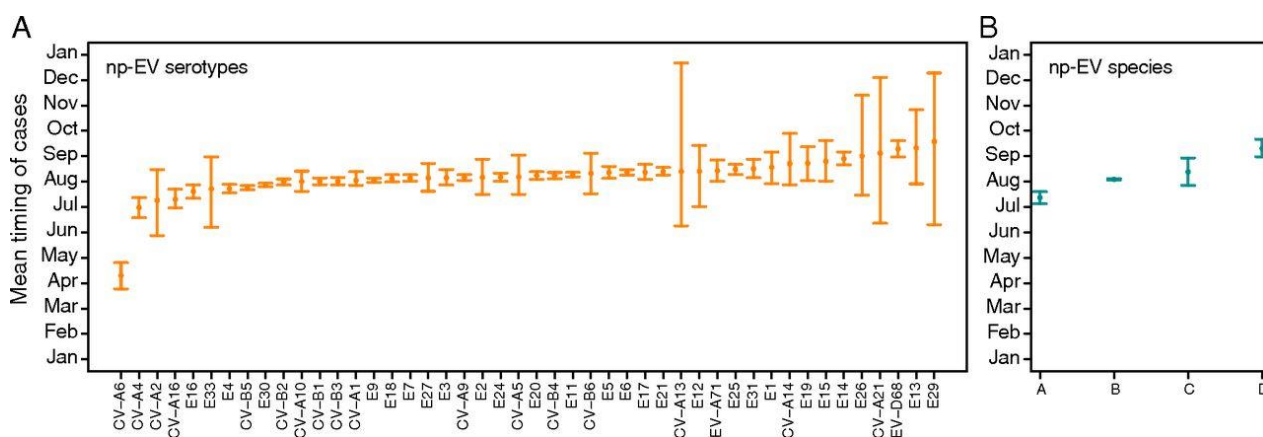


Figura 2. Diffusione annuale degli enterovirus non polio.

Tempistica media dei casi per sierotipo (A) e specie (B) di enterovirus non polio (np-EV) con i relativi intervalli di confidenza al 95%⁷.

Studi sia negli Stati Uniti che in Cina dimostrano come i casi di infezione da enterovirus abbiano un picco in estate, con un profilo relativamente continuo nelle regioni a sud ed un picco più pronunciato

e leggermente ritardato nelle aree più a nord^{7,8}. Diversi fattori climatici sono stati associati a questa stagionalità, tra cui l'umidità dell'aria, che sembra giocare un ruolo chiave nel favorire la trasmissibilità di questi virus^{7,9}.

A tal proposito, il peggiorare dei cambiamenti climatici ed il continuo innalzamento delle temperature potrebbero portare ad un aumento della diffusione di questi patogeni. Sia uno studio condotto attraverso delle proiezioni su dati climatici sia le simulazioni basate su questi ultimi, evidenziano come gli intervalli di temperatura stagionali rivestano un ruolo determinante nell'influenzare l'entità dei picchi epidemici. In particolare, l'ampiezza dell'escursione termica stagionale modula l'intensità delle epidemie di enterovirus attraverso il suo effetto sulle dinamiche di suscettibilità della popolazione. Inverni più miti favoriscono una maggiore trasmissione virale durante tutto l'anno, riducendo la disponibilità di individui suscettibili e limitando così l'entità del picco epidemico estivo. Al contrario, un aumento dell'escursione termica stagionale dovuto al cambiamento climatico può determinare epidemie estive più intense e un più lento ripristino della popolazione suscettibile, dando luogo a cicli epidemici biennali o di durata superiore. Inoltre, la variabilità interannuale della temperatura può complicare ulteriormente questo scenario: i nostri modelli indicano che la combinazione tra cambiamento climatico e fluttuazioni termiche può amplificare i picchi epidemici fino al 40% rispetto ai livelli attuali¹⁰.

Classificazione

Gli Enterovirus (EV) appartengono alla famiglia dei Picornaviridae, una delle famiglie virali più antiche e diversificate al mondo. La famiglia Picornaviridae comprende i generi Enterovirus, Cardiovirus e Aphthovirus, tra gli altri, e il genere Enterovirus include 3 Rhinovirus (RV) e 10 EV. Le specie di EV sono ulteriormente suddivise in diversi sierotipi tramite saggi sierologici o in genotipi

tramite metodi di biologia molecolare, e ciascun tipo ha un prototipo, il quale viene definito come il primo virus identificato della categoria di riferimento. La grande maggioranza dei prototipi di EV è stata isolata tra il 1947 e il 1955. In origine, un sierotipo virale isolato veniva identificato tanto attraverso i risultati dei saggi di neutralizzazione dell'infettività, quanto tramite la sua patogenicità nell'uomo e negli animali. Per esempio, i virus ECHO, furono nominati grazie alle caratteristiche dell'infezione da essi causata e alla tipologia di campione di isolamento. In base alle osservazioni di difficoltà motorie, compromissione del muscolo scheletrico, paralisi spastica e danni estesi ai tessuti, incluso il sistema nervoso centrale, provocati dall'infezione in un modello murino, i Coxsackievirus vennero classificati nei gruppi A e B. La ragione per la quale i virus ECHO furono inizialmente classificati in un unico gruppo, risiede nell'associazione poco chiara con le malattie umane al momento della loro scoperta. Con l'identificazione di un numero sempre maggiore di nuovi EV, è diventato molto difficile classificare gli Enterovirus basandosi esclusivamente sulle manifestazioni cliniche, poiché l'elevata variabilità dei quadri clinici può essere facilmente attribuita a modifiche del genotipo virale dovute a piccole differenze nel genoma¹¹. Pertanto, dal 1974, tutti i nuovi EV scoperti con caratteristiche sierologiche diverse sono stati numerati nell'ordine in cui venivano identificati, a partire da EV68. Successivamente, oltre a RV-A (74 sierotipi) e RV-B (25 sierotipi), è stato identificato RV-C, e non sono state riscontrate differenze significative nelle strutture genomiche e del virione tra RV e EV umani¹²⁻¹⁴; per questo motivo il genere Rhinovirus è stato riclassificato come una specie all'interno del genere Enterovirus.

Negli ultimi decenni, sulla base dell'analisi filogenetica della principale proteina antigenica degli EV, VP1, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ha raccomandato di classificare i virus appartenenti al genere Enterovirus in 7 specie di veri EV, da EV-A a EV-D, e in 3 specie di RV, da A a C. Dal 2012, questo schema di classificazione moderno è stato ampiamente accettato. Successivamente, numerose nuove proposte di classificazione sono state incluse nel nono volume della tassonomia virale pubblicato dall'ICTV¹⁵⁻¹⁸.

Ad oggi, i criteri utilizzati per definire i tipi di EV si basano sulle differenze nelle sequenze nucleotidiche della regione genomica VP1. Un virus la cui sequenza del gene VP1 mostra meno del 75% di similarità rispetto ai tipi di EV già noti viene definito come un nuovo tipo. Una omologia superiore all'85% nella sequenza amminoacidica è raccomandata come criterio supplementare¹⁹. L'identificazione degli isolati nei campioni clinici viene effettuata tramite il sequenziamento di circa 300 nucleotidi del gene VP1 utilizzando primer universali per PCR²⁰.

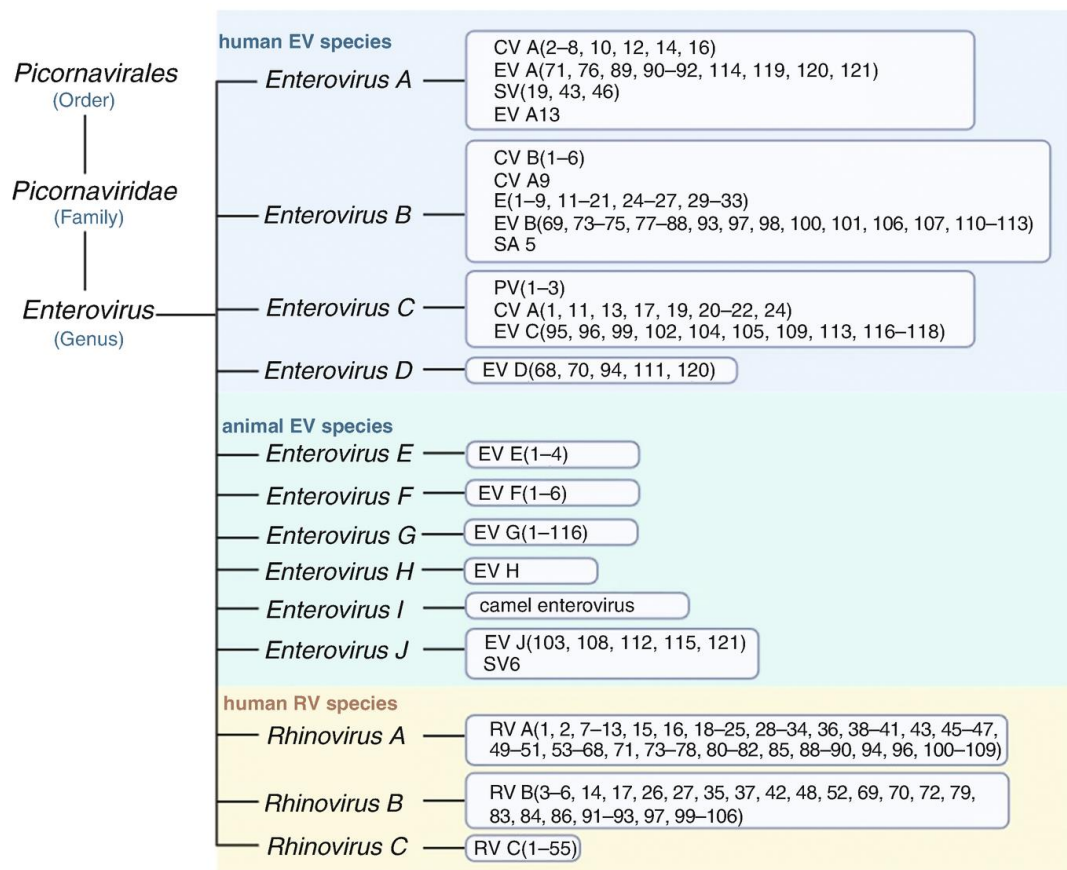


Figura 2. Tassonomia degli Enterovirus¹¹.

Struttura

Il Rhinovirus 14 e i Poliovirus sono stati i primi virus a RNA animali dei quali è stata risolta la struttura tridimensionale^{21,22}. Le particelle di enterovirus sono costituite da 60 protomeri ripetuti, ciascuno formato da quattro proteine strutturali: VP1, VP2, VP3 e VP4. Insieme, queste proteine

formano un capsidico icosaedrico con una disposizione pseudo $T = 3$ che racchiude il genoma virale. La piccola proteina VP4 è miristoilata e si trova all'interno del virione, mentre la superficie della particella è composta dalle subunità di VP1, VP2 e VP3, ciascuna delle quali adotta la tipica conformazione a β foglietto antiparallelo a otto filamenti (**Figura 3a**).

La superficie del capsidico presenta numerosi anelli e loop altamente variabili, facilmente accessibili al sistema immunitario dell'ospite. Ciò spiegherebbe l'elevata diversità antigenica degli enterovirus. La maggior parte degli enterovirus possiede una profonda depressione circolare, detta canyon, che circonda ciascun asse di simmetria pentamerico e che funge spesso da sito di legame per il recettore²³ (Anello verde, **Figura 3a**).

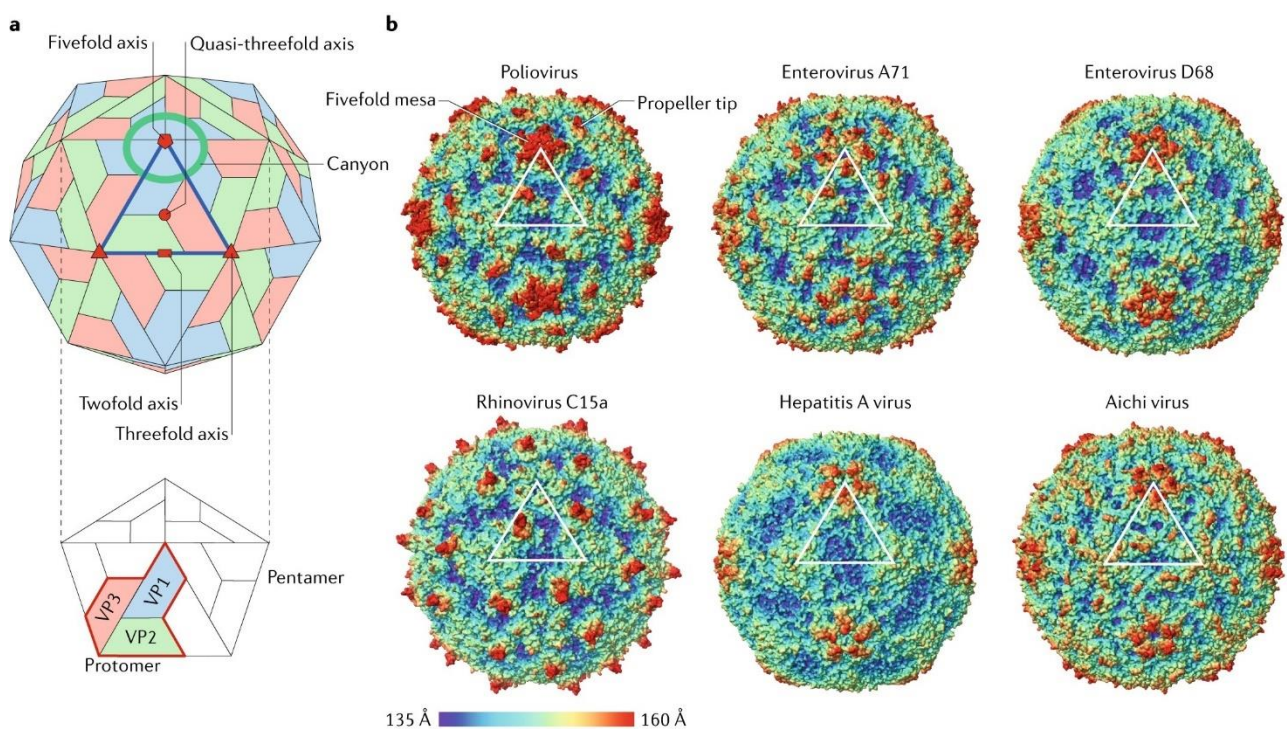


Figura 3. Struttura dei picornavirus. (a) Rappresentazione di una particella di picornavirus, che mostra l'unità asimmetrica (linea blu), i diversi assi di simmetria (punti rossi) e la posizione del *canyon* (cerchio verde). Sessanta protomeri, costituiti dalle proteine di superficie VP1, VP2 e VP3 e dalla proteina interna VP4, formano l'involucro del capsidico. (b) Confronto delle superfici capsidiche di diversi picornavirus appartenenti al genere *Enterovirus* (Poliovirus, Enterovirus A71, Enterovirus D68 e Rhinovirus C15a); al genere *Hepatovirus* (virus dell'epatite A); e al genere *Kobuvirus* (virus di Aichi)⁴.

Il fondo del canyon di tutti gli Enterovirus (ad eccezione di RV-C²⁴) contiene una piccola tasca idrofobica, o pocket, normalmente occupata da una molecola lipidica o da un pocket factor, coinvolto nella regolazione della stabilità della particella virale durante l'ingresso nella cellula ospite.

Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo degli Enterovirus è diviso in molteplici fasi; legame con lo specifico recettore, internalizzazione ed uncoating della particella virale, traduzione del materiale genetico e successivo processamento proteolitico, replicazione del materiale genetico nell'organello di replicazione virale, assemblaggio e maturazione della particella virale, rilascio litico o non litico delle particelle virali.

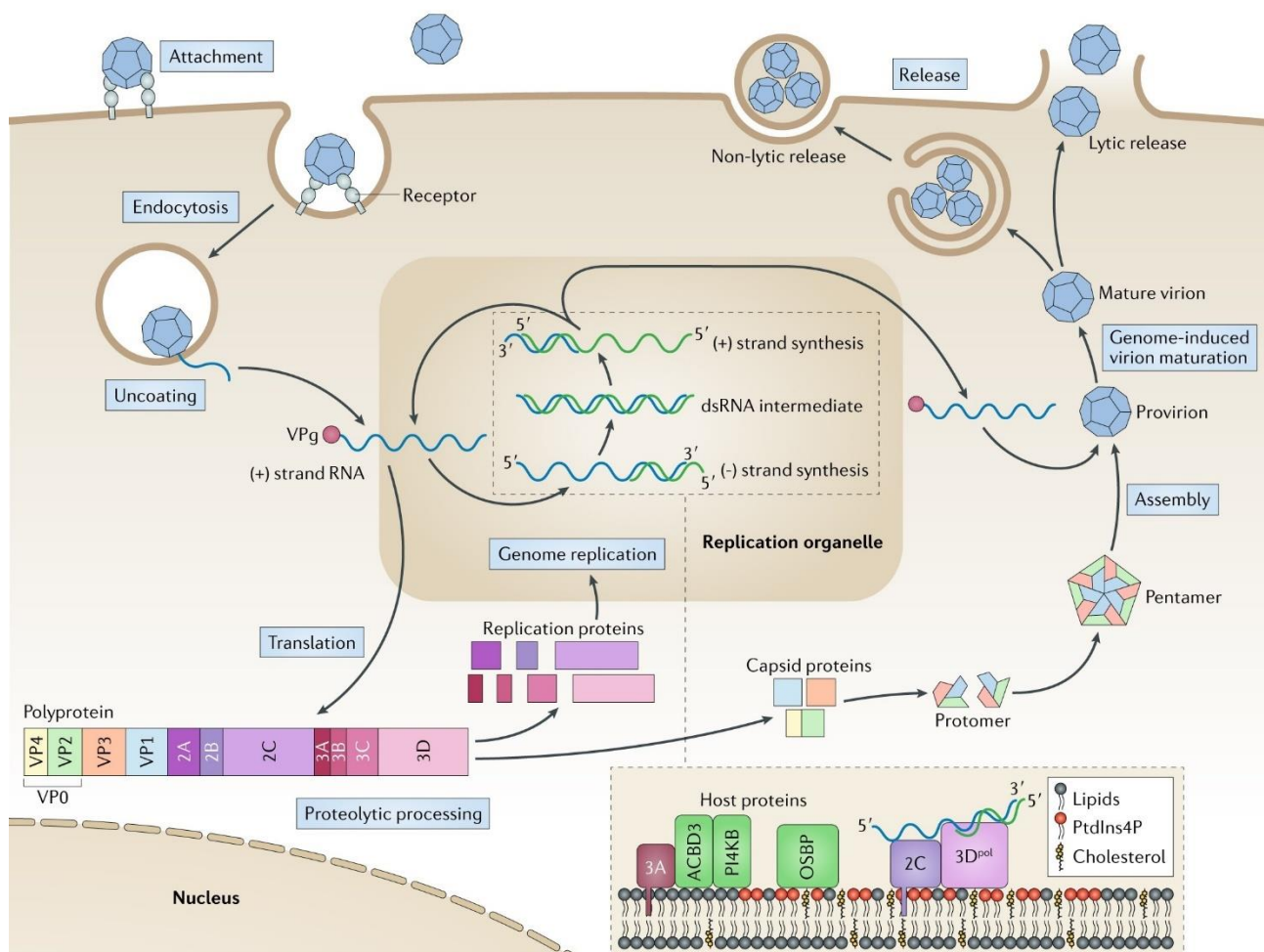


Figura 4. Panoramica schematica del ciclo replicativo degli enterovirus⁴.

Ingresso ed uncoating

Uno dei principali fattori a determinare il tropismo e la patogenesi virale è la disponibilità di uno specifico recettore sulla superficie cellulare, il quale può essere utilizzato per l'adesione e l'ingresso del virus. Il fatto che gli enterovirus riescano a legare un grande repertorio di recettori fornisce una possibile spiegazione per l'ampio spettro di malattie causate da questi virus. I recettori di scapsidamento inducono cambiamenti conformazionali nel capsido virale che mediano il processo di scapsidamento, mentre i recettori di adesione facilitano l'attacco alla cellula e possono favorire l'ingresso del virus.

Tabella 1. Recettori degli enterovirus⁴.

Recettore	Virus	Ruolo	Ref.
PVR (CD155)	Poliovirus	Uncoating	25
SCARB2	EV-A71, CV-A7, CV-A14 and CV-A16	Uncoating	26,27
PSGL1	EV-A71-PB, CV-A2, CV-A7, CV-A10, CV-A14 and CV-A16	Attachment	28,29
Annexin II, DC-SIGN, nucleolin and vimentin	EV-A71	Attachment	30
Heparan sulfate	EV-A71 and E-5	Attachment	30,31
Sialic acid	EV-A71, EV-D70 and CV-A24v	Attachment	30,32
	EV-D68	Uncoating	33
ICAM5	EV-D68	Uncoating	34
LDLR, VLDLR and LRP	Rhinovirus (minor)	Attachment	35
ICAM1	Rhinovirus (major), CV-A21 and CV-A24	Uncoating	31,32,36
CDHR3	Rhinovirus C	Unknown	37
DAF	CV-A21, CV-B1, CV-B3, CV-B5, E-3, E-6, E-7, E-11, E-12, E-13, E-19, E-20, E-21, E-25, E-29 and E-30	Attachment	31,38
CAR	CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 and CV-B6	Uncoating	39
Integrin $\alpha_v\beta_3$	CV-A9, E-1 and E-9	Attachment	31,40
Integrin $\alpha_2\beta_1$ (VLA2)	E-1 and E-8	Attachment	41
FcRn	E-5, E-7, E-9, E-11, E-13, E-30	Uncoating	42

Sebbene i recettori di decapsidazione siano solitamente proteine, è stato recentemente dimostrato che EV-D68 lega glicani sialilati attraverso il suo canyon, provocando così cambiamenti conformazionali

alla base del processo di decapsidazione. Questa scoperta rappresenta il primo esempio di un enterovirus capace di legarsi a carboidrati per innescare il processo di decapsidazione⁴³.

Oltre ai recettori di decapsidazione, anche i recettori di adesione possono avere un ruolo importante nell'infezione. Ad esempio, il legame dei Coxsackievirus del gruppo B al recettore di adesione complement decay-accelerating factor (DAF; noto anche come CD55) attiva eventi di segnalazione nelle cellule epiteliali polarizzate le quali liberano il recettore di decapsidazione (coxsackievirus–adenovirus receptor; CAR) dalle tight junctions, rendendolo accessibile al virus⁴⁴.

Inoltre, i fattori di adesione possono determinare il tropismo virale, come evidenziato da uno studio recente su una variante di coxsackievirus A24, nel quale è stato dimostrato che l'adattamento al recettore di adesione acido sialico correla con l'emergere di pandemie di congiuntivite emorragica acuta³². Per la maggior parte degli enterovirus, il primo segnale di decapsidazione incontrato durante l'ingresso nella cellula è il legame con il recettore. Questi recettori di decapsidazione si legano nel canyon, dove interagiscono con l'anello GH della proteina VP1, provocando il collasso della tasca idrofobica e l'espulsione del pocket factor⁴⁵. Questo processo dà origine alla A-particle (particella alterata) la quale perde il contatto con il recettore ed ha un raggio aumentato di ~ 4% rispetto alla particella originale⁴⁶, probabilmente permettendo il riarrangiamento del materiale genetico prima del rilascio.

Oltre al legame con il recettore, alcuni enterovirus dipendono anche dall'acidificazione endosomiale come segnale per iniziare la decapsidazione. Poiché un pH acido è limitato a compartimenti cellulari specifici, questo segnale chimico consente al virus di controllare il momento e il luogo del rilascio del genoma. Mentre l'acidificazione endosomiale è l'unico segnale di decapsidazione conosciuto per gruppi minoritari di rhinovirus⁴⁷, altri enterovirus, come EV-A71⁴⁸, richiedono invece la combinazione tra l'interazione con il proprio recettore e un ambiente acido per completare il processo di decapsidazione.

Traduzione e replicazione

Successivamente all'internalizzazione ed al processo di uncoating, l'RNA virale viene rilasciato all'interno del citoplasma, dove verrà immediatamente tradotto dai ribosomi dell'ospite, producendo sia le proteine del capsido sia le proteine virali coinvolte nella replicazione del genoma. La traduzione è mediata da un sito interno di ingresso del ribosoma (*internal ribosome entry site*, IRES) e richiede una parte dell'apparato di traduzione canonico, oltre a diversi fattori trans-agenti dell'IRES (*IRES trans-acting factors*, ITAFs)^{49,50}.

Il meccanismo di replicazione dell'RNA è ben conservato tra tutti gli enterovirus⁵¹. L'enzima centrale del complesso di replicazione è la RNA polimerasi RNA-dipendente virale, denominata 3D^{pol}. La replicazione viene avviata in corrispondenza di elementi strutturali dell'RNA presenti nelle regioni non tradotte (UTR) 5' e 3' e richiede un primer costituito dal peptide virale 3B (noto anche come VPg) legato a due uridine.

La 3D^{pol} agisce in collaborazione con diverse proteine virali, tra cui 3CD^{pro} e 3AB, che insieme legano gli elementi strutturali dell'RNA coinvolti nell'inizio della replicazione, e la proteina 2C, avente attività di elicasi, dipendente dall'ATP, e di attività chaperonica dell'RNA indipendente dall'ATP. Oltre alle proteine virali, nella replicazione del genoma intervengono anche diverse proteine cellulari leganti l'RNA, tra cui la *poly(rC)-binding protein 2* (PCBP2), la *polyadenylate-binding protein 1* (PABP1) e l'eterogenea nucleoproteina ribonucleare C (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*, HNRNPC).

La replicazione avviene su strutture chiamate *replication organelles* (ROs), di natura tubulo-vescicolare, indotte dal virus e originate presumibilmente dalle membrane del reticolo endoplasmatico (ER) e/o dell'apparato di Golgi. La formazione delle ROs richiede le proteine virali associate alle membrane 2BC e 3A⁵², oltre a un insieme specifico di fattori cellulari dell'ospite; tuttavia, la composizione esatta e il meccanismo di formazione di queste strutture rimangono ancora sconosciuti.

La proteina 3A interagisce con la proteina contenente il dominio di legame per l'acil-CoA, *acyl-CoA-binding domain-containing protein 3* (ACBD3), per reclutare la chinasi lipidica *phosphatidylinositol 4-kinase- β* (PI4KB) alle membrane, determinando un accumulo di lipidi *phosphatidylinositol-4-phosphate* (PtdIns4P). Questi lipidi, a loro volta, attraggono la proteina *oxysterol-binding protein* (OSBP), che forma siti di contatto tra le membrane del reticolo endoplasmatico e le ROs, mediando un accumulo di colesterolo nelle ROs guidato dal gradiente di PtdIns4P^{53,54}. Livelli elevati di PtdIns4P e/o di colesterolo risultano fondamentali per la formazione delle ROs e per una replicazione efficiente del genoma, probabilmente facilitando un corretto processamento della poliproteina virale⁵⁵⁻⁵⁸.

La proteina 3A si lega anche al *Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1* (GBF1), ma il suo ruolo preciso nella replicazione non è ancora chiaro.

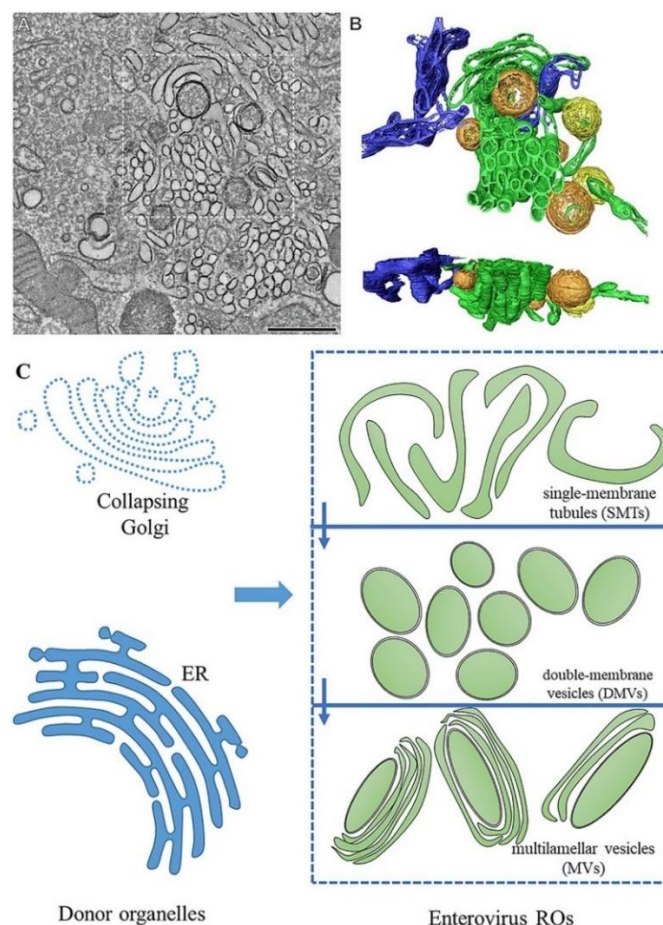


Figura 5. Morfologia dei ROs generati dagli enterovirus⁵⁹.

Le funzioni delle proteine 2BC, 2B e 2C nella riorganizzazione delle membrane sono ancora meno comprese. Si ritiene che 2BC contribuisca al reclutamento della PI4KB⁶⁰, mentre 2B possiede attività di viroporina^{61,62}, anche se la sua funzione esatta nella formazione delle ROs resta sconosciuta. La proteina 2C si lega invece alla *reticulon 3*, una proteina del reticolo endoplasmatico che promuove la curvatura delle membrane, ma l'importanza di questa interazione nella formazione delle ROs non è stata ancora approfondita⁶³.

Alcuni fattori dell'ospite sembrano essere rilevanti solo per sottogruppi specifici di enterovirus. Ad esempio, la *valosin-containing protein* (VCP) è stata identificata come un fattore cellulare necessario per la replicazione del poliovirus, ma non per quella del coxsackievirus B3⁶⁴. È interessante notare che molte altre proteine cellulari sono state implicate nella replicazione degli enterovirus, sebbene il loro ruolo preciso resti spesso poco chiaro.

Inoltre, gli enterovirus inducono l'attivazione del processo di autofagia. Sebbene sia stato ipotizzato che gli autofagosomi possano avere un ruolo nella replicazione del genoma⁶⁵, attualmente si ritiene che gli autofagosomi indotti dal virus siano coinvolti principalmente nel rilascio non litico delle particelle virali⁶⁵.

Assemblaggio

Il ciclo vitale degli enterovirus si conclude con la formazione di nuove particelle infettive, un processo complesso e a più fasi che rimane tuttora poco compreso⁶⁶.

Inizialmente, la *heat shock protein 90* (HSP90) si associa al precursore capsidico miristoilato P1, catalizzando la sua elaborazione proteolitica da parte della proteasi virale 3CD^{pro}, che porta alla formazione delle proteine VP0, VP1 e VP3⁶⁷. Questo genera una particella protomerica che successivamente si auto-oligomerizza formando strutture pentameriche. Questi pentameri sono stabilizzati dalle loro catene miristoiliche^{68,69} e, per alcuni enterovirus, anche dall'associazione con il glutatione^{70,71}.

Secondo il modello attuale, nella fase successiva i pentameri si assemblano attorno all'RNA virale in replicazione, formando il pro-virione. In concomitanza con l'incapsidamento, e come ultimo passaggio di controllo qualità, l'RNA virale stesso media la scissione di VP0 in VP2 e VP4, generando così la particella virale matura⁷².

Sebbene molti virus a RNA codifichino almeno un segnale di impacchettamento dell'RNA che garantisce specificità e precisione durante l'assemblaggio, tali segnali non sono stati ancora identificati nei genomi degli enterovirus. Si ritiene attualmente che la specificità dell'incapsidamento negli enterovirus sia determinata da un'interazione diretta tra la proteina 2C (parte del complesso di replicazione) e la proteina capsidica VP3, senza un apparente coinvolgimento di un segnale specifico sull'RNA⁷³. Curiosamente, è stato recentemente dimostrato che il *parechovirus 1* e il virus dell'afta epizootica (*foot-and-mouth disease virus*, FMDV) contengono più regioni corte ordinate di RNA strutturato distribuite lungo tutto il genoma, le quali legano proteine capsidiche e sono distribuite lungo tutto il genoma^{74,75}. Resta da verificare se anche gli enterovirus o altri picornavirus possiedano strutture analoghe.

Rilascio dei virioni

Gli Enterovirus sono tradizionalmente considerati virus litici, in grado di uccidere e lisare la cellula ospite per liberare le nuove particelle virali. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che essi possono anche essere rilasciati in modo non litico all'interno di vescicole, le quali permettono la trasmissione simultanea di gruppi di virioni in blocco⁷⁶⁻⁸⁰.

Il modello attuale suggerisce che gli enterovirus inducano il processo di autofagia e promuovano la formazione di autofagosomi a doppia membrana che inglobano gruppi di virioni⁶⁵. La fusione di questi autofagosomi con i lisosomi è inibita dal virus per evitare la degradazione del loro contenuto. Invece, la fusione della membrana esterna degli autofagosomi contenenti virioni con la membrana

plasmatica rilascia strutture vescicolari a singola membrana piene di virioni nell'ambiente extracellulare.

Le membrane di queste vescicole extracellulari sono arricchite di fosfatidilserina, un lipide che facilita l'ingresso nelle cellule, probabilmente tramite recettori specifici per la fosfatidilserina⁷⁹. Tuttavia, il vero recettore virale è ancora necessario per l'infezione, il che implica che, a un certo punto, i virioni devono essere rilasciati dalle vescicole extracellulari⁷⁹.

Il rilascio non litico potrebbe rappresentare una strategia di trasmissione molto più comune tra i picornavirus di quanto fosse ritenuto in precedenza. È stato infatti osservato anche nel virus dell'epatite A (HAV), che evita gli anticorpi neutralizzanti rivestendosi con strutture simili a esosomi^{81,82}.

Pertanto, il rilascio non litico potrebbe aumentare l'efficienza infettiva, anche se il suo ruolo preciso nella disseminazione e nella patogenesi degli enterovirus rimane ancora da chiarire.

Echovirus 11

L'echovirus 11 (E11) è uno degli enterovirus più comuni rilevati sia in campioni clinici sia ambientali in tutto il mondo⁸³⁻⁸⁷. Appartiene alla specie B del genere Enterovirus della famiglia Picornaviridae. Sebbene l'E11 sia noto principalmente per causare infezioni lievi o asintomatiche, è responsabile anche di sindromi gravi, caratterizzate da alti tassi di morbilità e mortalità⁸⁸. L'ampia gamma di malattie comprende meningite asettica, encefalite, paralisi flaccida acuta (AFP), infezioni delle vie respiratorie superiori, malattia mani-piedi-bocca (HFMD), gastroenterite acuta, miocardite e uveite⁸⁹⁻⁹². In particolare, questo virus può causare infezioni sistemiche gravi nei neonati, inclusa epatite acuta con coagulopatia, una delle complicanze più fatali delle infezioni enterovirali severe in età neonatale^{93,94}. Come altri enterovirus, l'E11 è in grado di attraversare la placenta e infettare il feto, causando cardiopatie e morte fetale⁹⁵⁻⁹⁷. Le persone con immunodeficienza primaria sono inoltre a rischio di infezioni croniche causate da E11⁹⁸. Questo virus presenta un pattern epidemico di

circolazione ed è stato spesso identificato come agente causale di focolai che si verificano in modo irregolare e possono protrarsi per diversi anni⁸³. Analogamente, l'E11 è stato associato a infezioni nosocomiali e a numerosi focolai in reparti neonatali^{99–101}. I focolai di infezione e la circolazione silente nella popolazione possono essere monitorati attraverso la sorveglianza ambientale. L'analisi dei campioni di acque reflue consente di rilevare un ventaglio più ampio di varianti virali circolanti nella popolazione rispetto a quelle isolate dai pazienti. In particolare, le acque reflue grezze contengono virus eliminati sia da individui sintomatici sia asintomatici. Inoltre, è stato dimostrato che i patogeni rilevati nelle acque reflue risultano altamente correlati con i casi clinici e con i focolai di malattia^{86,102–106}.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS/WHO) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) hanno riportato un numero crescente di infezioni neonatali gravi associate all'E11 nel periodo 2022–2023^{107–110}. L'E11 è stato rilevato in pazienti neonatali con sepsi grave, complicata da insufficienza epatica e coinvolgimento neurologico o miocardico. Il tasso di letalità delle infezioni neonatali severe da E11 è risultato molto elevato. Di conseguenza, una nuova variante di E11 è stata segnalata in Francia, Croazia, Italia, Spagna, Svezia e nel Regno Unito di Gran Bretagna e Irlanda del Nord^{111–114}.

Mutazioni e ricombinazioni svolgono un ruolo cruciale nella formazione di nuove varianti genetiche di E11 con proprietà biologiche inedite, associate a cambiamenti nel tropismo tissutale, all'evasione dell'immunità dell'ospite, a un'aumentata virulenza e patogenicità e alla comparsa di focolai epidemici. La proteina strutturale VP1 è la più immunodominante dell'E11, e varianti antigeniche vengono selezionate in presenza degli anticorpi diretti contro di essa. Le metodiche molecolari basate sull'amplificazione e sul sequenziamento della regione codificante per VP1 (1D) sono utilizzate per la caratterizzazione molecolare dei ceppi e per studi epidemiologici. I ceppi di E11 circolanti a livello globale sono classificati in sei genotipi (A–F), e i genotipi A, C e D sono

suddivisi rispettivamente in A1–5, C1–4 e D1–5^{115,116}. Attualmente, il ceppo maggiormente circolante in Europa e Cina appartiene al genotipo D5¹¹⁷.

Scopo della tesi

La tesi vuole valutare come sono cambiati i virus respiratori non SARS-CoV-2 durante e dopo la pandemia e studiare i fenomeni genetici e patogenetici legati all'emergere di un nuovo ceppo di Echovirus 11 di tipo D5, chiamato Leonard. Dalla fine della pandemia e il conseguente ritiro delle misure non farmacologiche, si è assistito a una riorganizzazione dello scenario virologico con la riapparizione di virus rari e l'emergere di nuove varianti e/o edizioni di virus, e varianti con potenziale patogenico. Tra i virus riemergenti l'Echovirus 11 ha mostrato un rinnovato interesse, e una nuova provocazione in Europa, con gravi sintomi clinici e una elevata letalità sui neonati. In questo contesto, la tesi si propone di confrontare il comportamento biologico del ceppo *Leonard* con quello del ceppo prototipo *Gregory*, al fine di comprendere in che modo le modifiche genetiche acquisite possano averne potenziato la virulenza. Particolare attenzione è rivolta allo studio dei meccanismi di morte cellulare indotti dall'infezione, con l'obiettivo di chiarire il coinvolgimento delle vie intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi e di indagare il possibile ruolo del recettore Fas non solo come mediatore della morte cellulare, ma anche come potenziale nuovo recettore di ingresso virale.

Nel complesso, questo lavoro mira a contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'evoluzione e la patogenicità di *Echovirus 11*, fornendo basi sperimentali utili allo sviluppo di future strategie preventive e terapeutiche contro le infezioni causate da questo virus emergente.

Materiali e metodi

Design dello studio retrospettivo sui virus respiratori

Lo studio retrospettivo è stato condotto su dati raccolti presso gli Spedali Civili di Brescia da giugno 2021 a marzo 2023. I campioni respiratori, tra cui tamponi nasofaringei (TNF), aspirati nasofaringei (ANF), lavaggi broncoalveolari (BAL) e aspirati bronchiali (BAS), sono stati ottenuti da soggetti ospedalizzati e ambulatoriali sottoposti a test molecolari per la rilevazione di virus respiratori; non sono stati considerati altri criteri specifici. In totale, sono stati analizzati 564.747 campioni, di cui 559.870 valutati per la presenza di SARS-CoV-2 e i restanti 4.877 per altri comuni virus respiratori. Dopo le valutazioni di routine, i campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Rilevazione dei virus respiratori

Per il test del SARS-CoV-2, l'RNA virale è stato estratto utilizzando il sistema automatico Nimbus (Arrow Diagnostics, Genova, Italia), come precedentemente descritto (Zani et al., 2023). L'amplificazione è stata eseguita su uno strumento PCR BioRad CFX (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milano, Italia) impiegando il kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene Inc., Seoul, Corea), che rileva regioni conservate dei geni E, RdRp/S e N del genoma del SARS-CoV-2.

Per la rilevazione degli altri virus respiratori, l'acido nucleico totale è stato estratto da ciascun campione seguendo il protocollo di isolamento ELITE InGenius Total Nucleic Acid, seguendo le istruzioni del produttore. L'amplificazione è stata effettuata sulla piattaforma PCR ELITE InGenius (ELITech Italy, Torino, Italia). Per la rilevazione e identificazione di FLU-A/B, RSV e hMPV, è stato utilizzato il kit Respiratory Viral PLUS ELITE MGB®, un saggio qualitativo multiplex basato su retrotrascrizione e amplificazione di acidi nucleici,

Il pannello ampliCube Respiratory Viral Panel 2 è stato impiegato per la rilevazione dei PIV 1–4, mentre il pannello ampliCube Respiratory Viral Panel 4 è stato utilizzato per l'analisi di RV/EV e AdV.

Tra i 564.747 campioni analizzati, 2.001 sono risultati positivi per uno dei virus respiratori, mentre 111.990 sono risultati positivi per SARS-CoV-2.

Colture cellulari

Le cellule epiteliali di adenocarcinoma polmonare umano A549 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC) e mantenute in terreno RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 100 U/mL di penicillina e 2 mM di piruvato di sodio. Le cellule endoteliali primarie della vena ombelicale umana (HUVEC) sono state isolate e caratterizzate come precedentemente descritto¹¹⁸ e coltivate in terreno di crescita endoteliale (EGM; Lonza, Milano, Italia) supplementato con il 10% (v/v) di FBS.

Isolamento, titolazione e propagazione virale

Per l'isolamento del virus, 1×10^6 cellule A549 sono state seminate in una flask da 25 cm² 24 ore prima dell'infezione. Le cellule sono state infettate con una soluzione filtrata contenente 600 µL di tampone nasale positivo e 600 µL di terreno RPMI supplementato con 100 U/mL di penicillina, 100 U/mL di streptomycin e 100 U/mL di amfotericina B, per 3 ore a 37°C. Al termine dell'infezione sono stati aggiunti 3,8 mL di RPMI con il 2% di FBS. All'insorgere dell'effetto citopatico (CPE), la concentrazione virale è stata determinata tramite reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR). Il virus isolato è stato denominato “Leonard” (genoma non ancora depositato).

La titolazione virale è stata eseguita tramite il saggio delle placche, seminando $1,8 \times 10^5$ cellule A549 in ciascun pozzetto di una piastra da 24 well, un giorno prima della titolazione. È stata poi preparata una diluizione seriale decimale del surnatante infettivo in RPMI senza FBS (0%), successivamente utilizzata per infettare i monostrati cellulari. Dopo 1 ora di incubazione, il virus è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS. Le cellule sono state poi ricoperte con RPMI contenente 2% di FBS e 1% di agarosio SeaPlaque (EGM; Lonza, Milano, Italia) per l'isolato di Echovirus 11, oppure 0,5% per il ceppo Gregory (ATCC VR-41). Successivamente, le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore. Quando le placche sono diventate visibili al microscopio, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 3 ore e successivamente colorate con il cristal violetto. Il titolo virale (Plaque Forming Units, PFU/mL) è stato determinato contando il numero di placche.

La propagazione dei virus è stata eseguita su cellule A549. In breve, le cellule sub-confluenti sono state infettate con una molteplicità di infezione (MOI) di 0,01 per 1 ora a 37°C. Successivamente, il surnatante contenente il virus è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS. È stato quindi aggiunto RPMI fresco integrato con 2% FBS. All'insorgere dell'effetto citopatico, il virus è stato recuperato sia dal surnatante che dal lisato cellulare. Per rimuovere i detriti cellulari, gli stock di Echovirus 11 sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 4000 g per 30 minuti a 4°C e poi conservati a -80°C fino all'utilizzo.

Per tutti gli esperimenti, le cellule A549 subconfluenti sono state infettate con i ceppi virali Leonard e Gregory a MOI 0,005. Dopo 1 ora di adsorbimento a 37°C, l'inoculo è stato rimosso e sostituito con terreno contenente 2% FBS.

Next generation sequencing e genotipizzazione

Per lo studio epidemiologico, 151 campioni respiratori, raccolti tra settembre 2022 e marzo 2023 e risultati positivi per RV/EV, sono stati sottoposti a sequenziamento NGS per identificare i ceppi virali specifici. Nello specifico l'RNA virale è stato estratto da 300 µL di campione risultato positivo.

Per quanto riguarda le analisi del nuovo isolato Leonard invece sono stati analizzati i surnatanti dei vari esperimenti in vitro.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il QIAamp DSP Virus Kit® (Qiagen), seguendo le istruzioni del produttore, eluendo in 50 µL e conservando a -80°C fino all'utilizzo. Successivamente, l'intero genoma virale è stato retrotrascritto e amplificato mediante il SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System (ThermoFisher Scientific) in una reazione da 50 µL.

Per le analisi epidemiologiche sono state usate le seguenti concentrazioni:

25 µL di mix di reazione, 0,5 µL di SuperScript™ IV RT/Platinum™ Taq Mix, 2,5 µL di primer senso e antisenso (10 µM) e 10 µL di RNA estratto. I primer PCR utilizzati nella reazione erano: AN-89, 5'-CCAGCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG-3' e AN-88, 5'-TAC TGG ACC TGG NGG NAY RWA CAT-3' ¹¹⁹.

Per quanto riguarda le analisi con il nuovo isolato Leonard sono state usate le seguenti concentrazioni:

12 µL di RNA virale, 25 µL di 2X Platinum™ SuperFi™ RT-PCR Master Mix, 0,5 µL di SuperScript™ IV RT Mix, e 0,75 µM di ciascun primer — FOR (sense primer, 5'-GTACTTCTGTTACCCCGGAC-3') e REV (antisense primer, 5'-GAATCCAACCATTCCTGCG-3').

I prodotti della PCR sono stati successivamente analizzati su gel di agarosio all'1,0% per verificare la corretta amplificazione e quindi sottoposti a sequenziamento. In breve, 15 µL di DNA amplificato

sono stati utilizzati per la reazione di tagmentazione mediante il kit Nextera (Illumina), al fine di ottenere frammenti superiori a 150 bp, seguendo il protocollo del produttore.

La libreria purificata è stata quantificata tramite Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific) e caricata in una cartuccia di sequenziamento V2 da 300 cicli per l'esecuzione del sequenziamento sulla piattaforma MiSeq (Illumina).

I dati grezzi sono stati poi valutati per la qualità mediante FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), rifilati con Trimmomatic versione 0.39 e successivamente analizzati con il software Geneious (v. 11.1.5) (Biomatters Ltd.).

L'assegnazione del genotipo è stata effettuata utilizzando lo strumento online Genome Detective (Genome Detective, 2023) con i parametri predefiniti. Gli assemblaggi preliminari risultanti sono stati sottoposti a ricerca di similarità nucleotidica tramite gli algoritmi BLASTn, Enterovirus Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>) e MEGABLAST, nel database del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Infine, per l'isolato Leonard, la sequenza consenso è stata ricostruita mappando le letture sulla sequenza di riferimento di Echovirus 11 (GenBank OQ927998.1) utilizzando Bowtie2.

Analisi delle quasi-specie

L'analisi della variante denominata Leonard è stata eseguita mediante il Variant Finder Tool (software Geneious®, versione 11.1.5; Biomatters Ltd), utilizzando una frequenza minima di variante pari a 0 e i parametri predefiniti per il valore massimo di p della variante (10^{-6}), come precedentemente descritto¹²⁰. Per ridurre al minimo i falsi positivi, è stato applicato un approccio rigoroso per la valutazione della presenza di quasi-specie. Le varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variants) sono state identificate secondo i seguenti criteri:

- (i) copertura di sequenziamento delle letture appaiate mappate superiore a 100;
- (ii) presenza di almeno quattro letture a supporto della sostituzione nucleotidica;

(iii) frequenza dell'allele minoritario $\geq 1\%$. Le sostituzioni nucleotidiche nei siti SNV identificati sono state misurate come la proporzione di letture appaiate mappate contenenti il nucleotide alternativo.

Digital droplet PCR (ddPCR)

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DSP Virus (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. Successivamente, è stato generato il cDNA mediante il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific).

La reazione di ddPCR è stata eseguita su un sistema QX200 ddPCR (Bio-Rad) con generatore automatico di gocce, utilizzando il kit QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad). Per la reazione di ddPCR sono stati impiegati i seguenti primer: For (forward): 5'-GTACTTCTGTTACCCCGGAC-3' e Rev (reverse): 5'-GAATCCAACCATTCCTGCG-3'.

La fluorescenza delle singole gocce è stata misurata tramite il lettore di gocce QX200 dotato del software QuantaSoft v1.7, mentre i dati sono stati successivamente analizzati con il software QuantaSoft Analysis Pro v1.0, che consente di calcolare la concentrazione delle sequenze target e gli intervalli di confidenza al 95% basati sulla distribuzione di Poisson.

I dati generati dal lettore QX200 sono stati esclusi dalle successive analisi se il numero totale di gocce in una reazione PCR da 22 μ l risultava basso (<20.000) o se tutte le gocce risultavano positive (saturazione della reazione).

Analisi genetica

Un totale di 116 genomi di Echovirus 11 (E11) di alta qualità, corredati da informazioni sul luogo e la data di isolamento, è stato raccolto dal database GenBank (NCBI). L'allineamento delle sequenze è stato eseguito utilizzando MAFFT ed elaborato con AliView ^{121,122}.

È stato costruito un albero filogenetico preliminare mediante IQ-TREE 2, utilizzando il modello GTR+G4, determinato tramite l'opzione ModelFinder integrata in IQ-TREE 2 ¹²².

Dal set iniziale di 116 genomi, è stato selezionato un sottoinsieme di 38 ceppi appartenenti al nuovo lignaggio identificato, che sono stati utilizzati per l'analisi bayesiana. Prima dell'analisi temporale, la forza del segnale dell'orologio molecolare è stata valutata mediante il metodo di regressione root-to-tip disponibile in TempEst v1.5.3 ¹²³, rimuovendo eventuali outlier che potessero violare l'assunzione dell'orologio. Un albero filogenetico a scala temporale è stato generato utilizzando BEAST v1.10.4, applicando un modello di orologio rilassato lognormale, una priori di dimensione della popolazione skyline, e il modello di sostituzione GTR ^{123,124}. L'analisi si è basata su una distribuzione empirica di 1000 alberi, eseguendo una catena MCMC per 50 milioni di iterazioni, con un campionamento ogni 5000. Gli alberi di Maximum clade credibility (MCC) sono stati riassunti mediante TreeAnnotator v1.10.4 e visualizzati con il pacchetto ggtree in R ¹²⁵.

Inoltre, il software SimPlot è stato utilizzato per determinare la posizione dei siti di ricombinazione, impiegando come query il nuovo ceppo di E11 appartenente al nuovo lignaggio, confrontato con diversi genomi di enterovirus e coxsackievirus, inclusi: *Echovirus 11* (OQ969171.1, Francia, 05/01/2022; linea blu), il vecchio *Echovirus 11* (X80059.1, 04/09/1995; linea verde), *Echovirus 6* (OR840838.1, Francia, 01/05/2022).

Le analisi di similarità e di boot-scanning sono state effettuate utilizzando una finestra mobile di 400 nucleotidi con uno scorrimento di 10 nucleotidi.

Analisi dell'apoptosi

Le analisi apoptotiche sono state eseguite su cellule infettate con entrambi i ceppi virali. Nelle condizioni di neutralizzazione sono stati utilizzati anticorpi neutralizzanti diretti contro il recettore Fas (noto anche come CD95 o APO-1; umano, neutralizzante, clone ZB4, 05-338, Merck), contro la TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL 1; AF347, BioTechne) e contro il recettore del fattore di necrosi tumorale 1 (TNFR1; anticorpo neutralizzante, 10872-R111, SinoBiological). In tali condizioni, le cellule sono state mantenute in terreno contenente il 2% di FBS e pre-trattate con gli anticorpi neutralizzanti per un'ora alle concentrazioni raccomandate dal produttore (anti-Fas 500 ng/mL, anti-TNFR1 1 µg/mL, anti-TRAIL1 55 ng/mL). Le stesse concentrazioni di anticorpi sono state aggiunte sia all'inoculo infettivo sia al mezzo post-infezione.

In tutti gli esperimenti, le cellule A549 sono state lisate con 500 µL di tampone RIPA (Thermo Scientific) contenente Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodio deossicolato 0,5%, fluoruro di sodio 2 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,1% e un mix di inibitori proteasici costituito da aprotinina (1,7 mg/mL), leupeptina (1 mg/mL), fenilmetilsulfonil fluoruro (2 mM) e ortovanadato di sodio (2 mM) (Sigma-Aldrich, Merck). Le proteine sono state quantificate mediante saggio di Bradford e quantità uguali di campione sono state caricate su un gel SDS/poliacrilammide al 12–15%. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa e successivamente incubate con anticorpi primari specifici contro le proteine caspasi-3 e caspasi-9 (Santa Cruz Biotechnology), caspasi-8 (R&D Systems) e GAPDH (Cell Signaling Technology). Al termine dell'incubazione, le membrane sono state lavate e trattate con anticorpi secondari anti-topo o anti-coniglio coniugati con perossidasi. Infine, i complessi antigene–anticorpo sono stati rivelati tramite substrato chemiluminescente per Western blot (ECL System, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) utilizzando il sistema di acquisizione d'immagini Invitrogen™ iBright™ Imagers 1500.

Esperimenti di Surface Plasmon Resonance (SPR)

Gli esperimenti di surface plasmon resonance (SPR) sono stati eseguiti utilizzando uno strumento Biacore X100 (Cytiva) a 25°C, con tampone HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% surfattante P20, pH 7,4) come buffer di corsa. Gli anticorpi anti-His tag sono stati immobilizzati su un chip sensore CM5 mediante chimica standard di accoppiamento amminico. La superficie del chip è stata attivata usando una miscela 1:1 di 0,4 M EDC e 0,1 M NHS per 7 minuti, seguita dall'iniezione di anticorpi anti-His (200 µg/mL in 10 mM acetato di sodio, pH 4,0) fino a raggiungere una risposta finale di circa 8.000 RU. I rimanenti esteri attivi sono stati bloccati con 1 M etanolamina (pH 8,5) per 7 minuti. Il recettore umano FcRn ricombinante His-tagged (Bio-technie, Minneapolis, Minnesota, USA) e il recettore umano monomero Fas ricombinante (FAS-H5229; Acrobiosystems, Newark, USA) sono stati catturati sulla superficie rivestita di anticorpi (500–1.000 RU) immediatamente prima dell'iniezione del virus. I ceppi di Echovirus 11 Leonard e Gregory sono stati diluiti nel buffer di corsa e iniettati a concentrazione fissa (100 nM), o come parte di una serie di diluizioni seriali (da 1080 a 67,5 µg/mL e da 2160 a 135 µg/mL, rispettivamente) per valutare la cinetica di legame su entrambe le superfici dei recettori. Le iniezioni sono state effettuate a 30 µL/min per 30 secondi, e la superficie è stata rigenerata tra i cicli utilizzando 10 mM glicina-HCl (pH 1,5) per 12 secondi. I sensogrammi sono stati sottratti rispetto al riferimento e analizzati usando il software Biacore X100 Evaluation. I dati di legame sono stati adattati a un modello di Langmuir 1:1, e i parametri cinetici [costante di associazione (K_{on}), costante di dissociazione (K_{off}) e costante di dissociazione all'equilibrio (K_{off}/K_{on})] sono stati ottenuti tramite fitting globale. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per garantire la riproducibilità.

Analisi statistica dei dati

I risultati ottenuti da diversi esperimenti indipendenti sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD). Per la significatività statistica, è stata eseguita un'ANOVA a una via con confronti multipli di Bonferroni utilizzando il software GraphPad Prism 8.4. Le differenze sono state considerate significative quando $p \leq 0,05$.

Risultati

Diffusione dei virus respiratori nel periodo pre e post-pandemia da SARS CoV-2

Durante il periodo di studio (dicembre 2018 - marzo 2023) è stata condotta un'analisi approfondita per esaminare la circolazione dei virus respiratori. In totale sono stati raccolti 564.747 campioni, di cui 559.870 testati per la rilevazione di SARS-CoV-2 e i restanti 4.877 per altri comuni virus respiratori. I campioni provenivano da pazienti ospedalizzati e ambulatoriali degli Spedali Civili di Brescia, in Italia. Per indagare la circolazione dei virus, sono stati considerati tre periodi distinti: pre-pandemico (dicembre 2018 - febbraio 2020), pandemico (marzo 2020 - maggio 2021) e post-pandemico (giugno 2021 - marzo 2023).

La **Tabella 1** mostra la co-circolazione tra SARS-CoV-2 e altri virus respiratori nei periodi analizzati. In linea con l'osservazione che l'emergere di SARS-CoV-2 abbia aumentato la proporzione di campioni positivi, il periodo pandemico presenta la percentuale più alta (50,6%) di campioni risultati positivi per un singolo virus respiratorio. Inoltre, il tasso di positività (39,6%) per un solo virus respiratorio nel periodo post-pandemico è quasi comparabile a quello pre-pandemico (31,1%).

È inoltre interessante come le co-infezioni siano diminuite durante il periodo pandemico: 8 su 10 co-infezioni riguardavano SARS-CoV-2/RV-EV, evidenziando che solo alcuni virus hanno continuato a circolare insieme a SARS-CoV-2.

In particolare, il numero di test positivi per ciascun virus respiratorio (AdV, RSV, PIV, RV/EV, hMPV, FLU-A/B) è stato calcolato durante il periodo post-pandemico e confrontato con quelli dei periodi pre-pandemico e pandemico¹²⁶. La **Figura 1** mostra la distribuzione dei virus respiratori nei tre diversi periodi: AdV 3,7% vs 6,5% vs 5,4%; RSV 18,1% vs 16,1% vs 16,8%; PIV 10,0% vs 1,6% vs 9,3%; RV/EV 9,4% vs 66,1% vs 50,0%; hMPV 2,9% vs 3,2% vs 8,8%; FLU-A/B 55,9% vs 6,5% vs 9,7%. Come mostrato nella **Figura 1**, la circolazione di AdV e RSV è rimasta costante tra i tre

periodi, mentre PIV è diminuito drasticamente durante la pandemia. Al contrario, RV/EV ha mostrato un aumento durante i periodi pandemico e post-pandemico, mentre hMPV è cresciuto leggermente nel periodo post-pandemico. Infine, FLU-A/B, i quali erano i virus più abbondanti nel periodo pre-pandemico, sono diminuiti durante la pandemia e nel periodo post-pandemico.

Tabella 1. Numero di campioni testati per la rilevazione dei virus respiratori durante il periodo pre-pandemico (dicembre 2018 - febbraio 2020), pandemico (marzo 2020 - maggio 2021) e post-pandemico (giugno 2021 - marzo 2023)¹²⁷.

	<i>December 2018 - February 2020 (pre-pandemic)</i>	<i>March 2020 - May 2021 (pandemic)</i>	<i>June 2021- March 2023 (post-pandemic)</i>
Samples tested for at least two viruses	1,105	1,474	2,298
Samples tested positive for one virus	344 (31.1%)	746 (50.6%)	911 (39.6%)
Co-infections	45 (4%)	10 (0.7%)	252 (11%)
Samples tested for SARS-CoV-2 only	0	274,652	285,218
SARS-CoV-2 positive samples	0	54,589	57,401

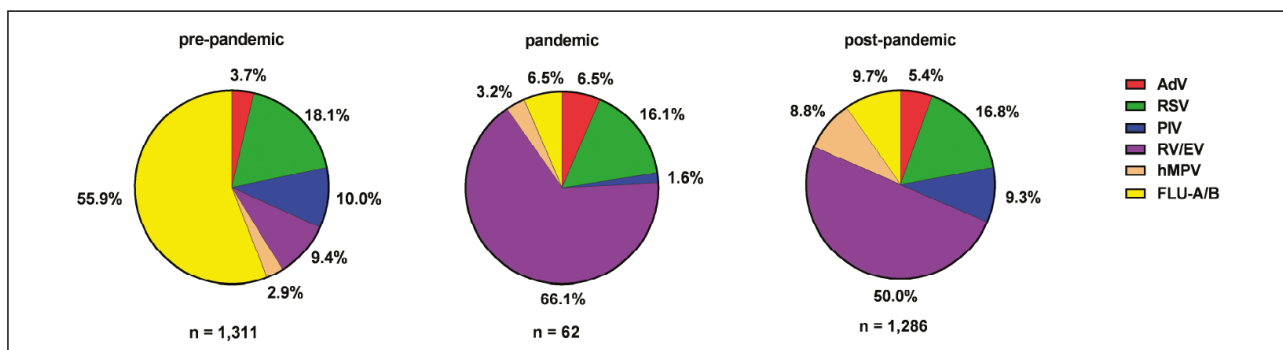


Figura 1. Confronto del tasso di test positivi per ciascuna specie virale tra il periodo pre-pandemico (gennaio 2017 - febbraio 2020), pandemico (marzo 2020 - maggio 2021) e post-pandemico (giugno 2021 - marzo 2023). AdV = Adenovirus, RSV = Virus respiratorio sinciziale, PIV = Virus della parainfluenza, RV = Rhinovirus, EV = Enterovirus, hMPV = Metapneumovirus umano, FLU-A/B = Virus influenzale, n = numero di campioni. Questo grafico è stato realizzato con GraphPad Prism 8.4.3 (RRID: SCR_002798)¹²⁷.

Diffusione stagionale dei virus respiratori

Per approfondire le variazioni nella circolazione dei virus respiratori nell'era post-pandemica, è stata analizzata la loro distribuzione mensile. Come riportato nella **Figura 2**, i casi di SARS-CoV-2, rappresentati dalla linea azzurra, hanno mostrato un costante calo a partire da gennaio 2022, confermando la progressiva conclusione della fase di emergenza. Come conseguenza diretta, altri virus respiratori hanno ripreso a circolare, evidenziando i propri caratteristici pattern stagionali. Tale andamento suggerisce che le misure preventive adottate contro SARS-CoV-2 siano state efficaci anche nel limitare la diffusione degli altri virus respiratori. Durante il periodo pandemico è stato rilevato un solo caso di PIV, mentre a partire da ottobre 2021 il virus ha ripreso la circolazione, raggiungendo un picco nel luglio 2022 (linea blu). Anche la circolazione di RSV è aumentata, passando da 10 a 215 casi diagnosticati. In particolare, RSV ha mostrato picchi durante i mesi invernali (dicembre 2021 e dicembre 2022, linea verde), risultando quasi assente nel resto dell'anno. L'incidenza dei campioni positivi per hMPV è anch'essa aumentata: durante il periodo COVID-19 sono stati registrati soltanto 2 casi, rispetto ai 113 riscontrati nel periodo post-pandemico. Nei mesi invernali e primaverili (da dicembre 2021 a maggio 2022 e da novembre 2022 a marzo 2023, linea arancione), la circolazione di hMPV è risultata più intensa, con un minimo di incidenza durante l'estate. In modo analogo, AdV è riemerso durante tutto l'anno, con picchi osservati a marzo e novembre 2022 (linea rossa). L'incidenza di FLU-A/B è aumentata bruscamente dall'inizio del 2022 fino a marzo 2023, con 125 casi identificati, rispetto ai soli 4 riscontrati nel periodo pandemico. Il tasso di positività per FLU-A/B è rimasto basso per tutto il 2021 (linea gialla), e i primi casi hanno iniziato a ricomparire a gennaio 2022, con un primo picco ad aprile e un secondo a novembre dello stesso anno. È interessante notare come il primo picco sia risultato ritardato (gennaio–giugno 2022) rispetto al consueto andamento stagionale, durante il quale il virus è tipicamente presente nei mesi invernali, come confermato dal secondo picco osservato tra ottobre 2022 e gennaio 2023 (**Figura 2**)¹²⁸. Per quanto riguarda la diffusione di RV/EV, è opportuno sottolineare che questi rappresentano

gli unici virus che hanno continuato a circolare durante il periodo pandemico (De Francesco et al., 2021). Tuttavia, la loro incidenza è aumentata ulteriormente: sono stati notificati 41 campioni positivi durante la pandemia, contro 643 nel periodo successivo. Come mostrato nella **Figura 2**, RV/EV sono stati rilevati in tutti i mesi del 2022 (linea viola), con una lieve diminuzione nei mesi estivi (giugno–agosto 2022), seguita da due picchi principali, a novembre 2022 e marzo 2023, rispettivamente.

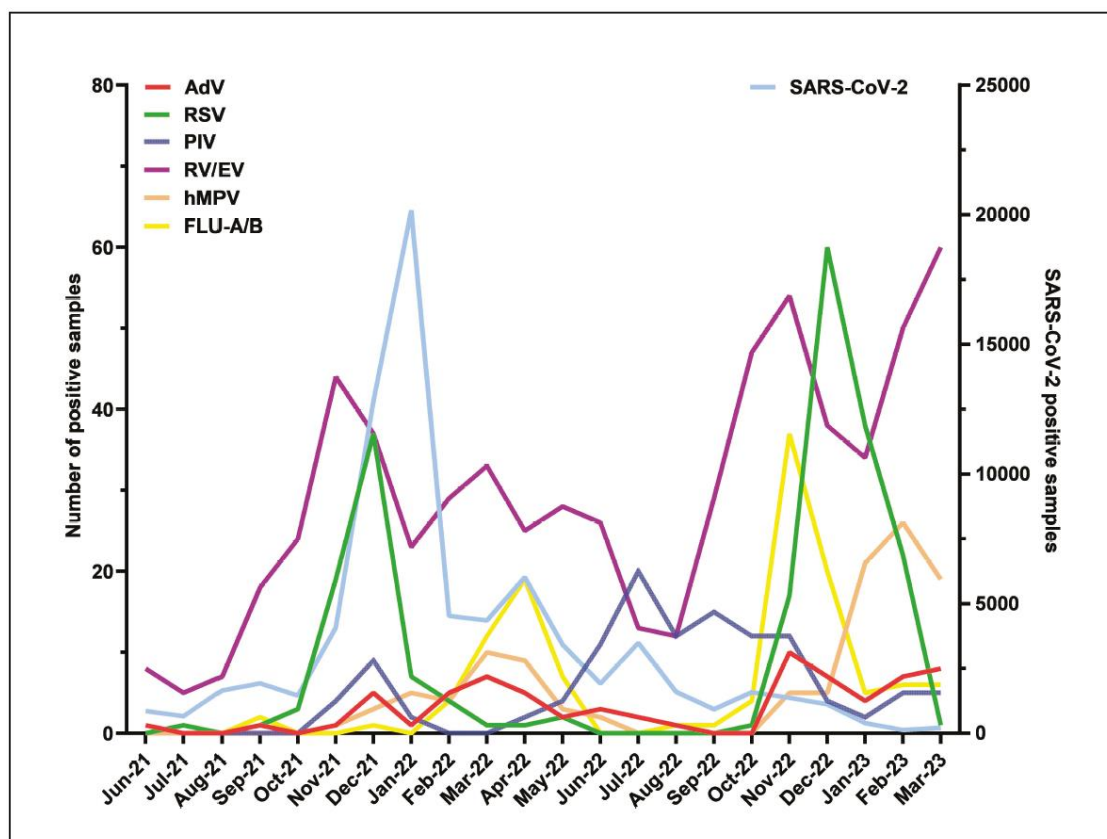


Figura 2. Distribuzione mensile dei casi di virus respiratori raccolti durante il periodo post-pandemico (giugno 2021 - marzo 2023). AdV = Adenovirus, RSV = Virus respiratorio sinciziale, PIV = Virus della parainfluenza, RV = Rhinovirus, EV = Enterovirus, hMPV = Metapneumovirus umano, FLU-A/B = Virus influenzale. Questo grafico è stato realizzato con GraphPad Prism 8.4.3 (RRID: SCR_002798)¹²⁷.

Genotipizzazione dei Rhinovirus ed Enterovirus

Data la rilevante presenza di RV/EV sia nel periodo pandemico sia in quello post-pandemico, abbiamo ulteriormente caratterizzato i virus circolanti nella nostra area geografica. A tal fine, da settembre 2022 a marzo 2023, sono stati raccolti e sequenziati un totale di 151 campioni respiratori

risultati positivi per RV/EV. 101 campioni sono stati tipizzati con successo. La **Tabella 2** riassume le caratteristiche virologiche e demografiche dei pazienti positivi per RV/EV, insieme ai dati sulle co-infezioni.

Considerando l'età dei pazienti, RV-A, CV-A e CV-B erano comunemente presenti nei bambini di 1-5 anni (32,3%, 100% e 31,0%, rispettivamente). Gli Echovirus (ECHO) sono stati osservati principalmente nei pazienti pediatrici, di età compresa tra >1 e 5 anni, rappresentando il 66,6% dei casi positivi totali. Al contrario, RV-C, con una percentuale del 33,3%, è risultato particolarmente diffuso tra soggetti più anziani (>65 anni).

Tabella 2. Caratteristiche virologiche e demografiche dei pazienti positivi a RV/EV sequenziati con successo. RV = Rhinovirus, CV = Coxsackievirus, ECHO = Echovirus¹²⁷.

		RV-A	RV-C	CV-A	CV-B	ECHO
Gender	Female	8 (34.8%)	3 (33.3%)	2 (66.6%)	22 (37.9%)	1 (16.7%)
	Male	23 (65.2%)	9 (66.6%)	1 (33.3%)	36 (62.0%)	5 (83.3%)
Age	<1 year	5 (16.1%)	0	0	15 (25.0%)	2 (33.3%)
	1-5 years	10 (32.3%)	3 (25.0%)	3 (100%)	18 (31.0%)	2 (33.3%)
	6-15 years	5 (16.1%)	2 (16.7%)	0	13 (22.4%)	1 (16.7%)
	1-65 years	8 (25.8%)	3 (25.0%)	0	7 (11.7%)	1 (16.7%)
	>65 years	3 (9.68%)	4 (33.3%)	0	5 (8.3%)	0
Co-infections	No co-infections	26 (83.8%)	11 (91.7%)	2 (66.6%)	50 (86.2%)	3 (50.0%)
	Co-infections	5 (16.2%)	1 (8.3%)	1 (33.3%)	8 (13.8%)	3 (50.0%)
	RV-A	0	0	0	4 (50.0%)	1 (33.3%)
	RV-C	0	0	0	1 (12.5%)	0
	CV-A	0	0	0	1 (12.5%)	0
	CV-B	4 (80.0%)	1 (100%)	1 (100%)	0	2 (66.7%)
	ECHO	1 (20.0%)	0	0	2 (25.0%)	0

Successivamente, ci siamo concentrati sulla distribuzione mensile di RV/EV nel periodo studiato. Come mostrato nella **Figura 3**, nei mesi di settembre e ottobre 2022 la maggior parte dei campioni positivi è stata identificata come CV-B (42,9% a settembre e 68,0% a ottobre) e RV-A (57,1% a settembre e 28,0% a ottobre), mentre sono stati rilevati solo pochi casi di RV-C in ottobre 2022 (4,0%). È interessante notare che ECHO è stato riscontrato esclusivamente nei mesi invernali: infatti, è stato rilevato nel 5,6% dei campioni a novembre 2022, salendo al 10,7% a dicembre 2022 e

raggiungendo il 20,0% dei campioni a gennaio 2023. Nel periodo compreso tra novembre 2022 e gennaio 2023, le varianti identificate hanno mostrato una predominanza di CV-B, seguita da RV-C a novembre 2022 e gennaio 2023. RV-A è stato rilevato a livelli elevati a novembre e dicembre 2022 (19,4% e 28,6%, rispettivamente), mentre è risultato assente a gennaio 2023. A dicembre 2022, il 7,1% dei campioni era positivo per CV-A, rilevato anche a febbraio 2023 (16,7%) insieme a CV-B e RV-A. Tra i campioni raccolti a marzo 2023, il 60,0% è stato identificato come CV-B e il 40,0% come RV-A, evidenziando una riduzione della variabilità osservata nei mesi invernali. La maggior parte dei campioni analizzati non presentava alcuna co-infezione (92/110, 83,6%, Tabella 2). Nei restanti 18/110 casi (16,4%), RV/EV è stato rilevato insieme ad almeno un altro virus respiratorio. Tra le 18 co-infezioni, CV-B è risultato il virus più frequentemente rilevato, presente in 8/18 casi (44,4%), seguito da RV-A 5/18 (27,8%), ECHO 3/18 (16,7%), RV-C 1/18 (5,6%) e CV-A 1/18 (5,6%).

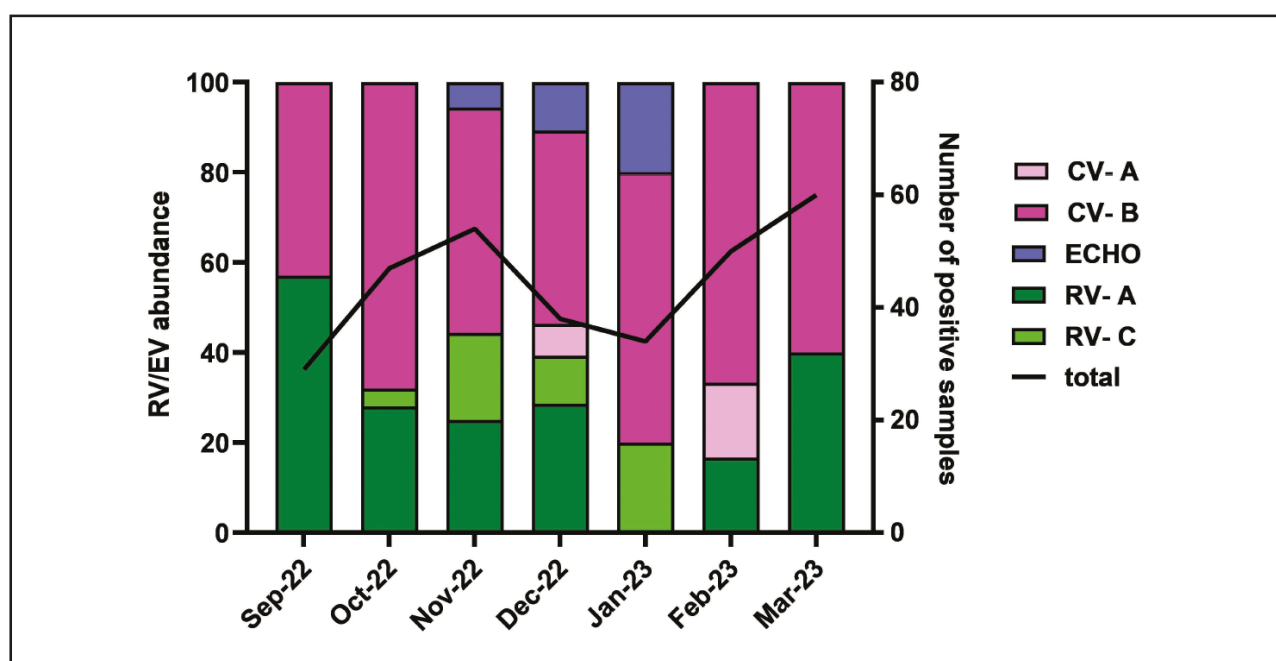


Figura 3. Abbondanza dei ceppi di RV/EV identificati nel periodo da settembre 2022 a marzo 2023. La linea nera rappresenta il numero totale di campioni respiratori raccolti e testati nello stesso intervallo di tempo. CV = Cocksackievirus, ECHO = Echovirus, RV = Rhinovirus. Questo grafico è stato realizzato con GraphPad Prism versione 8.4.3 (RRID: SCR_002798)¹²⁷.

Caratteristiche molecolari del nuovo isolato ricombinante di Echovirus 11

Un tampone nasofaringeo è stato prelevato da una bambina di un mese ricoverata presso la clinica pediatrica degli Spedali Civili di Brescia (Italia) per distress respiratorio. L'analisi molecolare ha rivelato la presenza di Rhinovirus/Enterovirus nel campione clinico ed il Next Generation Sequencing ha identificato il virus come Echovirus 11. Il tampone nasofaringeo è stato quindi utilizzato per isolare il virus su cellule A549. All'insorgenza degli effetti citopatici, è stato raccolto il surnatante cellulare e l'isolato virale, denominato "Leonard", è stato sequenziato (genoma non ancora depositato). Come mostrato in **Figura 4A**, l'analisi filogenetica dei ceppi di Echovirus 11, incluso il ceppo recentemente sequenziato Echovirus11|Leonard|2022-12-16, ha rivelato un raggruppamento evolutivo significativo con ceppi globali contemporanei. È stato inizialmente costruito un albero filogenetico preliminare contenente tutti i ceppi disponibili, identificando il ceppo ancestrale 80059.1|Echovirus_E11|1995-09-04 come clade basale. Da questo albero completo, solo un sottoinsieme di ceppi appartenenti alla nuova linea identificata è stato utilizzato per ulteriori analisi bayesiane. La nostra analisi ha rivelato che il ceppo di Echovirus 11 recentemente sequenziato si raggruppa con un gruppo di ceppi isolati in Paesi europei, comprese sequenze recenti dall'Italia campionate nel 2023 (probabilità posteriore = 1,0). Basali rispetto a questo clade sono ceppi provenienti dagli USA (2018) e dalla Francia (2023). L'analisi filodinamica bayesiana suggerisce che l'antenato comune più recente di questo cluster sia emerso alla fine del 2021, con un'espansione virale principalmente nel corso del 2022 e all'inizio del 2023. L'analisi SimPlot utilizzando il nuovo ceppo di Echovirus 11 come query (**Figura 4B, pannello A**) supporta ulteriormente la presenza di ricombinazione, con la maggiore somiglianza osservata rispetto al ceppo prototipo di Echovirus 11 (OQ969171.1) nelle regioni P1, P2, 3A e 3B. Tuttavia, nelle regioni 3Cpro e 3Dpol, il ceppo in esame ha mostrato una maggiore somiglianza al ceppo E6 (OR840838.1), suggerendo un evento di ricombinazione tra questi ceppi. L'analisi BootScanning (**Figura 4B, pannello B**) ha confermato un punto di rottura della ricombinazione intorno alla

posizione nucleotidica 5200, dove è stato rilevato un chiaro cambiamento nei pattern di somiglianza tra i ceppi di Echovirus 11 e Echovirus 6. Questo evento di ricombinazione evidenzia la natura dinamica dell'evoluzione di Echovirus 11 e le potenziali conseguenze sulla sua adattabilità, dinamica di trasmissione e patogenicità.

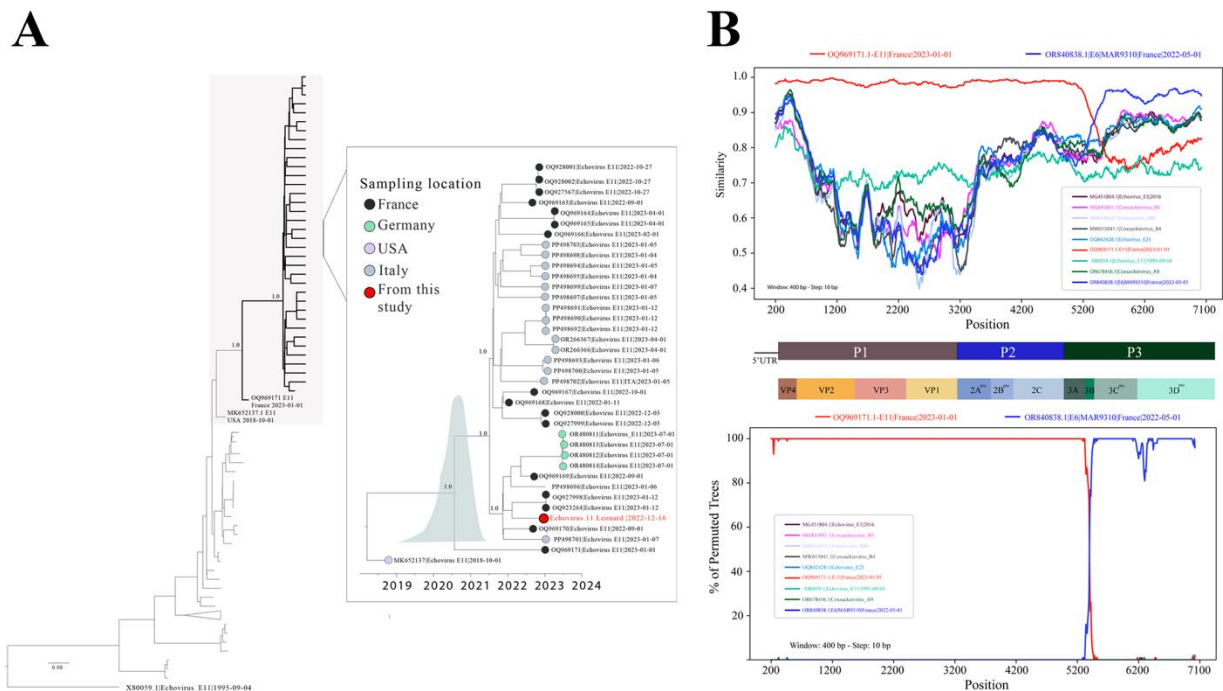


Figura 4. Alberi filogenetici e analisi di ricombinazione della nuova variante isolata di Echovirus 11.

(A) Analisi filogenetica dei genomi di Echovirus 11 provenienti da campioni globali. L'albero di maximum clade credibility (MCC) scalato nel tempo è stato generato a partire dai campioni globali utilizzando BEAST v1.10.4 e visualizzato con il pacchetto ggtree in R. L'inserito a destra fornisce una vista ingrandita del clade che include le sequenze raccolte tra il 2020 e il 2024, mostrando eventi di divergenza recenti, in particolare per le sequenze provenienti da Francia, Stati Uniti d'America (USA), Italia e Germania. Le probabilità superiori ad 1,0 sono indicate sui rami principali, dimostrando un forte supporto per le relazioni filogenetiche inferite. (B) Analisi della somiglianza genomica e della ricombinazione di Echovirus 11. Le analisi di ricombinazione della nuova linea di Echovirus 11, utilizzata come query, sono state confrontate con diversi genomi di enterovirus e coxsackievirus, inclusi Echovirus 11 (OQ969171.1, Francia 2022-01-05, linea blu), il ceppo più antico di Echovirus 11 (X80059.1, 1995-09-04, linea verde) e Echovirus 6 (OR840838.1, Francia 2022-05-01). Nel pannello superiore è riportato il plot di somiglianza; nel pannello inferiore l'analisi di boot scanning dei ceppi con potenziali ceppi parentali.

Stabilità genomica del ceppo Leonard di Echovirus 11 durante la propagazione in vitro

Utilizzando dati di deep sequencing, siamo stati in grado di seguire la dinamica evolutiva del ceppo Leonard durante la propagazione in vitro. Facendo riferimento a un genoma contemporaneo di Echovirus 11 (GenBank: OQ927998.1), sin dalla sua prima isolazione, l'isolato Leonard ha mostrato 61 varianti a singolo nucleotide (SNV), sinonime e non sinonime, con frequenza allelica >10% (**Figura 5**). Complessivamente, l'abbondanza maggiore di SNV è risultata principalmente distribuita nel gene 3D (n = 14), seguita da VP2 e VP3 (n = 10), VP1 e 2C (n = 7), 3A e 3C (n = 3), 2A (n = 2), VP4 (n = 1) e nelle regioni non codificanti (n = 4). È importante notare che solo 11 su 61 SNV (18,03%) rappresentano varianti nucleotidiche non sinonime, la maggior parte delle quali (36,36%) coinvolge i geni 3D e 3A. Il confronto tra SNV sinonime e non sinonime accumulate in tre passaggi seriali virali in cellule A549 ha rivelato solo varianti preesistenti di Echovirus 11. In particolare, molte SNV già presenti a basse frequenze nel primo passaggio dell'isolato sono riapparse a frequenze simili nei passaggi successivi, suggerendo che la competizione tra le sotto-popolazioni virali si sia mantenuta. Avendo confermato la stabilità del ceppo Leonard di Echovirus 11 su tre passaggi in cellule A549, tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando un unico inoculo virale ottenuto al terzo passaggio.

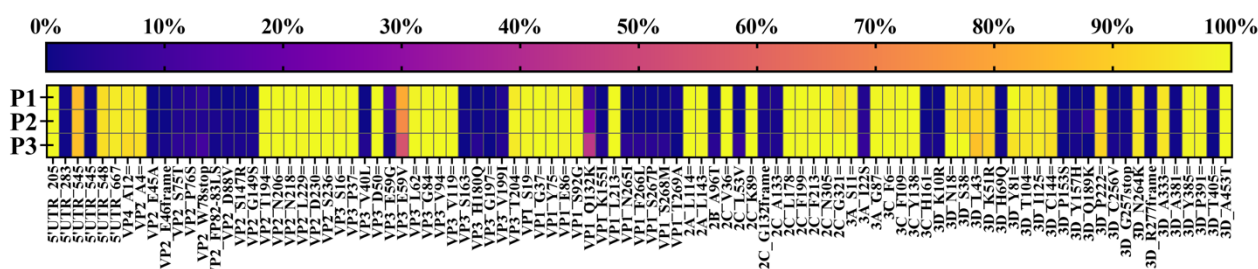


Figura 5. Dinamica delle quasispecie del ceppo di Echovirus 11 Leonard durante passaggi seriali in cellule A549. La seguente heatmap che mostra la percentuale di letture paired-end mappate corrispondenti a varianti a singolo nucleotide (SNV) sinonime e non sinonime accumulate lungo il genoma virale durante tre passaggi consecutivi (P1, P2 e P3) in cellule A549. Le SNV sono state quantificate a ciascun passaggio per valutare i cambiamenti nella composizione delle quasispecie nel tempo. Le posizioni degli amminoacidi sono riferite alla sequenza di riferimento contemporanea di Echovirus 11 (GenBank OQ927998.1).

Il ceppo Leonard mostra un effetto citopatico maggiore rispetto al ceppo prototipo Gregory

Per comprendere meglio l'aumentata patogenicità mostrata dal nuovo Echovirus 11 ricombinante negli esseri umani, il ceppo Leonard è stato confrontato con il ceppo di riferimento Echovirus 11 Gregory (VR-41, ATCC) per la sua capacità di replicarsi e indurre morte cellulare in vitro. A tal fine, sono state utilizzate cellule A549 come modello rappresentativo per l'infezione da Echovirus¹²⁹. Le differenze nella dinamica virale sono state valutate infettando le cellule A549 con diverse molteplicità di infezione (MOI) di entrambi i ceppi virali, variando da 0,005 a 1, e misurando la vitalità cellulare in diversi intervalli di tempo.

Come mostrato in **Figura 6A (pannello superiore)**, Leonard è risultato significativamente più aggressivo di Gregory nell'indurre la morte cellulare. A MOI più elevate (1 e 0,1), entrambi i ceppi virali hanno indotto un rapido effetto citopatico già 12 ore post-infezione (h.p.i.). A MOI più basse invece, la progressione dell'infezione era più graduale, consentendo una distinzione più chiara tra i due ceppi in termini di patogenicità e offrendo una finestra temporale più ampia per studiare le prime fasi della replicazione virale. In particolare, a MOI 0,005, il ceppo Leonard ha mostrato un effetto citolitico significativamente maggiore rispetto a Gregory. Infatti, dopo 24 h.p.i., Leonard ha causato una marcata riduzione della vitalità cellulare, con solo il $33,85\% \pm 1,38\%$ delle cellule A549 ancora vitali, rispetto all' $86,75\% \pm 2,66\%$ delle cellule infettate da Gregory.

Inoltre, Leonard ha evidenziato una migliore replicazione rispetto a Gregory nelle cellule ospiti A549, come attestato da un aumento del carico virale e del rilascio di particelle infettive nel surnatante cellulare, quantificato rispettivamente mediante digital droplet PCR (ddPCR) (**Figura 6A, pannello centrale**) e saggio delle placche (**Figura 6A, pannello inferiore**). Complessivamente, questi dati dimostrano che entrambi i virus, a MOI 0,005, inducono un effetto citopatico relativamente più lieve pur mantenendo differenze patogenetiche rispetto a MOI più elevate. Pertanto, la MOI 0,005 è

risultata più adatta per studiare i meccanismi che determinano il diverso comportamento dei due ceppi virali ed è stata utilizzata nei successivi esperimenti.

Il diverso effetto citopatico osservato tra i ceppi Leonard e Gregory in cellule A549 è stato ulteriormente confermato in cellule endoteliali primarie della vena ombelicale umana (HUVEC), note per essere un bersaglio adatto alla replicazione attiva di Echovirus 11¹³⁰. Come mostrato in **Figura 6B**, a MOI 0,005 Leonard ha indotto una perdita più rapida e progressiva dell'integrità del monostrato. In particolare, le cellule vitali infettate da Leonard erano il $76 \pm 2\%$ a 12 h.p.i., rispetto al 99% delle cellule infettate da Gregory. Questo divario si è ampliato a 24 h.p.i., quando Leonard ha ridotto la vitalità cellulare al $49,5\% \pm 1,5\%$, mentre Gregory ha mantenuto il $79\% \pm 1\%$ delle cellule vitali (**Figura 6B, pannello superiore**). Come previsto, Leonard ha mostrato una replicazione significativamente maggiore rispetto a Gregory nelle HUVEC, come rilevato mediante ddPCR (**Figura 6B, pannello centrale**) e saggio delle placche (**Figura 6B, pannello inferiore**).

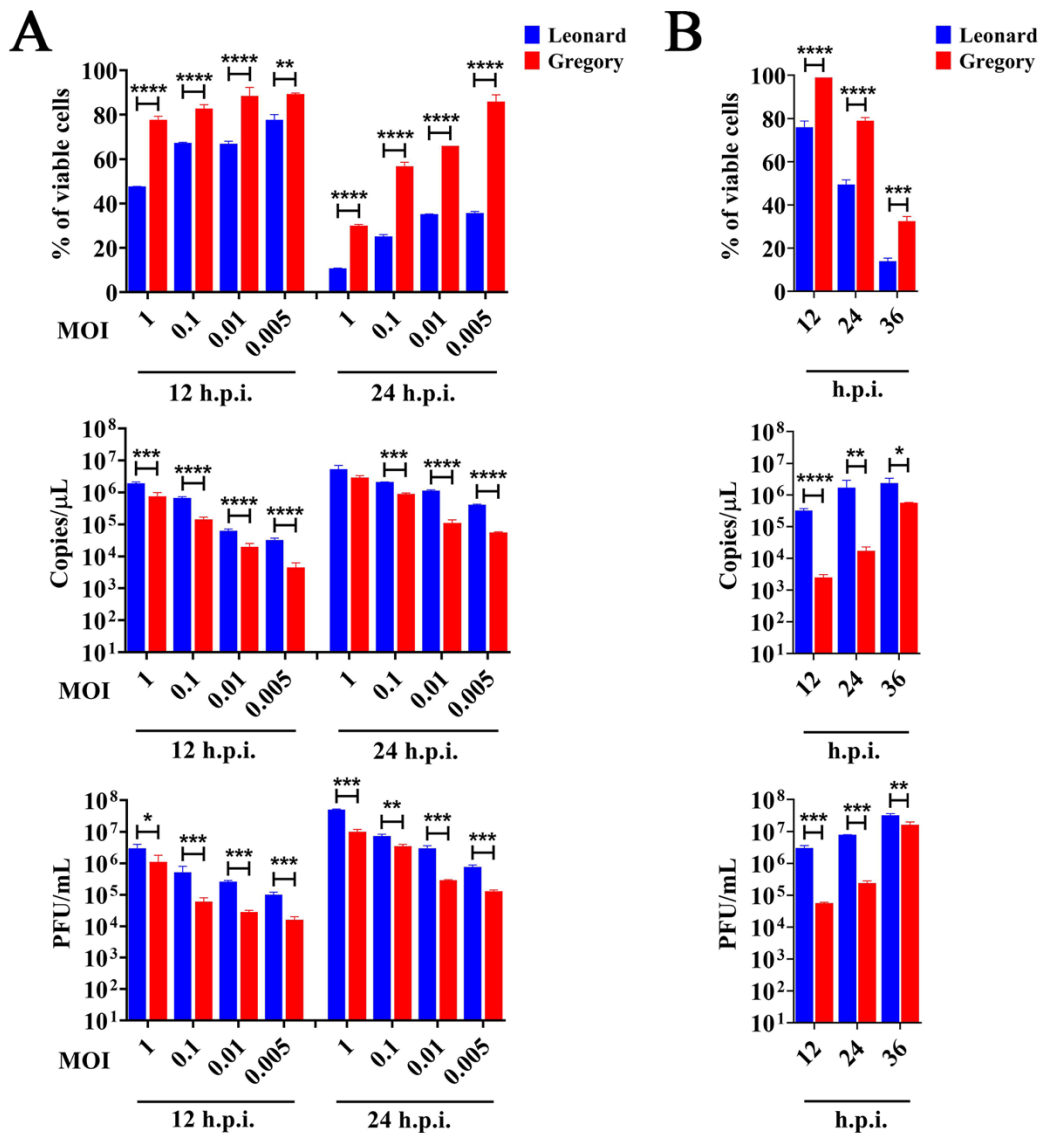


Figura 6. Effetto citopatico e replicazione virale dei ceppi di Echovirus 11 Leonard e Gregory. (A) Cellule epiteliali polmonari A549 sono state infettate con i ceppi di Echovirus 11 Leonard e Gregory a diverse molteplicità di infezione (MOI: 1, 0,1, 0,01 e 0,005) e analizzate a 12 e 24 ore post-infezione (h.p.i.) per la vitalità cellulare (sinistra), per il rilascio di genomi virali mediante ddPCR (pannello centrale) e per il numero di particelle infettive tramite saggio delle placche (pannello destro). (B) Le HUVEC sono state infettate con i ceppi Leonard o Gregory a MOI 0,005 e analizzate a 12, 24 e 36 h.p.i. per la vitalità cellulare (sinistra), per il rilascio di genomi virali mediante ddPCR (pannello centrale) e per il numero di particelle infettive tramite saggio delle placche (pannello destro). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando one-way ANOVA con il test post hoc di Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Il ceppo Leonard ha la capacità di indurre l'apoptosi estrinseca

L'apoptosi è un elemento importante nelle infezioni virali e può influenzare la replicazione virale sia negativamente che positivamente. Le cellule subiscono apoptosi in risposta all'infezione virale per ridurre i serbatoi virali e limitare il rilascio del virus. D'altra parte, alcuni virus sfruttano l'induzione dell'apoptosi per migliorare il rilascio e la diffusione^{131,132}.

Per caratterizzare la risposta apoptotica delle cellule infettate da Echovirus 11, abbiamo prima valutato l'attivazione della caspasi 3, la principale caspasi effettore responsabile della fase esecutiva dell'apoptosi. Parallelamente, abbiamo valutato l'attivazione delle caspasi 8 e 9, caspasi iniziatrici coinvolte rispettivamente nelle vie apoptotiche estrinseca (mediata dal recettore di morte) e intrinseca (mitocondriale).

Come mostrato in **Figura 7**, l'analisi immunoblot ha confermato la capacità di entrambi i ceppi di Echovirus 11, Leonard e Gregory, di indurre l'attivazione della caspasi 3 nelle cellule A549, sebbene questa si sia verificata prima nelle cellule infettate da Leonard. In particolare, l'attivazione della caspasi 3 ha mostrato un andamento bifasico nelle cellule infettate da Leonard, con un aumento significativo iniziale a 10 h.p.i., seguito da un calo e successivamente da una più marcata attivazione a 18 h.p.i. Al contrario, un'attivazione statisticamente significativa della caspasi 3 nelle cellule infettate da Gregory è stata osservata solo a 15 h.p.i.

Per definire meglio la via apoptotica coinvolta, abbiamo valutato l'attivazione della caspasi 8, principale iniziatore della via estrinseca mediata dal recettore di morte, e della caspasi 9, iniziatore centrale della via intrinseca. È stato osservato che l'attivazione della caspasi 8 era statisticamente significativa nelle cellule infettate da Leonard già a 1 e 2 h.p.i., mentre non è stata rilevata nelle cellule infettate da Gregory in nessuna delle tempistiche analizzate. Per quanto riguarda la via intrinseca, l'attivazione della caspasi 9 è diventata evidente a 8 h.p.i. nelle cellule infettate da Leonard, mentre nelle cellule infettate da Gregory è stata rilevabile solo a 15 e 18 h.p.i.

Questo risultato ci suggerisce che, a differenza del ceppo di riferimento, l'isolato Leonard attiva la via estrinseca dell'apoptosi per indurre la morte delle cellule ospiti, contribuendo potenzialmente al suo maggiore effetto citopatico e alla patogenicità.

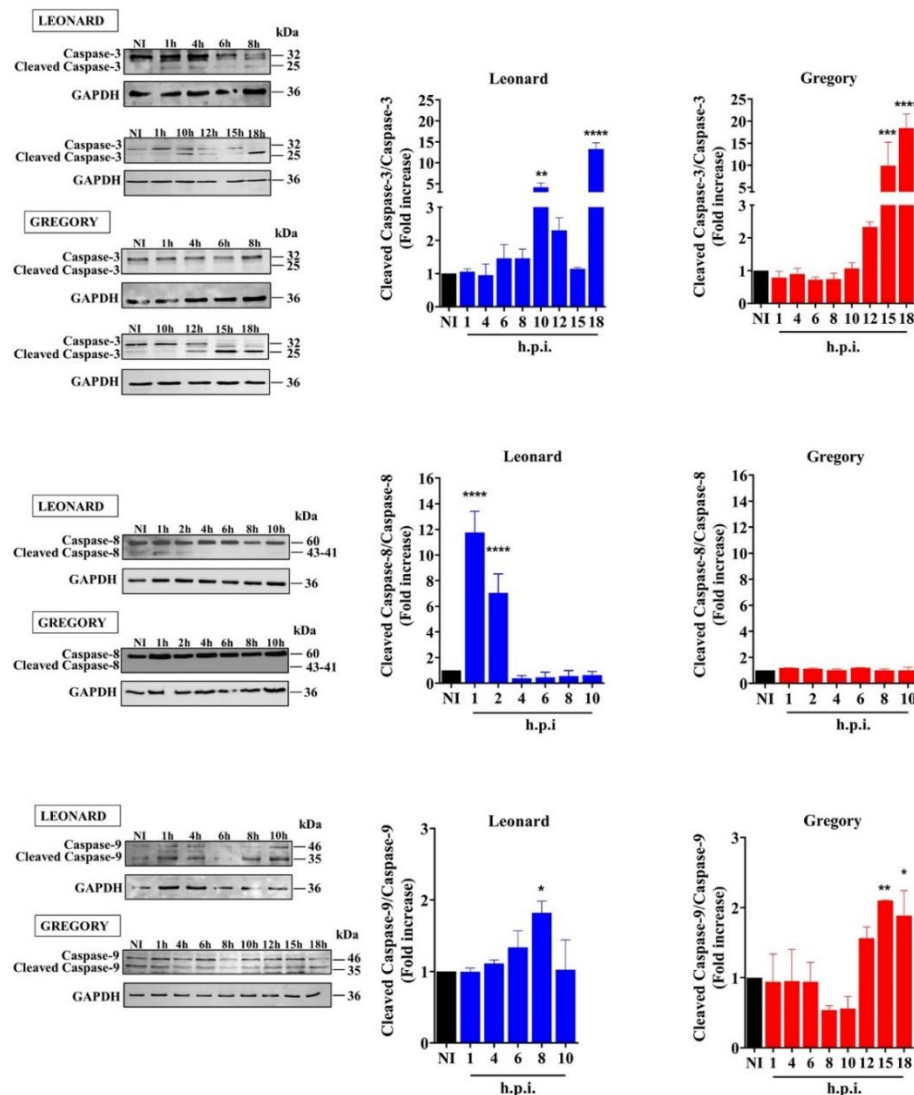


Figura 7. Analisi dell'attivazione delle caspasi 3, 8 e 9 nelle cellule infettate. Le cellule A549 sono state infettate ad una MOI di 0,005 con i ceppi di Echovirus 11 Leonard o Gregory, e le forme totali e clivate delle caspasi 3, 8 e 9 sono state valutate mediante immunoblot a diverse tempistiche post-infezione (h.p.i.). Il GAPDH è stato utilizzato come controllo di caricamento. Le immunoblots mostrate sono rappresentative di uno dei tre esperimenti indipendenti con risultati simili. Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti, in cui l'intensità delle bande è stata valutata tramite analisi densitometrica ed espressa come incremento rispetto ai controlli non infettati (NI). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando one-way ANOVA con il test post hoc di Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Il ceppo Leonard induce l'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi legandosi direttamente al recettore FAS

La via apoptotica estrinseca è tipicamente avviata da un numero limitato di recettori di morte legati alla membrana, tra cui FAS, TNFR1 e TRAIL-R1. Al legame con il ligando, questi recettori attivano cascata di segnali intracellulari che culminano nell'attivazione della caspasi 8. Per determinare il contributo funzionale dei recettori di morte all'apoptosi indotta dal virus, sono stati impiegati anticorpi neutralizzanti specifici (nAb) diretti contro FAS, TNFR1 e TRAIL-R1.

Le cellule A549 sono state pre-incubate con ciascun nAb per 1 ora prima dell'infezione con il ceppo Leonard o Gregory. Dopo l'infezione, la stessa concentrazione di nAb è stata mantenuta nel mezzo di coltura e reintegrata ogni 12 ore per tutta la durata dell'esperimento. La vitalità cellulare è stata valutata a 12 e 24 h.p.i. mediante conteggio cellulare. Come mostrato in **Figura 8A (pannello superiore)**, l'infezione da Leonard ha determinato un effetto citolitico significativo, con solo il $30,45\% \pm 0,22\%$ di cellule vitali a 24 h.p.i. Il pre-trattamento con l'anticorpo anti-FAS (anti-FAS) ha migliorato significativamente la vitalità cellulare, portandola al $50,56\% \pm 0,56\%$. Al contrario, il pre-trattamento con anti-TNFR1 (anti-TNFR-1) (**Figura 8, pannello centrale**) o anti-TRAIL-R1 (anti-TRAIL-R1) (**Figura 8, pannello inferiore**) non ha mostrato alcun effetto protettivo.

Per confermare se l'effetto protettivo dell'anti-FAS fosse associato all'inibizione della segnalazione estrinseca dell'apoptosi, è stata valutata l'attivazione della caspasi 8 mediante immunoblot (**Figura 8, pannello B**). L'infezione da Leonard ha indotto un marcato clivaggio della caspasi 8, mentre il pre-trattamento con anti-FAS ha completamente invertito la situazione rimuovendo la comparsa della forma clivata, indicando un'efficace inibizione della via estrinseca dell'apoptosi.

Successivamente, abbiamo valutato se la segnalazione FAS contribuisse anche alla replicazione virale. La quantificazione del carico virale nel surnatante mediante saggio delle placche e ddPCR a 12 e 24 h.p.i. (**Figura 8, pannello C**) ha mostrato che il blocco di FAS riduce significativamente il rilascio sia delle copie genomiche virali (**pannello sinistro**) sia delle particelle virali infettive

(**pannello destro**). Le cellule infettate da Leonard hanno rilasciato circa $1,2 \times 10^6$ PFU/mL e $2,4 \times 10^6$ PFU/mL a 12 e 24 h.p.i., rispettivamente. Il pre-trattamento con anti-FAS ha portato a una riduzione significativa del carico virale in entrambi i tempi, con una riduzione rispettivamente di circa il 43% e il 54%. Un andamento simile è stato osservato nell'analisi ddPCR delle copie genomiche virali. Le cellule infettate da Leonard mostravano in media $4,2 \times 10^5$ copie/ μ L a 12 h.p.i., che aumentavano a $9,1 \times 10^5$ copie/ μ L a 24 h.p.i. Al contrario, le cellule pre-trattate con anti-FAS hanno mostrato una riduzione costante del 50% dei livelli di RNA virale rispetto alle cellule non trattate. Questi dati dimostrano che l'attivazione di FAS non solo contribuisce al processo apoptotico, ma gioca anche un ruolo funzionale nell'amplificare la replicazione e/o il rilascio virale. Il blocco di questa interazione tramite un anticorpo neutralizzante compromette sostanzialmente il rilascio sia dell'RNA genomico virale sia delle particelle infettive, rafforzando l'ipotesi che il ceppo Leonard sfrutti la segnalazione FAS per migliorare la sua fitness replicativa.

Per approfondire le basi molecolari del coinvolgimento di FAS, sono state valutate le interazioni dirette virus-recettore mediante analisi SPR (**Figura 8, pannello D**). Entrambi i ceppi Leonard e Gregory hanno mostrato la capacità di legarsi a FcRn (**pannello in alto a sinistra**). Questa interazione avviene in modo dose-dipendente, con costanti di dissociazione di circa 90 nM per Gregory (**pannello centrale**) e 190 nM per Leonard (**pannello inferiore**), rispettivamente. I parametri cinetici dell'interazione sono riportati nella **Tabella 3**. Questi risultati indicano che Gregory si lega a FcRn con maggiore affinità rispetto a Leonard.

Al contrario, quando testati per il legame a FAS, solo Leonard ha mostrato un legame rilevabile con il recettore immobilizzato, mentre Gregory non ha mostrato alcuna interazione misurabile nelle stesse condizioni sperimentali (**pannello in alto a destra**). Come mostrato nel pannello centrale destro, una curva dose-risposta e l'analisi cinetica sono state effettuate sulla superficie FAS solo per il ceppo Leonard. L'interazione ha seguito un modello di legame Langmuir 1:1, con una costante di affinità pari a 178 nM (vedere **Tabella 3** per i parametri dettagliati). Un anticorpo anti-FAS è stato utilizzato per confermare la specificità della superficie del chip sensore (**pannello inferiore destro**).

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che entrambi i virus si legano a FcRn, mentre solo Leonard può interagire con FAS, evidenziando una differenza specifica di ceppo nell'uso del recettore.

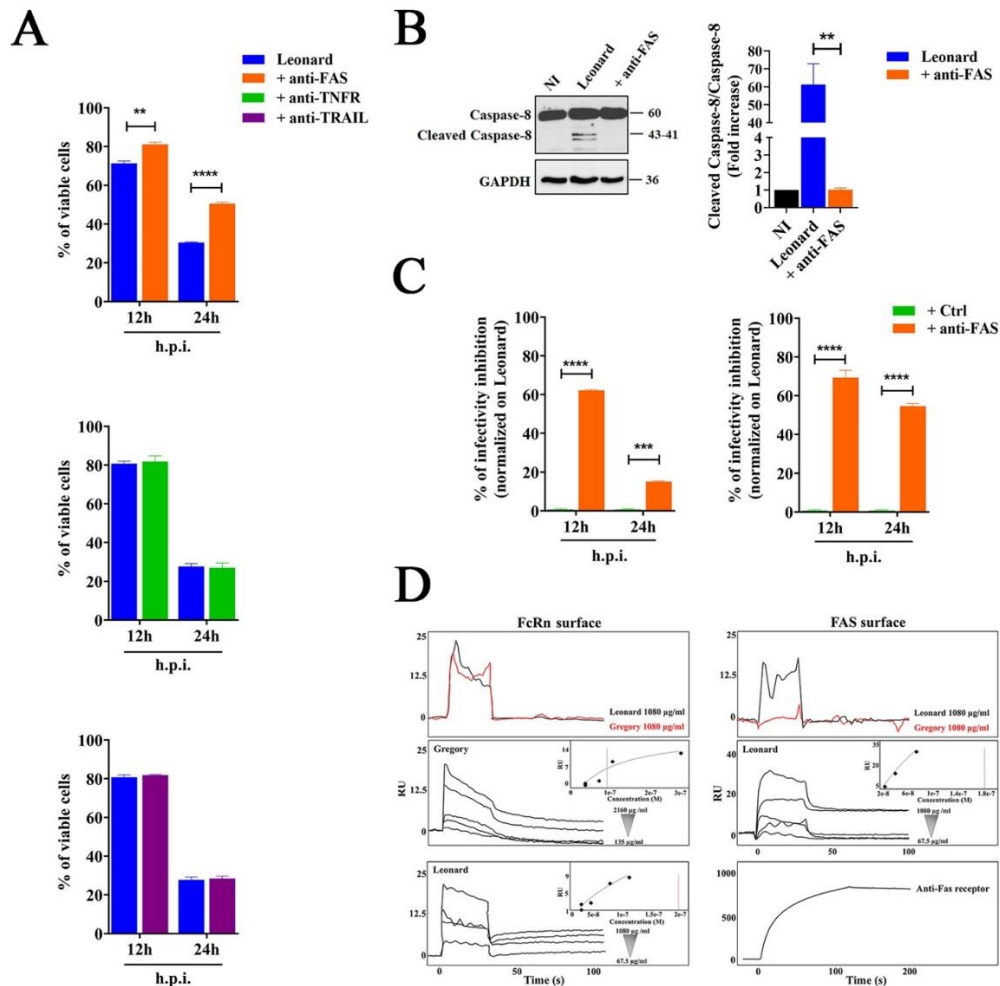


Figura 8. Legame del ceppo Leonard al recettore FAS e coinvolgimento di FAS nell'apoptosi estrinseca e nella replicazione virale indotte da Leonard.

(A) Le cellule A549 sono state pre-trattate per 1 ora con anticorpi neutralizzanti contro FAS (arancione), TNFR1 (verde) o TRAIL-R1 (viola) e successivamente infettate con il ceppo Leonard. Il corrispondente anticorpo è stato mantenuto nel mezzo di coltura e reintegrato ogni 12 ore. La vitalità cellulare è stata valutata mediante conteggio delle cellule a 12 e 24 ore post-infezione (h.p.i.). (B) Analisi mediante immunoblot dell'attivazione della caspasi 8 in cellule A549 infettate con Leonard e coltivate in presenza o assenza dell'anticorpo neutralizzante anti-FAS (nAb). (C) La replicazione virale in seguito all'infezione con Leonard, con o senza trattamento con anti-FAS nAb, è stata misurata tramite saggio delle placche (pannello sinistro) e ddPCR (pannello destro). (D) Analisi SPR del legame delle particelle virali Leonard e Gregory ai recettori umani FcRn e FAS.

Tabella 3. Parametri cinetici dell'interazione tra Gregory e Leonard con i recettori hFcRn e Fas immobilizzati.

Strain	hFCRN receptor				Fas receptor			
	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$Kd_{cin}(M)$	$Kd_{eq}(M)$	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$Kd_{cin}(M)$	$Kd_{eq}(M)$
Gregory	379.7	0.001456	3.833E-6	9.055E-8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Leonard	295.1	0.001636	5.545E-6	1.901E-7	1.265E+7	0.2137	1.689E-8	1.786E-7

Discussione

La pandemia di COVID-19 ha avuto un impatto negativo sulla società, sull'economia e sulla vita quotidiana, creando numerosi problemi per la salute pubblica in tutto il mondo¹³³. In particolare, la pandemia da SARS-CoV-2 ha provocato cambiamenti eccezionali nel comportamento umano, modificando la circolazione dei virus respiratori non-SARS-CoV-2. In questo studio, abbiamo dimostrato che la fine della pandemia, seguita dal ritiro delle misure non farmaceutiche (NPI), ha cambiato lo scenario della circolazione dei virus respiratori comuni e ha indotto l'emergere e il riemergere di virus precedentemente poco comuni.

Abbiamo mostrato che la riduzione delle infezioni respiratorie non-SARS-CoV-2 è stata significativa all'inizio della pandemia e ha oscillato durante le successive ondate di COVID-19. In particolare, con il ritiro delle misure preventive, ciascun virus è tornato alla frequenza pre-pandemica, ma in alcuni casi con tempistiche diverse. Ad esempio, il PIV, assente durante il periodo pandemico, ha rapidamente ricominciato a circolare in autunno 2021, mentre l'RSV è aumentato in autunno e inverno 2021, mostrando la sua tipica stagionalità^{134,135}. Al contrario, l'hMPV è comparso lentamente a novembre 2021, con una distribuzione inferiore alla media durante l'anno, mostrando un numero significativamente maggiore di casi solo durante il suo classico picco stagionale, da dicembre 2022 a marzo 2023¹³⁶. Inoltre, il tasso di positività per FLU-A/B è rimasto sorprendentemente basso per tutto il 2021, riacquisendo presenza nella comunità solo all'inizio del 2022.

In particolare, abbiamo osservato un aumento atipico di RV/EV, con un incremento significativo durante il periodo pandemico e post-pandemico rispetto al periodo pre-pandemico. I nostri dati sono simili a quelli ottenuti nel Lazio, dove è stata osservata una diminuzione significativa dei virus respiratori, tra cui RSV e FLU-A/B, fatta eccezione per RV¹³⁷. La scomparsa di alcuni virus durante la pandemia, e quindi la perdita di una risposta immunitaria adeguata nella popolazione, potrebbe aver aumentato la suscettibilità alle infezioni¹³⁷.

L'importanza della genotipizzazione risiede nel fatto che gli EV svolgono un ruolo in patologie clinicamente rilevanti come nel caso dell'Echovirus 11, il quale, già noto per la sua patogenicità, è rapidamente emerso in Europa intorno al 2022, causando diversi decessi neonatali e suscitando notevoli preoccupazioni per la salute pubblica^{111,112,138}. A maggio 2023, tutte le sequenze di Echovirus 11 appartenevano a un'unica linea dominante, denominata D5, costituita da una variante originata da un evento di ricombinazione con Echovirus 6 nelle regioni 3Cpro e 3Dpol^{117,139}, e caratterizzata da una maggiore variabilità in diversi residui amminoacidici delle proteine strutturali rispetto ai ceppi di Echovirus 11 circolanti in precedenza. La disponibilità di un isolato clinico del genotipo dominante D5, denominato Leonard, ci ha permesso di studiare per la prima volta l'influenza delle variazioni genetiche sulla patogenicità di questo virus emergente, confrontandolo con il ceppo prototipo Gregory.

In questo studio dimostriamo che Leonard è più aggressivo di Gregory in termini di replicazione litica sia nelle cellule epiteliali polmonari umane (A549) sia nelle cellule endoteliali umane della vena ombelicale (HUVECs). In particolare, Leonard ha causato una riduzione marcata della vitalità cellulare rispetto a Gregory, e ha mostrato anche una replicazione più efficiente in entrambe le linee cellulari, come attestato da un aumento del carico virale e del rilascio di particelle infettive nel surnatante cellulare. Poiché l'apoptosi mediata dai recettori della morte rappresenta un meccanismo efficiente attraverso cui i virus possono indurre la morte cellulare e diffondere le progenie virali, il nostro obiettivo era comprendere se Leonard fosse più efficiente di Gregory nell'indurre apoptosi. L'apoptosi può essere attivata da due vie di segnalazione distinte: la via intrinseca e la via estrinseca¹⁴⁰⁻¹⁴². La via intrinseca viene innescata da diverse condizioni di stress intracellulare e porta al rilascio di citocromo c e di altre molecole mitocondriali nel citosol, causando l'attivazione delle caspasi effettrici e la successiva morte cellulare^{140,143}. La via estrinseca, invece, viene attivata da stimoli extracellulari percepiti da diversi recettori di morte appartenenti alla famiglia del TNF (Tumor Necrosis Factor), tra cui TNF-R1, Fas e TRAIL¹⁴⁰. Questa via porta all'attivazione della caspasi-8,

che può a sua volta attivare direttamente le caspasi 3 e 7, inducendo l'apoptosi¹⁴⁴. Tuttavia, entrambe le vie convergono sulle stesse caspasi effettrici che amplificano il segnale di morte¹⁴⁵.

Come mostrato in questo studio, l'infezione delle cellule A549 con entrambi i ceppi di Echovirus 11 induce apoptosi intrinseca. Tuttavia, a differenza del ceppo di riferimento, Leonard è in grado di attivare anche la via estrinseca dell'apoptosi per indurre la morte delle cellule ospiti, contribuendo così alla sua maggiore replicazione e al suo effetto citolitico. Infatti, il blocco del recettore FAS mediante un anticorpo monoclonale neutralizzante ha ridotto significativamente sia la replicazione di Leonard sia la sua capacità di indurre la morte cellulare. Sorprendentemente, la capacità acquisita da Leonard di attivare l'apoptosi estrinseca deriva dalla sua peculiare abilità di legarsi direttamente a FAS, come dimostrato tramite l'analisi di surface plasmon resonance (SPR). Tale interazione diretta è insolita tra i virus, che tipicamente attivano questa via in modo indiretto, inducendo la sovraespressione di recettori di morte o dei loro ligandi sulla superficie cellulare e aumentando così la sensibilità alla morte cellulare mediata da questi recettori¹⁴⁶. Questa caratteristica potrebbe essere in parte spiegata dall'elevata divergenza tra i ceppi Leonard e Gregory nella composizione primaria degli amminoacidi delle quattro proteine strutturali virali. L'interazione di Leonard con FAS e l'attivazione di entrambe le vie apoptotiche — estrinseca e intrinseca — rivelano una sofisticata strategia virale per modulare la morte cellulare e favorire la replicazione, il rilascio e la disseminazione del virus. Tuttavia, un'eccessiva apoptosi può causare gravi danni ai tessuti e sintomi clinici, suggerendo un legame tra l'attivazione simultanea delle due vie apoptotiche da parte di Leonard e la sua peculiare aggressività in vivo, soprattutto nei neonati, rispetto ai precedenti ceppi circolanti di Echovirus 11.

L'interazione Fas/Fas ligando è inoltre nota per mediare risposte infiammatorie indipendenti dall'apoptosi durante le infezioni virali^{147–149}. Inoltre, poiché l'attivazione del processo apoptotico richiede l'internalizzazione del recettore Fas in seguito al legame con il suo ligando¹⁵⁰, è probabile che l'interazione virale con Fas non solo inneschi l'apoptosi, ma favorisca anche l'ingresso del virus nella cellula, suggerendo così Fas come possibile nuovo recettore di ingresso per Echovirus 11.

Dato il ruolo multifattoriale di Fas, la definizione delle interazioni tra le proteine virali di Echovirus 11 e Fas, insieme a ulteriori studi preclinici e clinici, rappresentano i prossimi passaggi fondamentali per sviluppare strategie preventive e/o terapeutiche volte a mitigare la patologia associata all'infezione virale.

Bibliografia

1. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. 2011;411(2):288. doi:10.1016/J.VIROL.2010.12.014
2. Sinclair W, Omar M. Enterovirus. *StatPearls*. Published online July 31, 2023. Accessed October 12, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562330/>
3. Factsheet for health professionals on human non-polio enterovirus infections. Accessed October 12, 2025. <https://www.ecdc.europa.eu/en/enteroviruses/facts>
4. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, Van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):368-381. doi:10.1038/S41579-018-0005-4;SUBJMETA
5. Pons-Salort M, Parker EPK, Grassly NC. The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(5):479. doi:10.1097/QCO.0000000000000187
6. Chio CC, Chien JC, Chan HW, Huang HI. Overview of the Trending Enteric Viruses and Their Pathogenesis in Intestinal Epithelial Cell Infection. *Biomed* 2024, Vol 12, Page 2773. 2024;12(12):2773. doi:10.3390/BIOMEDICINES12122773
7. Pons-Salort M, Oberste MS, Pallansch MA, et al. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(12):3078-3083. doi:10.1073/PNAS.1721159115
8. Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: An epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(4):308-318. doi:10.1016/S1473-3099(13)70342-6
9. Onozuka D, Hashizume M. The influence of temperature and humidity on the incidence of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Sci Total Environ*. 2011;410-411:119-125. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2011.09.055
10. Baker RE, Yang W, Vecchi GA, Takahashi S. Increasing intensity of enterovirus outbreaks projected with climate change. *Nat Commun*. 2024;15(1):1-9. doi:10.1038/S41467-024-50936-3;SUBJMETA
11. Li D. Etiology of HFMD. *Mol Biol Hand-Foot-Mouth Dis*. Published online March 6, 2024:29-60. doi:10.1007/978-981-99-9660-5_2/FIGURES/1
12. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 1981;291(5816):547-553. doi:10.1038/291547A0
13. Laine P, Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Phylogenetic analysis of human rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human enteroviruses. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 3):697-706. doi:10.1099/VIR.0.80445-0
14. Stanway G, Hughes PJ, Mountford RC, Minor PD, Almond JW. The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(20):7859-7875. doi:10.1093/NAR/12.20.7859

15. Virus Taxonomy | ScienceDirect. Accessed November 14, 2025.
<https://www.sciencedirect.com/book/9780123846846/virus-taxonomy>
16. Adams MJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol*. 2012;157(7):1411-1422. doi:10.1007/S00705-012-1299-6
17. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Arch Virol*. 2014;159(10):2831-2841. doi:10.1007/S00705-014-2114-3
18. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol*. 2016;161(10):2921-2949. doi:10.1007/S00705-016-2977-6
19. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1288-1293. doi:10.1128/JCM.37.5.1288-1293.1999
20. Allan Nix W, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2698-2704. doi:10.1128/JCM.00542-06
21. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* (80-). 1985;229(4720):1358-1365. doi:10.1126/science.2994218
22. Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*. 1985;317(6033):145-153. doi:10.1038/317145a0
23. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*. 2002;10(7):324-331. doi:10.1016/s0966-842x(02)02383-1
24. Liu Y, Hill MG, Klose T, et al. Atomic structure of a rhinovirus C, a virus species linked to severe childhood asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(32):8997-9002. doi:10.1073/PNAS.1606595113
25. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 1989;56(5):855-865. doi:10.1016/0092-8674(89)90690-9
26. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*. 2009;15(7):798-801. doi:10.1038/NM.1992
27. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol*. 2012;86(10):5686-5696. doi:10.1128/JVI.00020-12
28. Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med*. 2009;15(7):794-797. doi:10.1038/NM.1961
29. Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol*. 2012;3(MAR). doi:10.3389/FMICB.2012.00105
30. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Receptors for enterovirus 71. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(7). doi:10.1038/EMI.2014.49

31. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. 2016;8(1). doi:10.3390/V8010016
32. Baggen J, Hurdiss DL, Zocher G, et al. Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(2):397-402. doi:10.1073/PNAS.1713284115
33. Baggen J, Thibaut HJ, Staring J, et al. Enterovirus D68 receptor requirements unveiled by haploid genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(5):1399-1404. doi:10.1073/PNAS.1524498113
34. Wei W, Guo H, Chang J, et al. ICAM-5/Telencephalin Is a Functional Entry Receptor for Enterovirus D68. *Cell Host Microbe*. 2016;20(5):631-641. doi:10.1016/j.chom.2016.09.013
35. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, et al. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(5):1839-1842. doi:10.1073/PNAS.91.5.1839
36. Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989;56(5):839-847. doi:10.1016/0092-8674(89)90688-0
37. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(17):5485-5490. doi:10.1073/PNAS.1421178112
38. Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St. John NF, Lin H, Finberg RW. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(13):6245-6248. doi:10.1073/PNAS.91.13.6245
39. Martino TA, Petric M, Weingartl H, et al. The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. *Virology*. 2000;271(1):99-108. doi:10.1006/viro.2000.0324
40. Williams CH, Kajander T, Hyypiä T, Jackson T, Sheppard D, Stanway G. Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. *J Virol*. 2004;78(13):6967-6973. doi:10.1128/JVI.78.13.6967-6973.2004
41. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BMC, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*. 1992;255(5052):1718-1720. doi:10.1126/SCIENCE.1553561
42. Morosky S, Wells AI, Lemon K, et al. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(9):3758-3763. doi:10.1073/PNAS.1817341116;WGROU:STRING:PUBLICATION
43. Liu Y, Sheng J, Baggen J, et al. Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/NCOMMS9865
44. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 2006;124(1):119-131. doi:10.1016/j.cell.2005.10.035
45. Wang X, Peng W, Ren J, et al. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus

- uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(4):424-429. doi:10.1038/nsmb.2255
46. Belnap DM, Filman DJ, Trus BL, et al. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol.* 2000;74(3):1342-1354. doi:10.1128/jvi.74.3.1342-1354.2000
 47. E P, E K, D B, R F. Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. *J Virol.* 1994;68(6):3713-3723. doi:10.1128/JVI.68.6.3713-3723.1994
 48. Hussain KM, Leong KLJ, Ng MML, Chu JJH. The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *J Biol Chem.* 2011;286(1):309-321. doi:10.1074/jbc.M110.168468
 49. Lozano G, Martínez-Salas E. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol.* 2015;12:113-120. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.008
 50. Lee KM, Chen CJ, Shih SR. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends Microbiol.* 2017;25(7):546-561. doi:10.1016/j.tim.2017.01.010
 51. Paul A V., Wimmer E. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* 2015;206:12-26. doi:10.1016/j.virusres.2014.12.028
 52. Suh DA, Giddings TH, Kirkegaard K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol.* 2000;74(19):8953-8965. doi:10.1128/JVI.74.19.8953-8965.2000
 53. van der Schaar HM, Dorobantu CM, Albulescu L, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol.* 2016;24(7):535-546. doi:10.1016/j.tim.2016.02.017
 54. Strating JR, van Kuppeveld FJ. Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;47:24-33. doi:10.1016/j.ceb.2017.02.005
 55. Ilnytska O, Santiana M, Hsu NY, et al. Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. *Cell Host Microbe.* 2013;14(3):281-293. doi:10.1016/j.chom.2013.08.002
 56. Ford Siltz LA, Viktorova EG, Zhang B, et al. New small-molecule inhibitors effectively blocking picornavirus replication. *J Virol.* 2014;88(19):11091-11107. doi:10.1128/JVI.01877-14
 57. Arita M. Mechanism of Poliovirus Resistance to Host Phosphatidylinositol-4 Kinase III β Inhibitor. *ACS Infect Dis.* 2016;2(2):140-148. doi:10.1021/ACSINFECDIS.5B00122
 58. Melia CE, van der Schaar HM, Lyoo H, et al. Escaping Host Factor PI4KB Inhibition: Enterovirus Genomic RNA Replication in the Absence of Replication Organelles. *Cell Rep.* 2017;21(3):587-599. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.068
 59. Li X, Wang M, Cheng A, et al. Enterovirus Replication Organelles and Inhibitors of Their Formation. *Front Microbiol.* 2020;11:562925. doi:10.3389/FMICB.2020.01817/FULL
 60. Arita M. Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein

- accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure. *Microbiol Immunol*. 2014;58(4):239-256. doi:10.1111/1348-0421.12144
61. Agirre A, Barco A, Carrasco L, Nieva JL. Viroporin-mediated Membrane Permeabilization. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40434-40441. doi:10.1074/jbc.M205393200
 62. Van Kuppeveld FJM, De Jong AS, Melchers WJG, Willems PHGM. Enterovirus protein 2B po(u)res out the calcium: A viral strategy to survive? *Trends Microbiol*. 2005;13(2):41-44. doi:10.1016/j.tim.2004.12.005
 63. Tang WF, Yang SY, Wu BW, et al. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5888-5898. doi:10.1074/jbc.M611145200
 64. Arita M, Wakita T, Shimizu H. Valosin-containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and is involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. *J Virol*. 2012;86(10):5541-5553. doi:10.1128/JVI.00114-12
 65. Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP, et al. Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLOS Biol*. 2005;3(5):e156. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0030156
 66. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul A V., Wimmer E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):418-437. doi:10.1128/MMBR.00012-14
 67. Geller R, Vignuzzi M, Andino R, Frydman J. Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev*. 2007;21(2):195-205. doi:10.1101/GAD.1505307
 68. Paul A V., Schultz A, Pincus SE, Oroszlan S, Wimmer E. Capsid protein VP4 of poliovirus is N-myristoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(22):7827-7831. doi:10.1073/PNAS.84.22.7827
 69. Chow M, Newman JFE, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ, Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*. 1987;327(6122):482-486. doi:10.1038/327482A0
 70. Thibaut HJ, van der Linden L, Jiang P, et al. Binding of glutathione to enterovirus capsids is essential for virion morphogenesis. *PLoS Pathog*. 2014;10(4). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1004039
 71. Ma HC, Liu Y, Wang C, et al. An interaction between glutathione and the capsid is required for the morphogenesis of C-cluster enteroviruses. *PLoS Pathog*. 2014;10(4). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1004052
 72. Basavappa R, Filman DJ, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci*. 1994;3(10):1651-1669. doi:10.1002/PRO.5560031005
 73. Liu Y, Wang C, Mueller S, Paul A V., Wimmer E, Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):75-76. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1001066
 74. Shakeel S, Dykeman EC, White SJ, et al. Genomic RNA folding mediates

- assembly of human parechovirus. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/S41467-016-0011-Z
75. Logan G, Newman J, Wright CF, et al. Deep Sequencing of Foot-and-Mouth Disease Virus Reveals RNA Sequences Involved in Genome Packaging. *J Virol.* 2017;92(1):e01159-17. doi:10.1128/JVI.01159-17
 76. Lai JKF, Sam IC, Chan YF. The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses* 2016, Vol 8, Page 32. 2016;8(2):32. doi:10.3390/V8020032
 77. Robinson SM, Tsueng G, Sin J, et al. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* 2014;10(4). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1004045
 78. Bird SW, Maynard ND, Covert MW, Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(36):13081-13086. doi:10.1073/PNAS.1401437111
 79. Chen YH, Du W, Hagemeyer MC, et al. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell.* 2015;160(4):619-630. doi:10.1016/j.cell.2015.01.032
 80. Too IHK, Yeo H, Sessions OM, et al. Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/SREP36983
 81. McKnight KL, Xie L, González-López O, Rivera-Serrano EE, Chen X, Lemon SM. Protein composition of the hepatitis A virus quasi-envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(25):6587-6592. doi:10.1073/PNAS.1619519114
 82. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 2013;496(7445):367-371. doi:10.1038/NATURE12029
 83. Khetsuriani N, LaMonte A, Oberste MS, Pallansch M. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(10):889-893. doi:10.1097/01.inf.0000237798.07462.32
 84. Bubba L, Broberg EK, Jasir A, et al. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(3):350-361. doi:10.1016/S1473-3099(19)30566-3
 85. Wang J, Meng M, Xu H, et al. Analysis of enterovirus genotypes in the cerebrospinal fluid of children associated with aseptic meningitis in Liaocheng, China, from 2018 to 2019. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1). doi:10.1186/S12879-021-06112-9
 86. Huang S, Zhang Y, Zhang W, et al. Prevalence of Non-Polio Enteroviruses in the Sewage of Guangzhou City, China, from 2013 to 2021. *Microbiol Spectr.* 2023;11(3). doi:10.1128/SPECTRUM.03632-22
 87. Wiczorek M, Ciągła A, Witek A, Kuryk Ł, Żuk-Wasek A. Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. *Food Environ Virol.* 2015;7(3):224-231. doi:10.1007/S12560-015-9195-3
 88. Liu BM, Mulkey SB, Campos JM, DeBiasi RL. Laboratory diagnosis of CNS infections in children due to emerging and re-emerging neurotropic viruses. *Pediatr*

- Res. 2024;95(2):543-550. doi:10.1038/S41390-023-02930-6
89. Suresh S, Forgie S, Robinson J. Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol.* 2018;90(1):3-7. doi:10.1002/JMV.24933
 90. Su T, Zhou Y, Zhu Y, et al. Molecular characterization of a new human echovirus 11 isolate associated with severe hand, foot and mouth disease in Yunnan, China, in 2010. *Arch Virol* 2015 1609. 2015;160(9):2343-2347. doi:10.1007/S00705-015-2496-X
 91. Lukashev AN, Lashkevich VA, Koroleva GA, Karganova GG. Phylogenetic and serological characterization of echovirus 11 and echovirus 19 strains causing uveitis. *Arch Virol.* 2002;147(1):131-142. doi:10.1007/S705-002-8307-2/METRICS
 92. Szendrői A, El-Sageyer M, Takács M, Mezey I, Berencsi GY. Nucleotide sequences and mutations of the 5'-nontranslated region (5'NTR) of natural isolates of an epidemic echovirus 11' (prime). *Arch Virol.* 2000;145(12):2575-2600. doi:10.1007/S007050070009/METRICS
 93. Chong W, Yang F, Wang X, et al. Echovirus 11 infection induces pyroptotic cell death by facilitating NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathog.* 2022;18(8). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1010787
 94. Zhang M, Wang H, Tang J, et al. Clinical characteristics of severe neonatal enterovirus infection: a systematic review. *BMC Pediatr.* 2021;21(1). doi:10.1186/S12887-021-02599-Y
 95. Tassin M, Martinovic J, Mirand A, et al. A case of congenital Echovirus 11 infection acquired early in pregnancy. *J Clin Virol.* 2014;59(1):71-73. doi:10.1016/j.jcv.2013.11.003
 96. Tang JW, Bendig JWA, Ossuetta I. Vertical transmission of human echovirus 11 at the time of Bornholm disease in late pregnancy. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(1):88-89. doi:10.1097/01.INF.0000148931.05186.99
 97. Hu YL, Lin SY, Lee CN, et al. Serostatus of echovirus 11, coxsackievirus B3 and enterovirus D68 in cord blood: The implication of severe newborn enterovirus infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2023;56(4):766-771. doi:10.1016/J.JMII.2023.05.004
 98. Laassri M, Zagorodnyaya T, Hassin-Baer S, et al. Evolution of echovirus 11 in a chronically infected immunodeficient patient. *PLoS Pathog.* 2018;14(3). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1006943
 99. Ho SY, Chiu CH, Huang YC, et al. Investigation and successful control of an echovirus 11 outbreak in neonatal intensive care units. *Pediatr Neonatol.* 2020;61(2):180-187. doi:10.1016/J.PEDNEO.2019.09.012
 100. Rueca M, Lanini S, Giombini E, et al. Detection of recombinant breakpoint in the genome of human enterovirus E11 strain associated with a fatal nosocomial outbreak. *Virol J* 2022 191. 2022;19(1):97-. doi:10.1186/S12985-022-01821-2
 101. Somekh E, Shohat T, Handsheer R, Serour F. An outbreak of echovirus 11 in a children's home. *Epidemiol Infect.* 2001;126(3):441-444. doi:10.1017/S0950268801005404
 102. Yang J, Cui N, Wang H, et al. Evaluating the prevalence and molecular epidemiology of echovirus 11 isolated from sewage in Shandong Province, China

- in 2010. *Virus Genes*. 2012;44(3):388-394. doi:10.1007/S11262-012-0719-8
103. Bubba L, Benschop KSM, Blomqvist S, et al. Wastewater Surveillance in Europe for Non-Polio Enteroviruses and Beyond. *Microorganisms*. 2023;11(10). doi:10.3390/MICROORGANISMS11102496
 104. Giammanco GM, Filizzolo C, Pizzo M, et al. Detection of Echovirus 11 lineage 1 in wastewater samples in Sicily. *Sci Total Environ*. 2024;918. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.170519
 105. Righi F, Mangeri L, Galuppini E, Tilola M, Bertasi B, Losio MN. He who seeks finds: surveillance of Enteroviruses and Human Bocaviruses in Northern Italy wastewaters. *Eur J Public Health*. 2023;33(Suppl 2):ckad160.1684. doi:10.1093/EURPUB/CKAD160.1684
 106. Gad B, Kłosiewicz P, Oleksiak K, et al. Intensified Circulation of Echovirus 11 after the COVID-19 Pandemic in Poland: Detection of a Highly Pathogenic Virus Variant. *Viruses*. 2024;16(7). doi:10.3390/v16071011
 107. Enterovirus-Echovirus 11 Infection - the European Region. Accessed November 15, 2025. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON474>
 108. Epidemiological update: Echovirus 11 infections in neonates. Accessed November 15, 2025. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-echovirus-11-infections-neonates>
 109. Enterovirus Infection – France. Accessed November 15, 2025. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON469>
 110. Echovirus 11 in newly born twins: case in Italy shows close genetic relation to strains found in France among neonates | EurekAlert! Accessed November 15, 2025. <https://www.eurekalert.org/news-releases/992726>
 111. Grapin M, Mirand A, Pinquier D, et al. Severe and fatal neonatal infections linked to a new variant of echovirus 11, France, July 2022 to April 2023. *Euro Surveill*. 2023;28(22). doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.22.2300253
 112. Piralla A, Borghesi A, Di Comite A, et al. Fulminant echovirus 11 hepatitis in male non-identical twins in northern Italy, April 2023. *Eurosurveillance*. 2023;28(24). doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.24.2300289
 113. Bianconi I, Battisti L, Staffler A, et al. Disseminated Echovirus 11 infection in a newborn in the Province of Bolzano, Italy. *Infection*. 2024;52(6):2501-2506. doi:10.1007/S15010-024-02315-9
 114. Perniciaro S, Proietti C, Bossi A, et al. Two dramatically different clinical scenarios of neonatal Echovirus-11 infection in late preterm male twins: a case report and review of the literature. *Ital J Pediatr*. 2025;51(1). doi:10.1186/s13052-025-01880-5
 115. Li J, Yan D, Chen L, et al. Multiple genotypes of Echovirus 11 circulated in mainland China between 1994 and 2017. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/S41598-019-46870-W
 116. Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, Flemister MR, Pallansch MA. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus Res*. 2003;91(2):241-248. doi:10.1016/S0168-1702(02)00291-5

117. Ying L, Qiang S, Jinbo X, et al. Genetic variation and evolutionary characteristics of Echovirus 11: new variant within genotype D5 associated with neonatal death found in China. *Emerg Microbes Infect.* 2024;13(1). doi:10.1080/22221751.2024.2361814
118. Caccuri F, Ronca R, Laimbacher AS, et al. U94 of human herpesvirus 6 down-modulates Src, promotes a partial mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits tumor cell growth, invasion and metastasis. *Oncotarget.* 2017;8(27):44533-44549. doi:10.18632/ONCOTARGET.17817
119. WHO. *Enterovirus Surveillance Guidelines – Guidelines for Enterovirus Surveillance in Support of the Polio Eradication.*; 2015.
120. Messali S, Rondina A, Giovanetti M, et al. Traceability of SARS-CoV-2 transmission through quasispecies analysis. *J Med Virol.* 2023;95(6). doi:10.1002/JMV.28848
121. Rozewicki J, Li S, Amada KM, Standley DM, Katoh K. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W5-W10. doi:10.1093/NAR/GKZ342
122. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 2020;37(5):1530-1534. doi:10.1093/MOLBEV/MSAA015
123. Rambaut A, Lam TT, Carvalho LM, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016;2(1):vew007. doi:10.1093/VE/VEW007
124. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1). doi:10.1093/VE/VEY016
125. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TTY. ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol.* 2017;8(1):28-36. doi:10.1111/2041-210X.12628
126. De Francesco MA, Pollara C, Gargiulo F, Giacomelli M, Caruso A. Circulation of Respiratory Viruses in Hospitalized Adults before and during the COVID-19 Pandemic in Brescia, Italy: A Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(18). doi:10.3390/IJERPH18189525
127. Sclavi L, Bertelli M, Messali S, Caruso A, Caccuri F. Epidemiology and molecular characterization of respiratory viruses at the end of COVID-19 pandemic in Lombardy, Northern Italy. *New Microbiol.* 2024;47(1):80-87.
128. Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. *J Virol.* 2007;81(11):5429-5436. doi:10.1128/JVI.01680-06
129. Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, Yan JJ, Liu CC, Su IJ. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):10-15. doi:10.1128/JCM.40.1.10-15.2002
130. Saijets S, Ylipaasto P, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection and activation of human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol.* 2003;70(3):430-

439. doi:10.1002/JMV.10413
131. Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. *PLOS Pathog.* 2008;4(5):e1000018. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000018
132. Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5(1):105-111. doi:10.1016/S0959-437X(95)90061-6
133. Ammar A, Trabelsi K, Brach M, et al. Effects of home confinement on mental health and lifestyle behaviours during the COVID-19 outbreak: insights from the ECLB-COVID19 multicentre study. *Biol Sport.* 2021;38(1):9-21. doi:10.5114/BIOLOSPORT.2020.96857
134. Di Mattia G, Nenna R, Mancino E, et al. During the COVID-19 pandemic where has respiratory syncytial virus gone? *Pediatr Pulmonol.* 2021;56(10):3106-3109. doi:10.1002/PPUL.25582
135. Shi HJ, Kim NY, Eom SA, et al. Effects of Non-Pharmacological Interventions on Respiratory Viruses Other Than SARS-CoV-2: Analysis of Laboratory Surveillance and Literature Review From 2018 to 2021. *J Korean Med Sci.* 2022;37(21). doi:10.3346/JKMS.2022.37.E172
136. Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus. *Clin Lab Med.* 2010;30(1):131-148. doi:10.1016/j.cll.2009.10.002
137. Vittucci AC, Piccioni L, Coltella L, et al. The Disappearance of Respiratory Viruses in Children during the COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(18). doi:10.3390/IJERPH18189550
138. Novazzi F, Piralla A, Perniciaro S, et al. A new case of Echovirus 11 neonatal fulminant hepatitis involving male twins in a Northern Italy Tertiary University Hospital: Insight on a possible immunological clue. *IJID Reg.* 2024;12. doi:10.1016/j.ijregi.2024.100411
139. Piralla A, Giardina F, Ferrari G, et al. Molecular characterization of emerging Echovirus 11 (E11) shed light on the recombinant origin of a variant associated with severe hepatitis in neonates. *J Med Virol.* 2024;96(5). doi:10.1002/JMV.29658
140. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-120. doi:10.1038/CDD.2011.96
141. Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(8):539-548. doi:10.1038/NRC.2016.58
142. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
143. Di Pietro R, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol.* 2004;201(3):331-340. doi:10.1002/JCP.20099
144. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632. doi:10.1038/NRM2952
145. Shepard BD, Badley AD. The Biology of TRAIL and the Role of TRAIL-Based Therapeutics in Infectious Diseases. *Antiinfect Agents Med Chem.* 2009;8(2):87-101.

doi:10.2174/187152109787846060

146. Wang X, Tan J, Zoueva O, Zhao J, Ye Z, Hewlett I. Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes Infect.* 2014;16(3):178-186. doi:10.1016/j.micinf.2013.11.003
147. Krzyzowska M, A Shestakov A, K Eriksson K, F Chiodi F. Role of Fas/FasL in regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. *Cell Death Dis.* 2011;2(3). doi:10.1038/CDDIS.2011.14
148. Krzyzowska M, Baska P, Orlowski P, et al. HSV-2 Regulates Monocyte Inflammatory Response via the Fas/FasL Pathway. *PLoS One.* 2013;8(7):e70308. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0070308
149. Krzyzowska M, Baska P, Grochowska A, Orlowski P, Nowak Z, Winnicka A. Fas/FasL pathway participates in resolution of mucosal inflammatory response early during HSV-2 infection. *Immunobiology.* 2014;219(1):64-77. doi:10.1016/j.imbio.2013.08.002
150. Lee KH, Feig C, Tchikov V, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25(5):1009-1023. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7601016