Sequenziamento completo del gene *gag* dei Lentivirus dei Piccoli Ruminanti (SRLV)

Paola Gobbi[1], Sara Mrabet[1], Luca Tassoni[1], Gesine Lühken[2], Roberta Biccheri[1], Silvia Pirani[1], Claudia Torresi[1], Francesco Feliziani[1], Monica Giammarioli[1], Maria Serena Beato[1]

1 National Reference Laboratory for Ruminant Retroviruses (CEREL), Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", via G. Salvemini 1, Perugia, Italy;
2 Department of Animal Breeding and Genetics, Justus Liebig University, Gießen, Germany

INTRODUZIONE

I lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) appartengono alla famiglia *Retroviridae* e colpiscono pecore e capre in tutto il mondo. Il loro genoma è composto da geni strutturali (*gag*, *pol* ed *env*) e regolatori (vif, vpr-like e rev) (Figura 1). La diagnosi molecolare e la caratterizzazione genetica degli SRLV vengono comunemente eseguite mediante PCR (spesso nested-PCR) mirata alla regione conservata a cavallo tra i geni *gag* e *pol* (*gag-pol*), seguita dal sequenziamento Sanger. Attualmente, in base al sequenziamento di questa regione *gag-pol* e di *pol*, gli SRLV sono classificati in cinque genotipi (A-E) e diversi sub-genotipi [1].

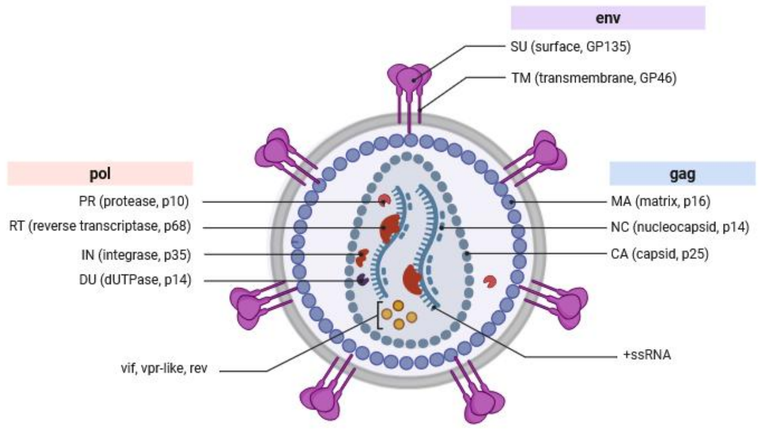

Figura 1. Rappresentazione della particella virale SRLV e delle proteine associate alle regioni genomiche (BioRender.com).

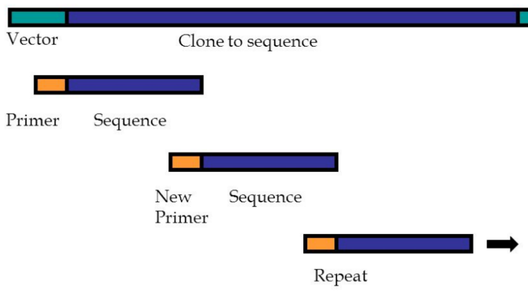

Figura 2. Tecnica primer walking.

Scopo del lavoro: Sviluppare una tecnica di *primer walking* (Figura 2) per il sequenziamento dell'intero gene *gag* in campioni positivi agli SRLV presso il Centro di Referenza Nazionale per i Retrovirus dei Ruminanti (CEREL). L'obiettivo è generare dati basati su sequenze geniche complete per approfondire la caratterizzazione genetica e superare i limiti dei frammenti parziali tradizionalmente impiegati nella classificazione.

MATERIALI E METODI

Design dei primer e validazione:

Selezione dei primer: Scelti da bibliografia o progettati *ex novo* (Tabella 1) tramite l'allineamento di 945 sequenze del gene *gag* di SRLV (GenBank), ottenendo tre frammenti sovrapposti coprenti l'intero gene.

Pannello di validazione: Testati 26 campioni di genotipo A precedentemente sequenziati nella regione *gag-pol* secondo il protocollo di Grego et al. [3] e raccolti dal CEREL tramite sorveglianza passiva (2019–2026; Tabella 2).

Controllo positivo: Incluso il ceppo islandese 1514, Accession number M10608.

Tabella 2. Pannello di campioni sequenziati per la regione ***gag-pol*** del genotipo A, impiegati per validare la metodologia.

#	ID CAMPIONE	SUBGENOTIPO *gag-pol*	#	ID CAMPIONE	SUBGENOTIPO *gag-pol*
1	1	A11	14	18	A2/A3
2	2	A9	15	19	A11
3	3	A9	16	20	A24
4	5	A9	17	21	A24
5	6	A9	18	22	A24
6	8	A9	19	23	A24
7	9	A9	20	24	A24
8	10	A21	21	25	A3
9	12	A9	22	29	A9
10	13	A9	23	32	A9
11	14	A11	24	36	A24
12	15	A9	25	37	A21
13	16	A19	26	42	A8

Tabella 1. Set di primer utilizzati per il sequenziamento dell'intero gene *gag*

Frammento	Nome primer	Sequenza	Bibliografia
1	MVV F0	5'-AAGTAAGGTAAGAGAGACACCTACTGG-3'	[4]
	NestSRLV R3	5'-CCTTCTGTCAAGGTCTCCTTCCC-3'	[5]
2	MVV F2	5'-GACAGAAGGGAACTGTCTATGGGC-3'	[4]
	972deg rev	5'-TGCCTGATCCATRTTRGCTTG-3'	[6]
	MVVF2	5'-GACAGAAGGGAACTGTCTATGGGC-3'	[4]
	Gag2 rev	5'-TGTGCTCTATTCCCAGGCATCAT-3'	[7]
3	GagF2	5'-CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG-3'	[3]
	MVVR0	5'-GGTGGTGCTTCTGTTACAACATAGG-3'	[4]

Gli acidi nucleici sono stati estratti, retrotrascritti e amplificati tramite RT-PCR. In seguito al sequenziamento Sanger, sono state eseguite analisi filogenetiche utilizzando diversi software (MEGA X, Geneious e NGPhylogeny), confrontandone i risultati. L'allineamento ha incluso tutti i genomi completi di SRLV disponibili online a luglio 2025 (<100).

RISULTATI E DISCUSSIONE

- **Sviluppo del sequenziamento dell'intero gene *gag***, preservando i frammenti terminali e l'integrità dell'informazione genetica.
- **Sequenziati con successo 12 campioni di campo su 26**, ottenendo alberi filogenetici robusti (Figura 2).
- **Nuovi cluster genetici:** l'analisi filogenetica sulle sequenze intere di *gag* evidenzia cluster distinti rispetto all'attuale classificazione in sub-genotipi.
- **Discrepanza con il sistema *gag-pol*:** diversi SRLV si raggruppano indipendentemente dalla classificazione tradizionale, supportando l'ipotesi che l'attuale assetto genetico non rifletta pienamente la diversità reale.
- **Identificazione del ceppo A21:** i campioni 10 e 37 (Justus Liebig University, Giessen, Germania) sono risultati positivi per il ceppo A21, attualmente assente in Italia, mostrando un robusto raggruppamento comune.
- **Prospettive di ampliamento:** il sequenziamento di ulteriori campioni italiani ed europei fornirà le basi per una classificazione genetica aggiornata degli SRLV.
- **Vantaggi metodologici:** approccio *cost-effective* basato su primer standard (senza ricorrere a NGS) e privo di necessità di personale altamente specializzato.
- **Impatto diagnostico:** la disponibilità di sequenze geniche complete di SRLV apre la strada allo sviluppo di strumenti diagnostici di nuova generazione.

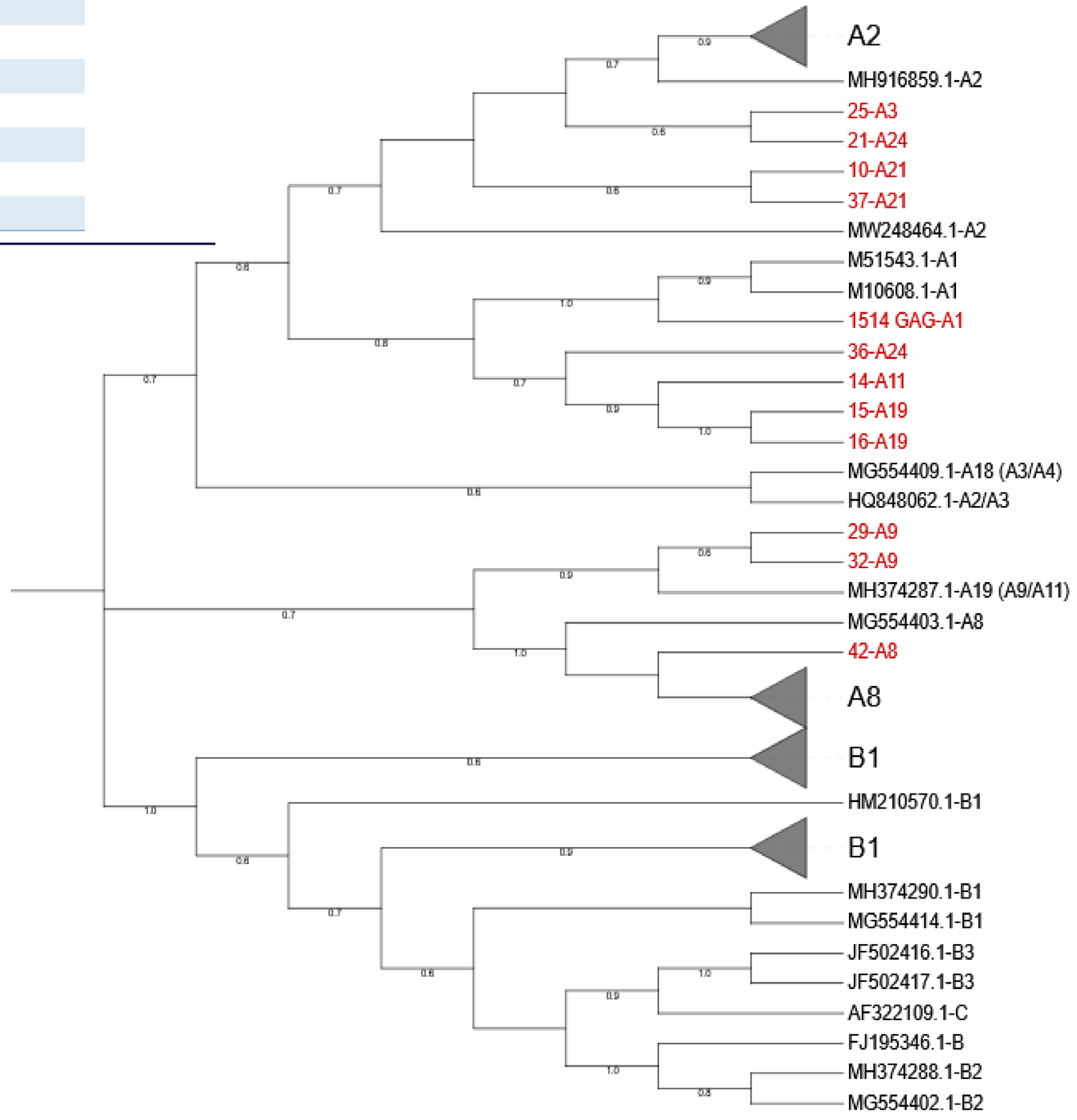

Figure 2. Albero filogenetico ottenuto con il software Geneious e l'algoritmo NJ (Neighbor-Joining).
Le sequenze di questo lavoro sono evidenziate in rosso; sono rappresentati i valori di bootstrap superiori a 0,5.

BIBLIOGRAFIA

1. Gobbi P et al. Molecular Characterization of Small Ruminant Lentiviruses in Sheep and Goats: A Systematic Review. Animals (Basel). 2024. doi: 10.3390/ani14233545.
2. Ramírez H et al. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis; 2013. doi: 10.3390/v5041175.
3. Grego E et al. Genetic Characterization of Small Ruminant Lentivirus in Italian Mixed Flocks: Evidence for a Novel Genotype Circulating in a Local Goat Population. Journal of General Virology 2007. doi:10.1099/vir.0.83292-0.
4. L'Homme Y et al. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Canadian Sheep and Goats. Virol J 2011. doi:10.1186/1743-422X-8-271.
5. Schaer J et al. Evaluation of Serological Methods and a New Real-Time Nested PCR for Small Ruminant Lentiviruses. Pathogens 2022. doi:10.3390/pathogens11020129.
6. Gobbi P. Molecular surveillance strategies for Small Ruminant Lentiviruses: a case study from Italy. PhD Thesis.
7. Laamanen I et al. Genetic Characterization of Maedi-Visna Virus (MVV) Detected in Finland. Vet Microbiol 2007. doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.002.

CONTATTI:
p.gobbi@izsum.it, ms.beato@izsum.it, s.mrabet@izsum.it, cerel@izsum.it