

# Considerazioni sulla diversità genetica dei *Lentivirus* dei piccoli ruminanti in Italia

Monica Giammarioli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia

Centro di Referenza Nazionale per lo studio dei *Retrovirus* dei ruminanti

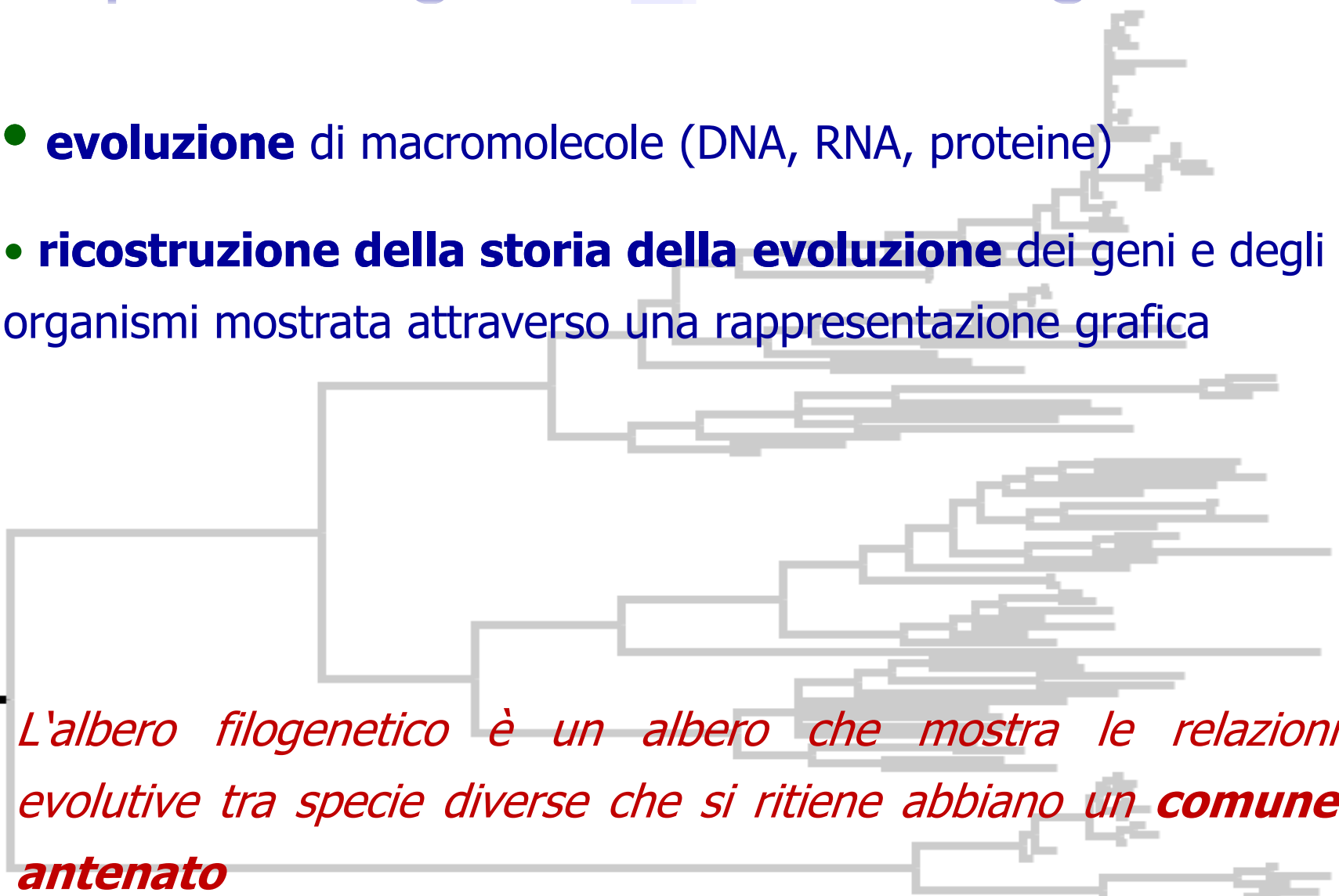
# Epidemiologia molecolare e filogenesi

## conoscere che cosa circola nel nostro territorio



# Epidemiologia molecolare e filogenesi

- **evoluzione** di macromolecole (DNA, RNA, proteine)
- **ricostruzione della storia della evoluzione** dei geni e degli organismi mostrata attraverso una rappresentazione grafica

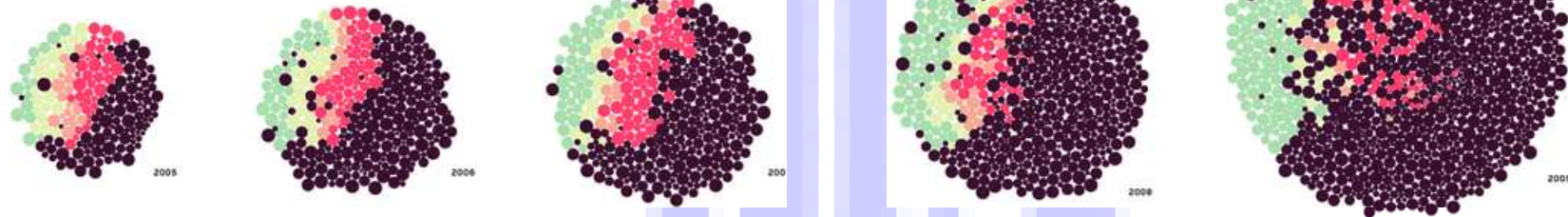


*L'albero filogenetico è un albero che mostra le relazioni evolutive tra specie diverse che si ritiene abbiano un **comune antenato***

# Variabilità genetica

## Virus evolution

Continui cambiamenti della popolazione virale in seguito alla pressione selettiva

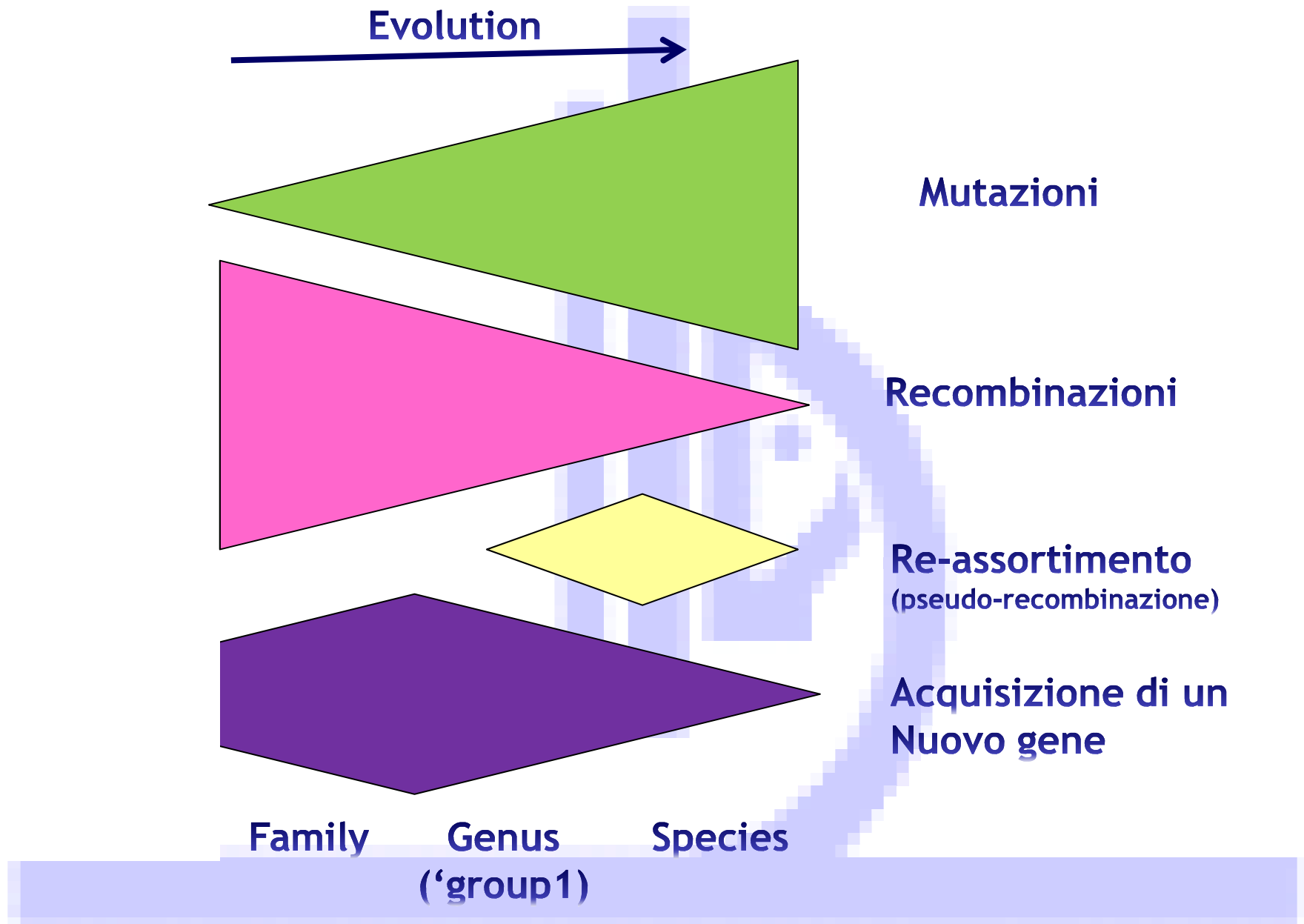


***"quasi-specie virale"***

## Pressione selettiva

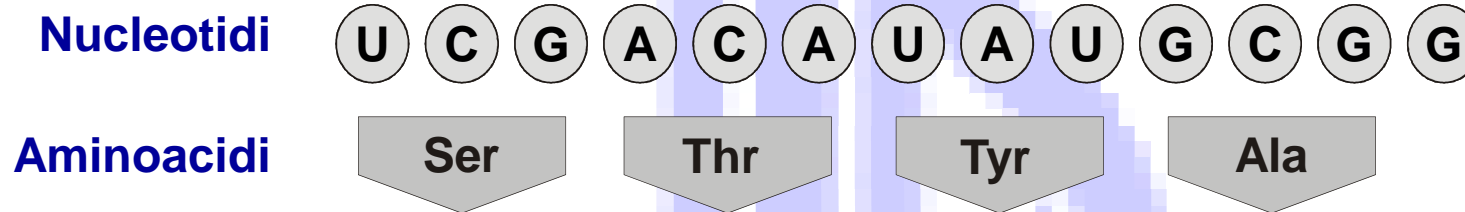
- Ambiente
- Caratteristiche del genoma virale e del ciclo cellulare
- Difese dell'ospite (risposta immune), ecc...

# Virus evolution

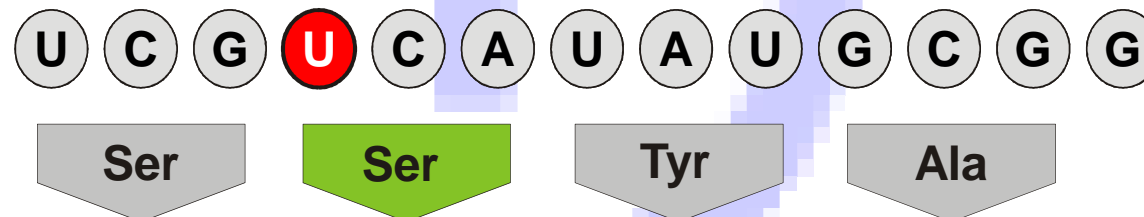


# Mutazioni

**Wild type:**

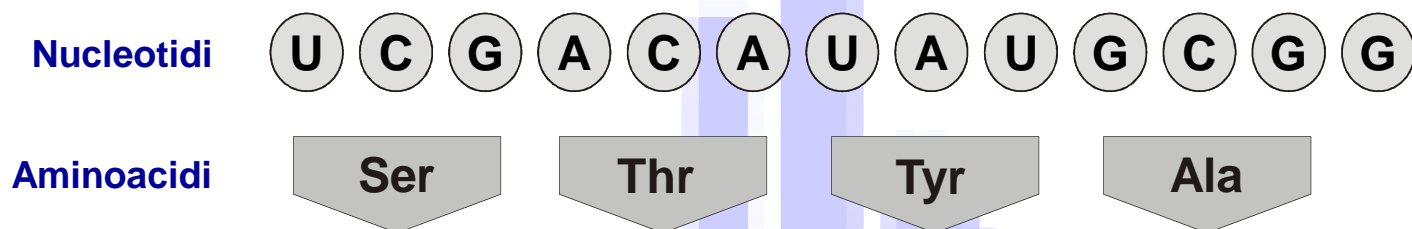


**Mutante (mutazione puntiforme):**

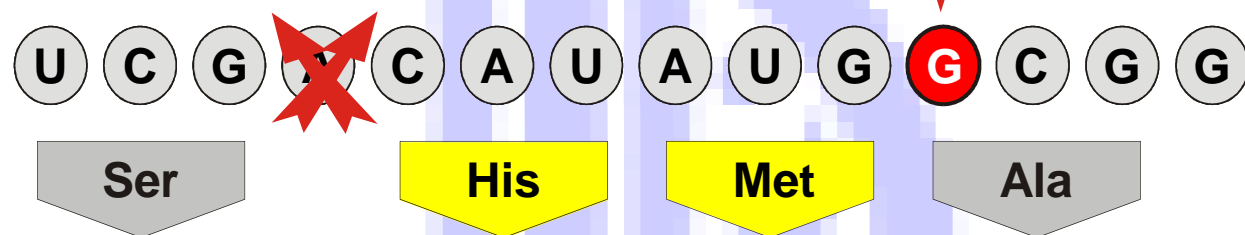


# Mutazioni

**Wild type:**



**Mutante (delezione, inserzione):**

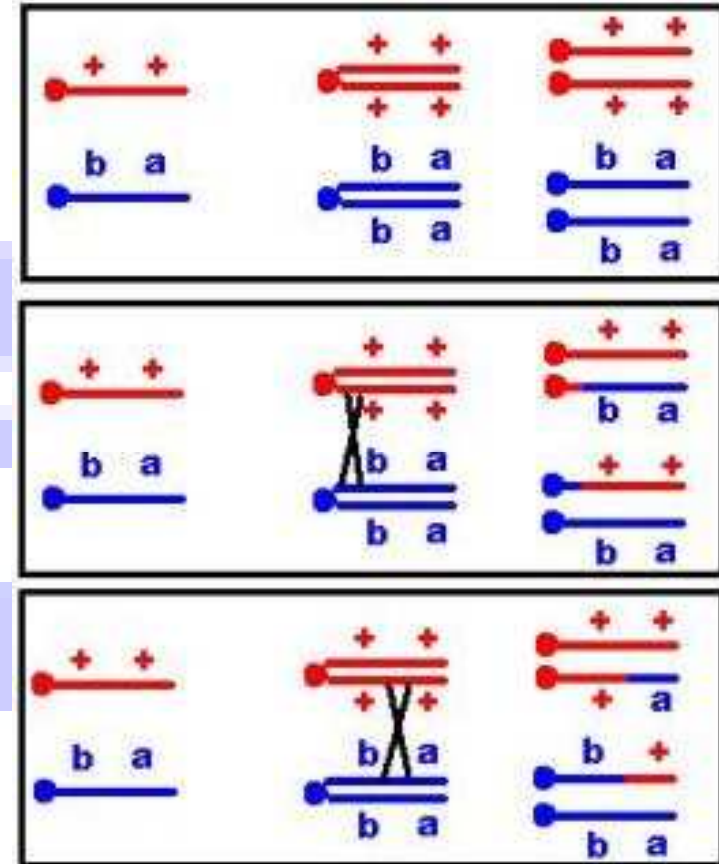
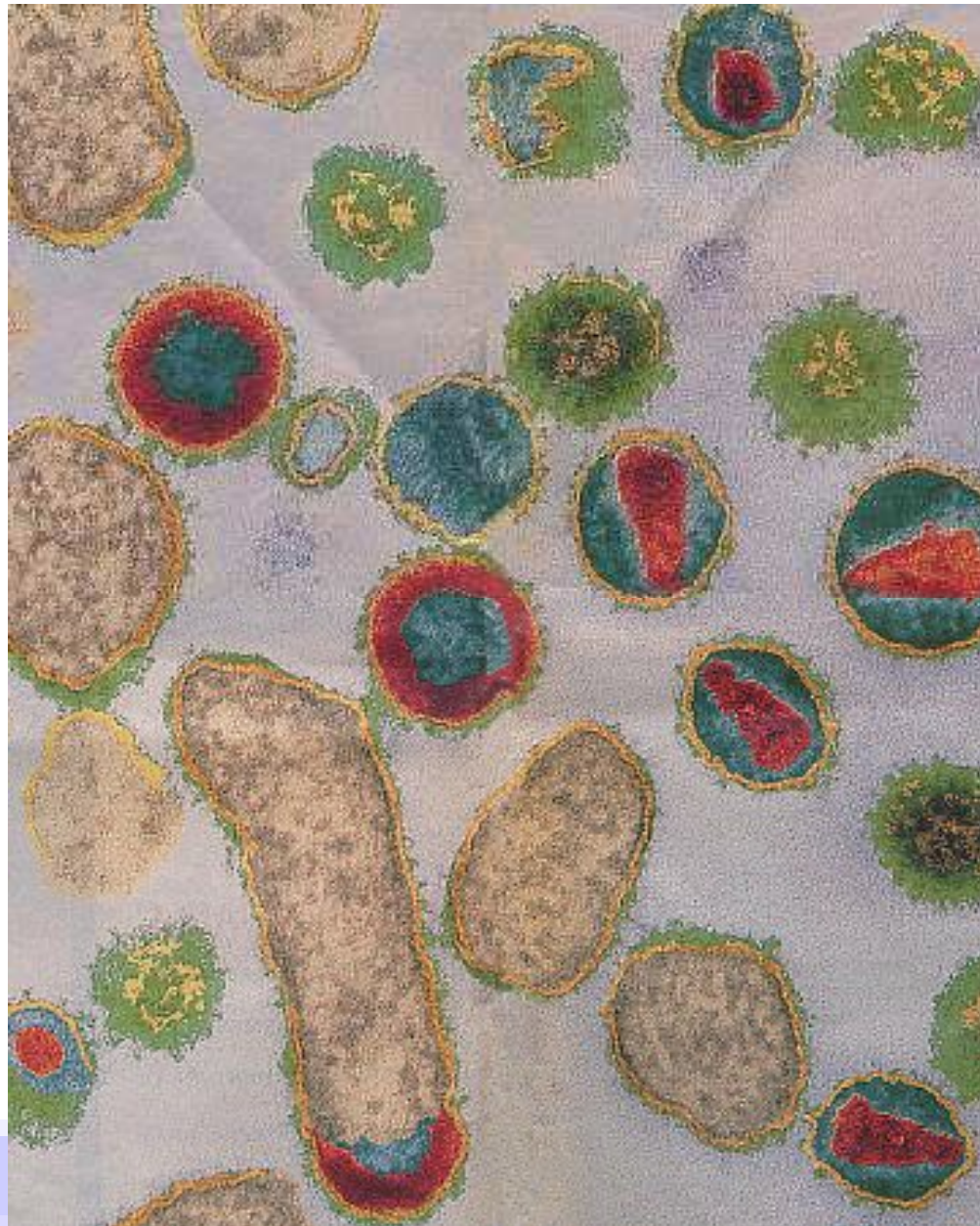


**Stop codon:**  
*Termina la sintesi proteica*





# Ricombinazione





# Variabilità genetica-conseguenze

## **Adattamento a nuovi ospiti**

*(HIV, SARS, influenza virus, ecc...)*

## **Emergenza nuovi virus**

*Influenza, SARS, HIV, ecc...*

## **Cambiamenti nella virulenza**

*BVDV-2, CSFV, ecc...*

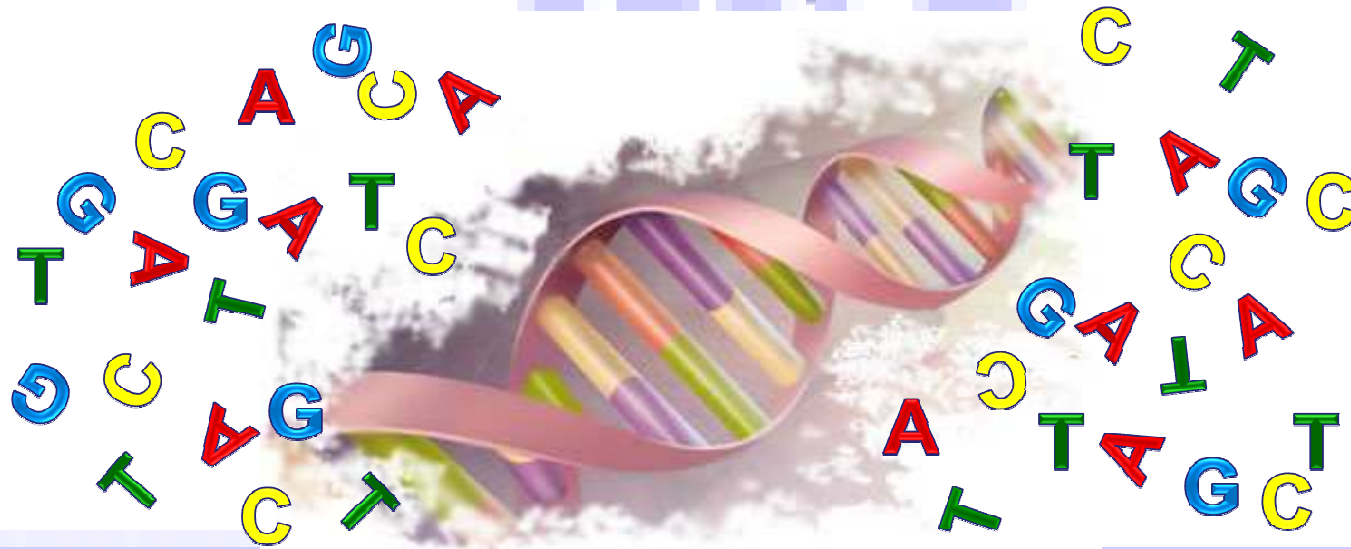
## **Evadere sistema immunitario - Escape mutant**

*HCV, lentivirus, ecc...*

# Genetic typing

Il *genetic typing* si basa sulla determinazione e sul confronto di sequenze nucleotidiche del genoma virale

## Analisi di sequenza



# Genetic typing

identificare genotipi "nuovi"

stabilire le relazioni tra isolati

identificare nuove "varianti virali"

trasmissione ovini-caprini e viceversa

trasmissione attraverso confini/frontiere

co-esistenza di infezioni multiple

presenza di eventi ricombinanti

# Filogeografia

H5N1



ASFV



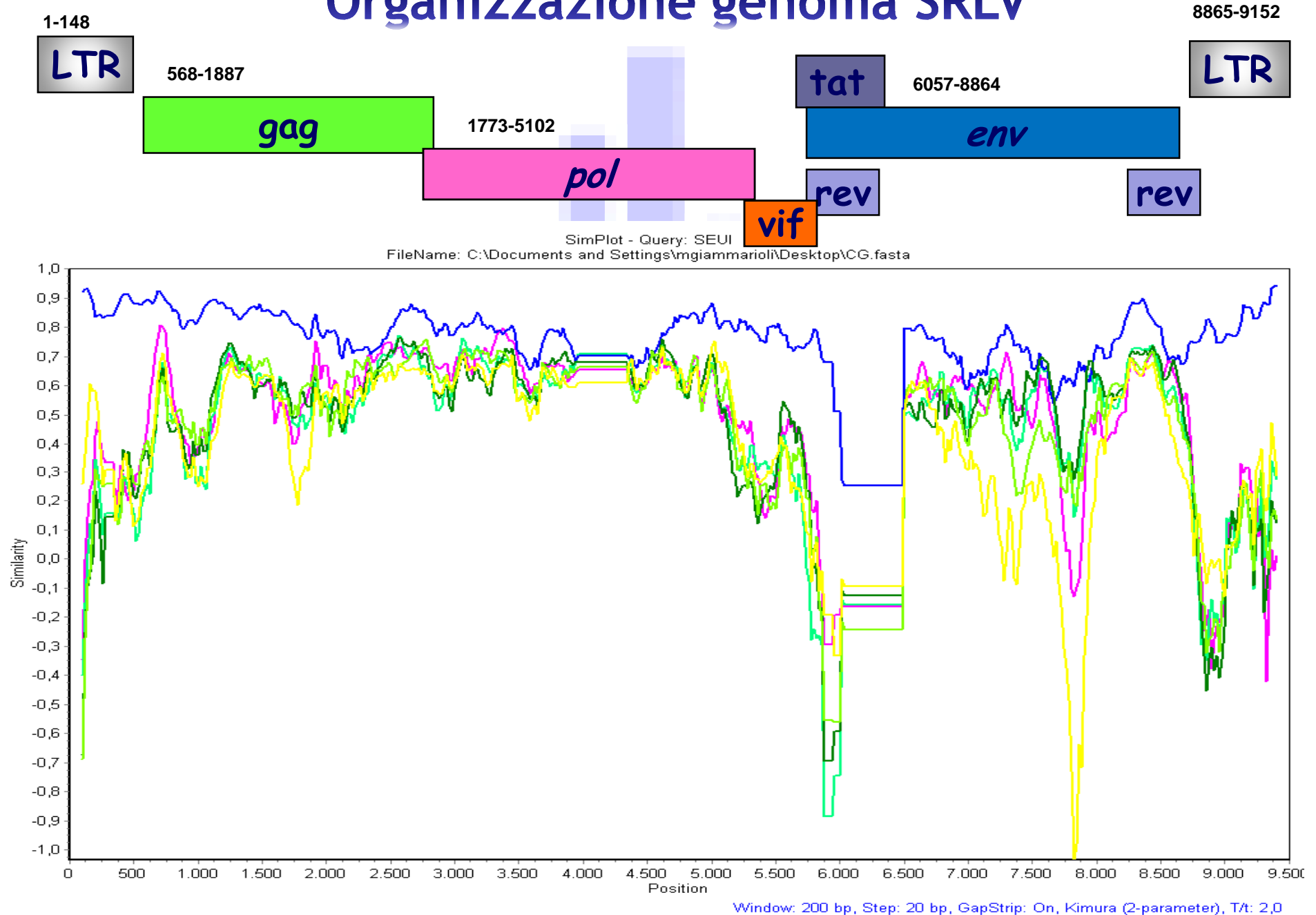
Aggiornamento sulle *Lentivirus* dei piccoli ruminanti, 6 ottobre 2011, Sez. Firenze

# Le basi di partenza

Collezione isolati virali di diversa provenienza

Avere quante più informazioni possibili sulla origine, età, il tipo di allevamento, localizzazione geografica, ecc..

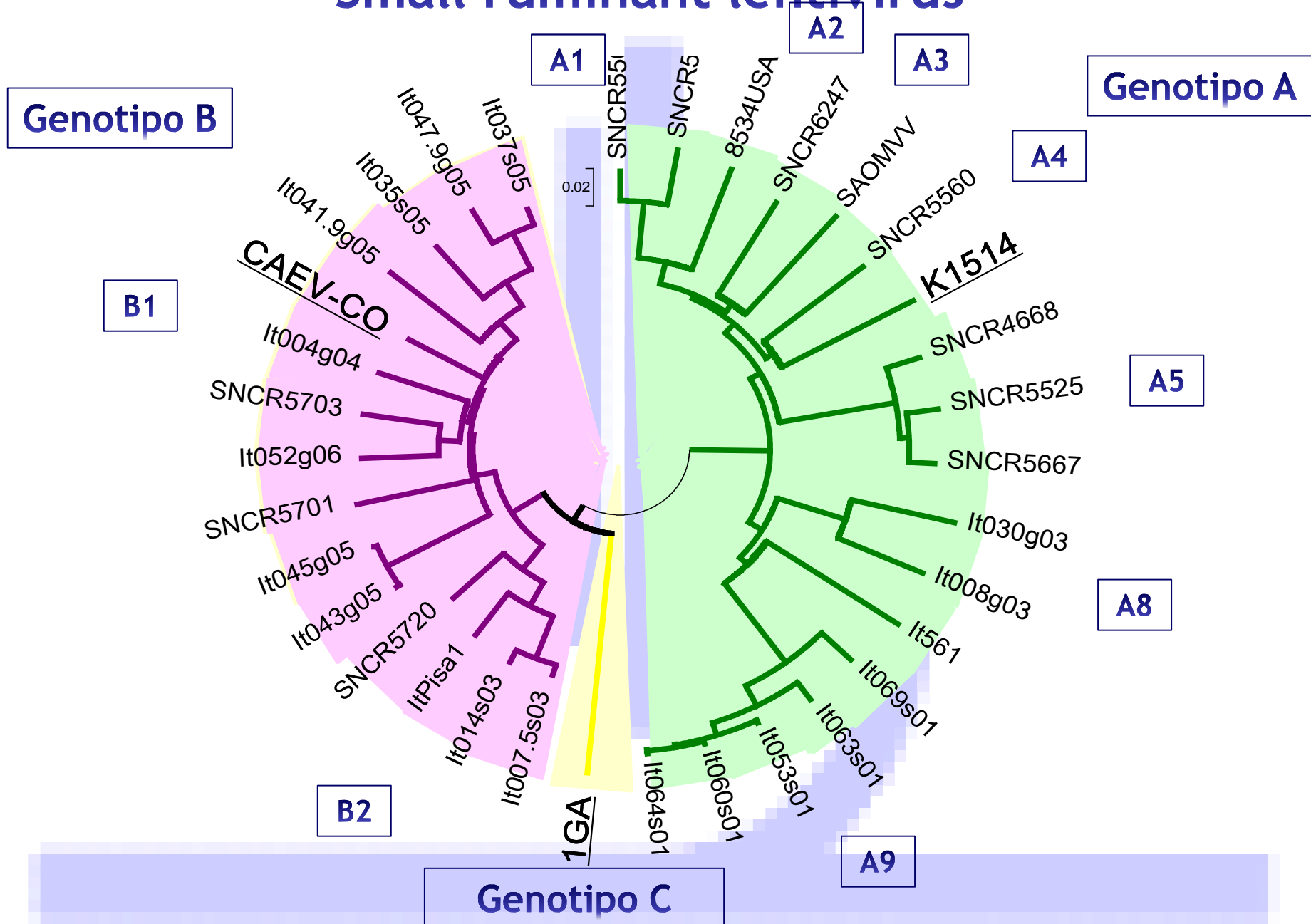
# Organizzazione genoma SRLV



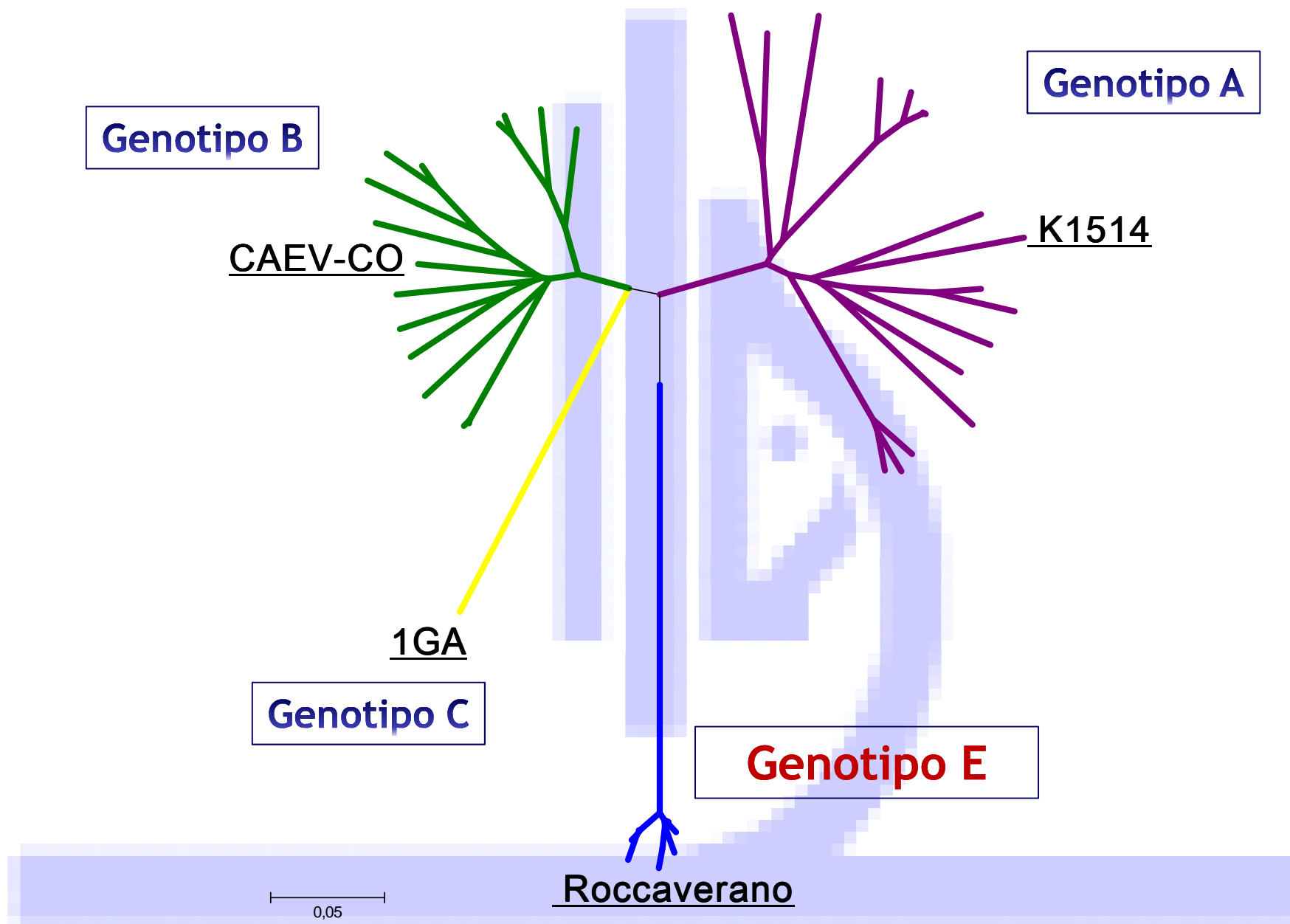
**Aggiornamento sulle Lentivirosi dei piccoli ruminanti, 6 ottobre 2011, Firenze**



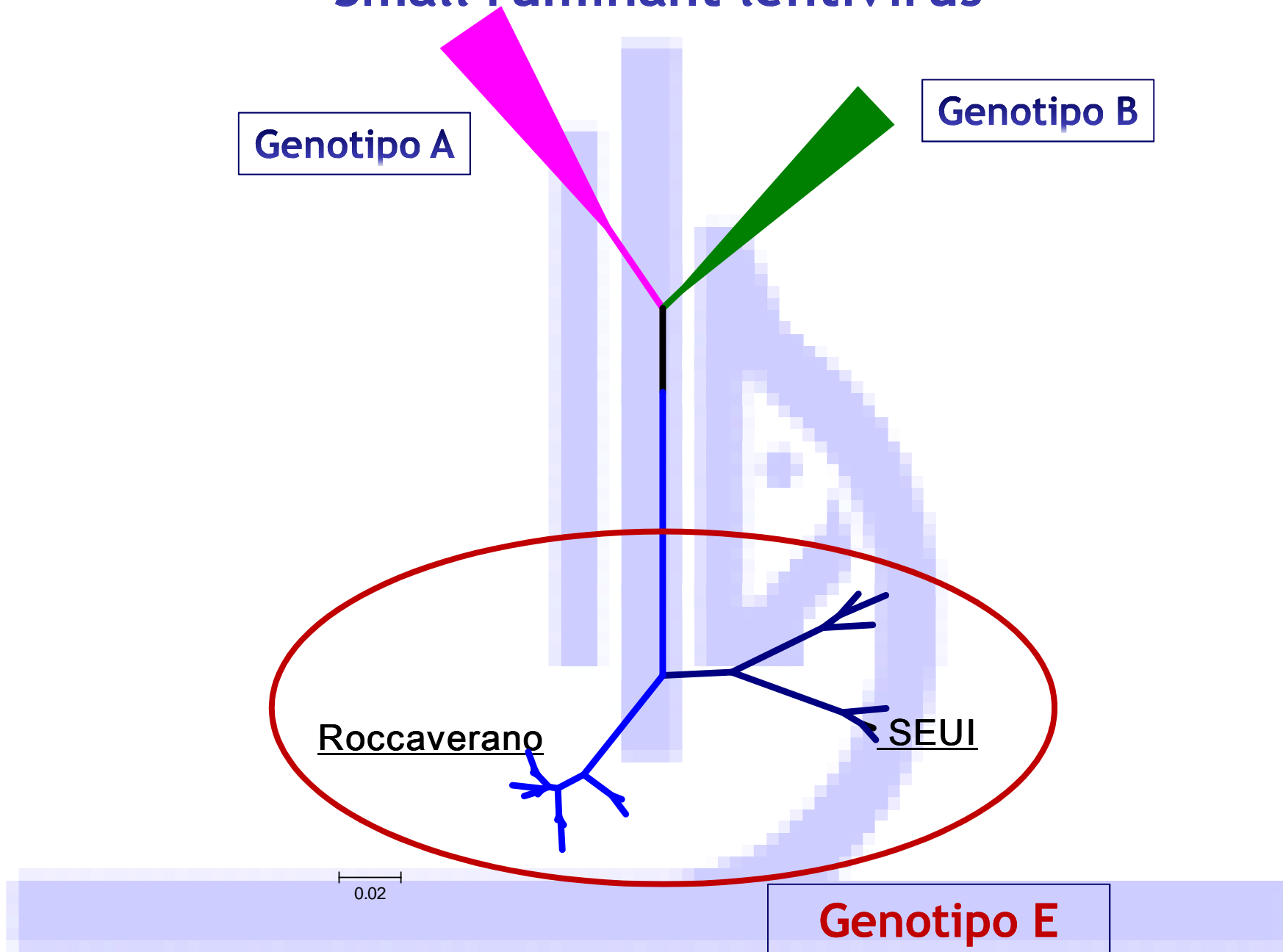
# Small ruminant lentivirus



# Small ruminant lentivirus

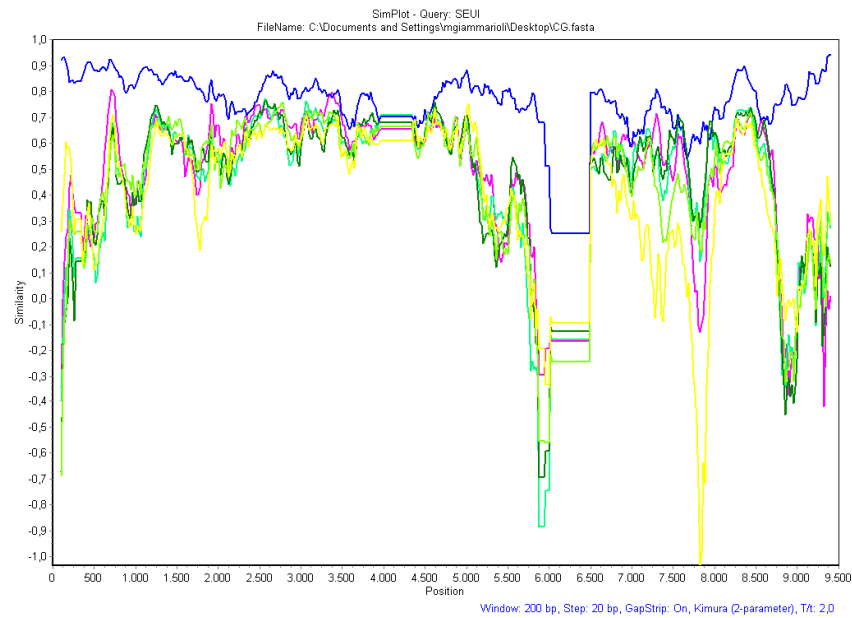


# Small ruminant lentivirus

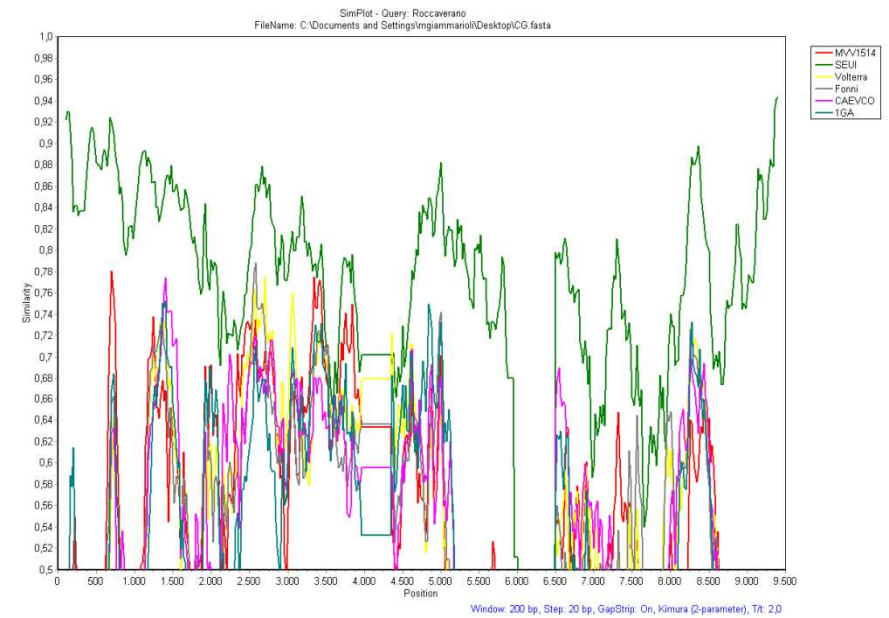


# Similarity plot - genotipo E

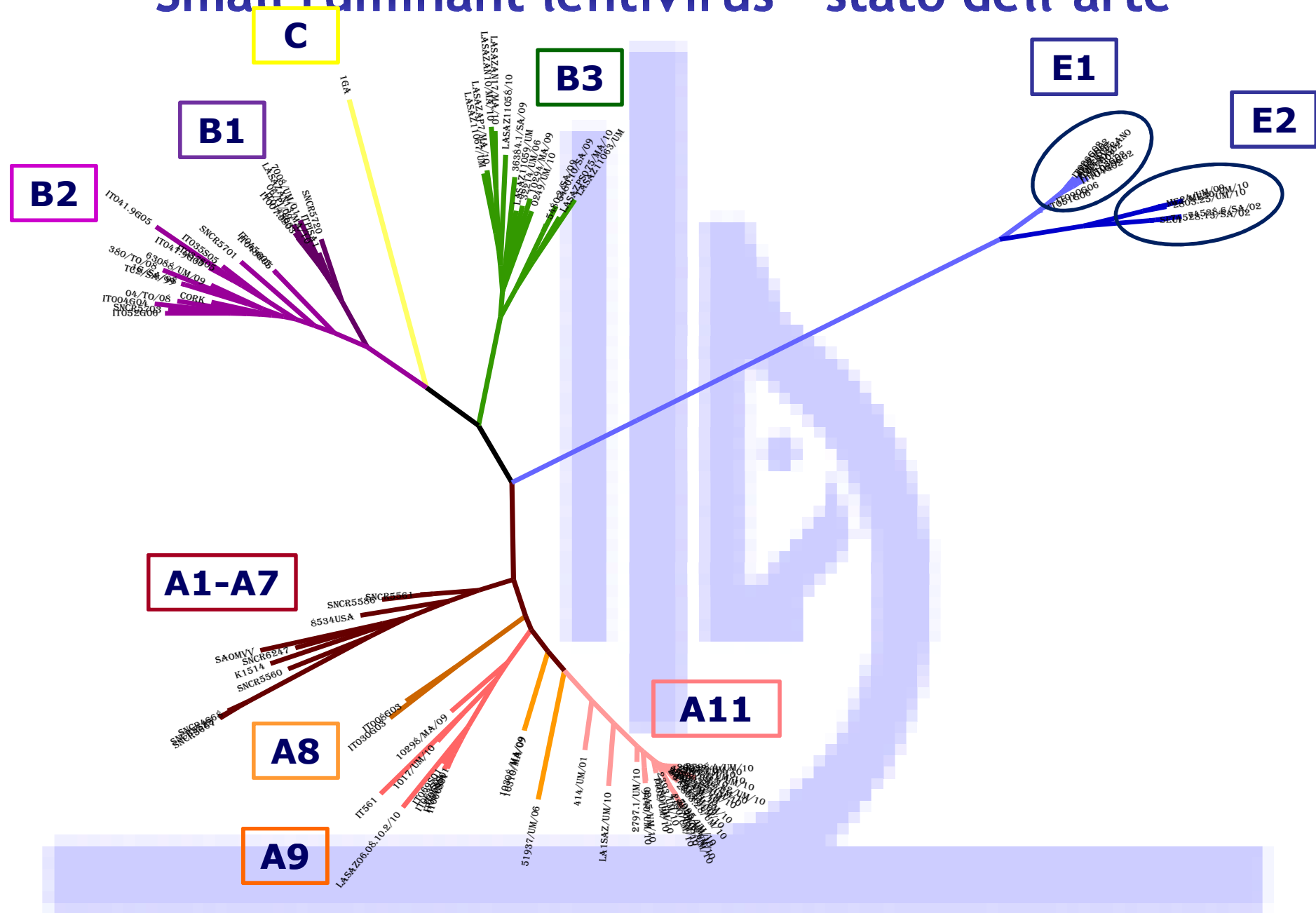
**SEUI**



**Roccaverano**

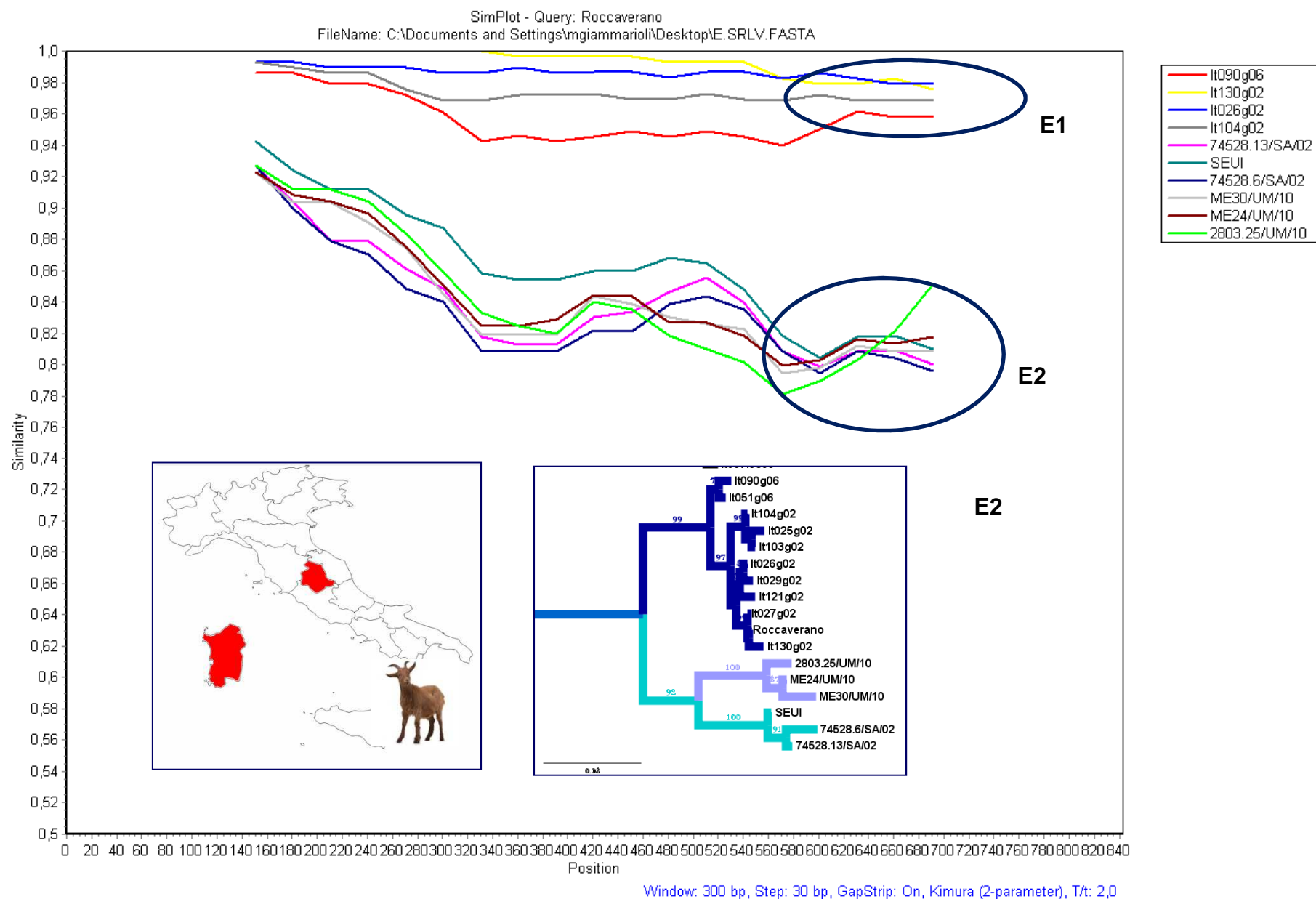


# Small ruminant lentivirus - stato dell'arte



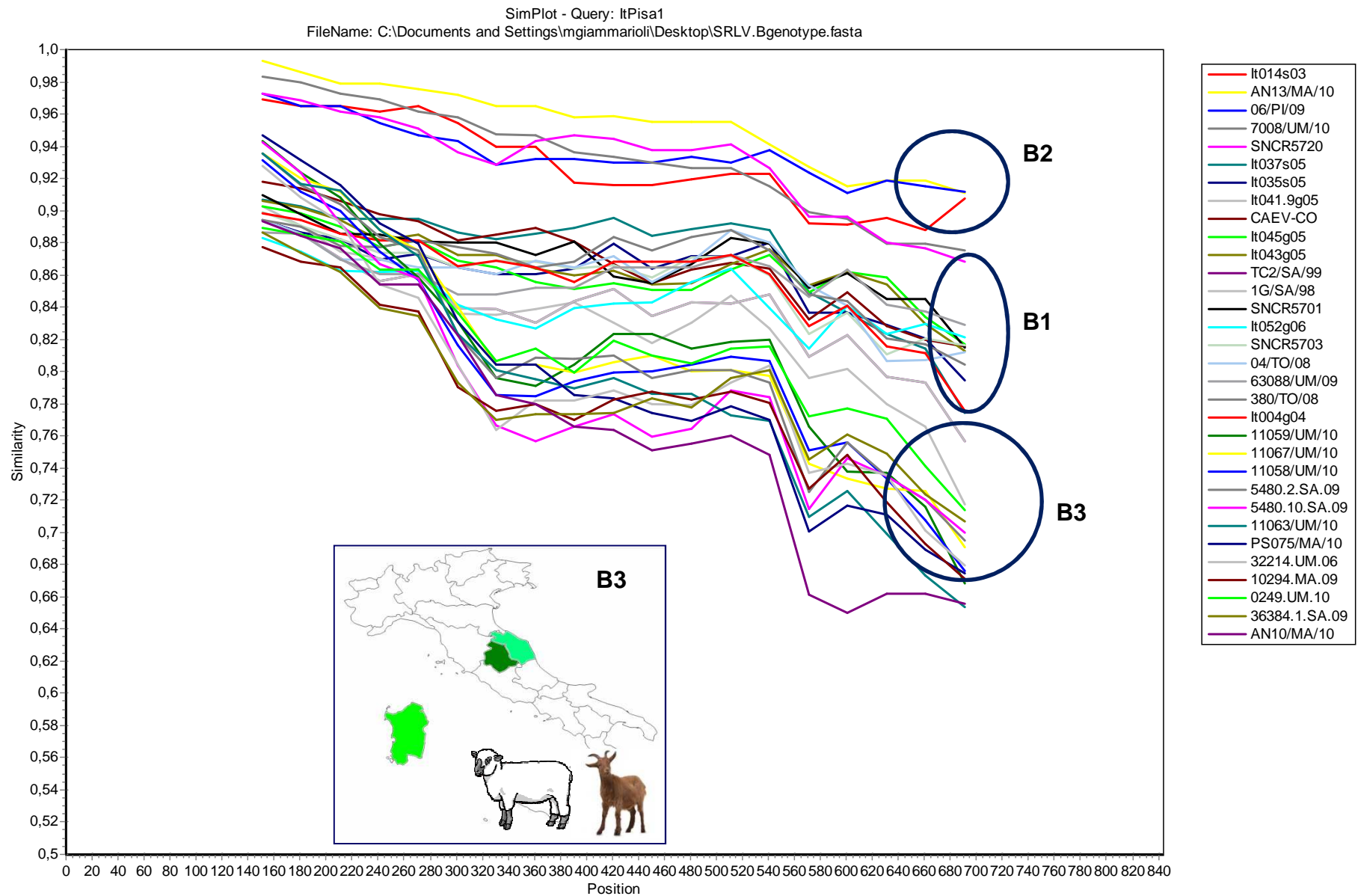
**Aggiornamento sulle *Lentivirusi* dei piccoli ruminanti, 6 ottobre 2011, Sez. Firenze**

# genotipo E - *stato dell'arte*



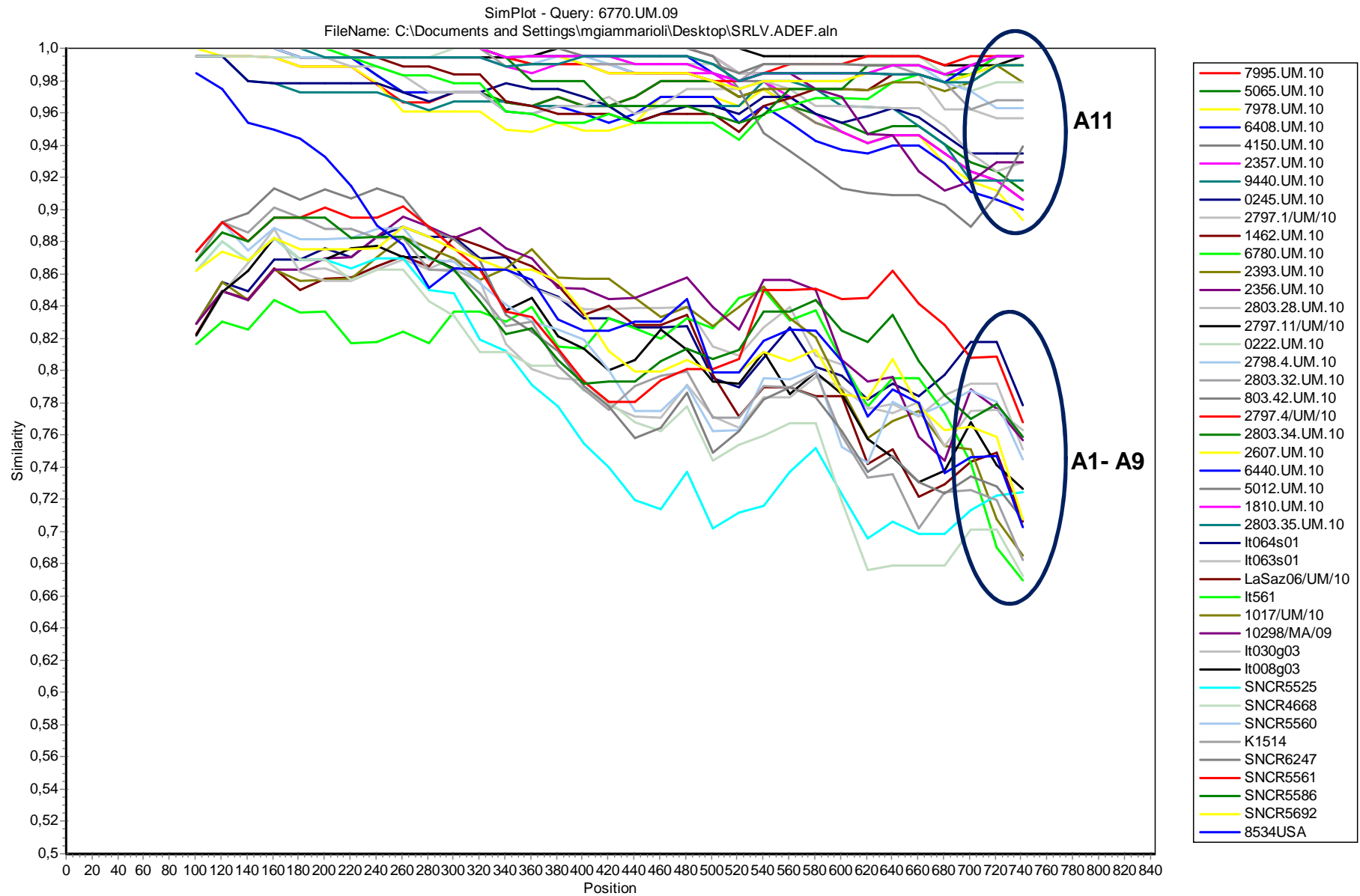


# genotipo B - *stato dell'arte*



Window: 300 bp, Step: 30 bp, GapStrip: On, Kimura (2-parameter), T/t: 2,0

# genotipo A - *stato dell'arte*



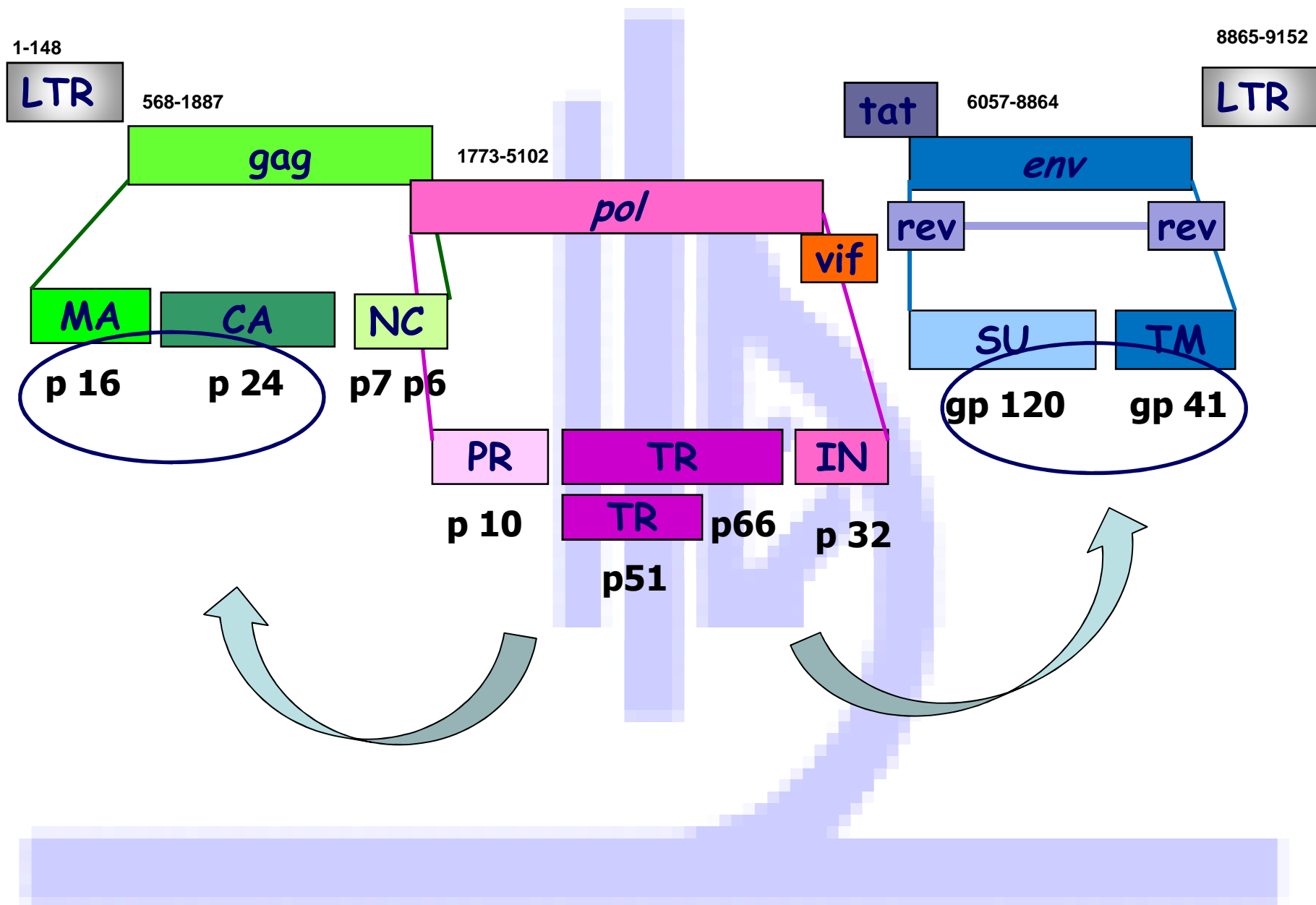
**C**



**Aggiornamento sulle *Lentiviro*si dei piccoli ruminanti, 6 ottobre 2011, Sez. Firenze**



# Organizzazione genoma SRLV



# Variabilità genetica- gag protein

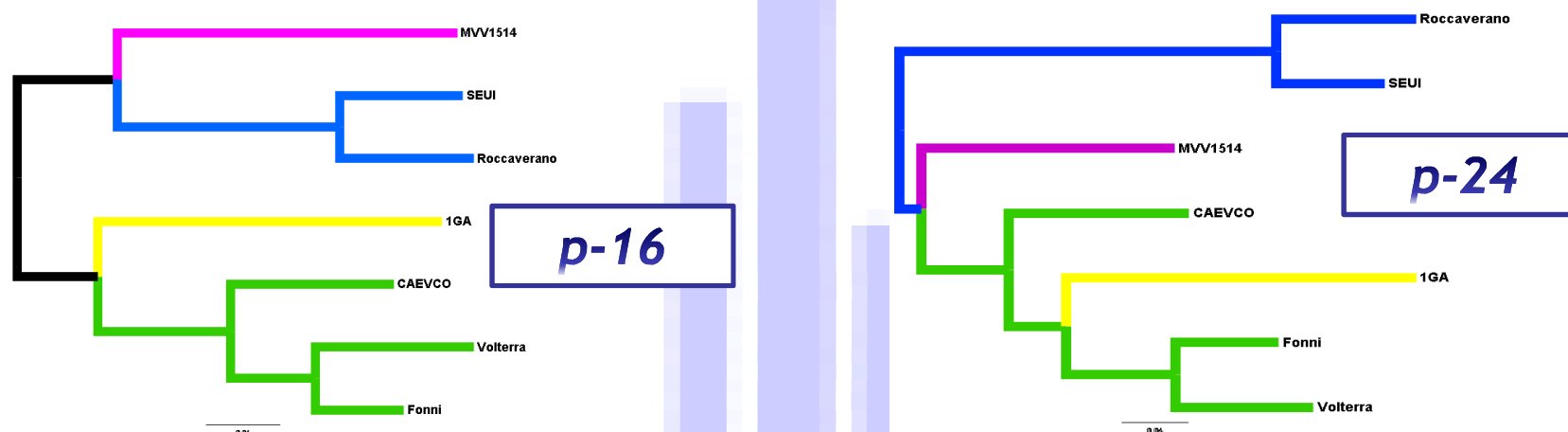
	10	20	30	40	50	60	70	80
MVV1514	HKSNTGKEAAVVR	LARDMAK	GSKEKKG	PELKEVIR	ATCKIRVGP	GKETL	TEGNCLWALK	TIDFIFEDLKTETWTITKMY
SEUI	D.NS..RKT..X	..DGR..	..EKC..	R..KT.A..	..C..L..	..SRE..	..QK..LL	
Volterra	RHTC.VRKT..N	D..R.V.GG.RD	..EKC..	LA..K.RARG.H	..C..L..YM..	EY.E..	KL.F..	
Roccaver	D..S..RKT..X	K..DGR..	..EKC..	KA..T.V..	..C..L..L..	NNRE..	MQE.LL	
Fonni	EHTS.EXKT..S	D..R.V.GG.RD	..EKC..	KA.R.K.RVRG.H	..C..L..YM..	H.E..	KL.F..	
CAEVCO	YN..VRKS.M.S	D..R.V.GG.RD	..EKC..	HA..K.RLRG.H	..C..L..YM..	H.E..	KV.FR	
IGA	GIDSVVXKS..S	D..VR.A.GRG.E	..CL	KA..K.RA.G.R	..CI	LECMY..	CRE..PE.CK	
	80	90	100	110	120	130	140	150
MVV1514	MYTVWDRLKGLTP	EETSKREFASLQ	ATLACIMCSQ	GMKPETVQA	AKGIISM	EGLHENKEAKGEK	VEQIYPNLEKHRE	VY
SEUI	LLAC.NK.RSM..	KE.QKD.V..I	GLI..E	..R..LA..	DEQEAQEKKEEK	PEYP	X.DELKKA	
Volterra	F.K..QK..	..SN.KDY..	GL.T..	..XLGD	LATVT..D.VL.QE	REK.XEX	X.IQXX	
Roccaver	LLAC.NK.RSM..	E.RKD.V..I	GLI.CNI	..LA..	DEREAQEKKEEK	PCYP	X.DELQKA	
Fonni	F.K..QK..E..	..SN.KDY..	GL.T..	..LGD	IATVT..D.VL.QG	KEK..EX	X.IQXX	
CAEVCO	FR.I.QKV.N..	..SN.KD.M..	GL.C..	R..L.D	MATVI..D..L.QE	K.ED.FX	XKEEEX	F
IGA	CKQL.KK..QVE	..S..ADYN..K	..G.V.V..	Q..L.D	IATLN..	EDX..XVKG.EKPSX	X..KXXI	
	160	170	180	190	200	210	220	230
MVV1514	VYIVNLQAGG	LSWKAVE	SVVFQQLQ	TVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKD	ILEVLAMMPGN	RAQKELIQGKLNEEAE
SEUI	A..Q..	..PT..T..N	..X.X..	..IS..	..L..	..V..M..E..K..		
Volterra	..LVQAG..G	..D..I..	..X.X..	..IS..	..L..	..V..D..K..		
Roccaver	A..Q..	..PT..T..N	..X.X..	..IS..	..L..	..V..D..K..		
Fonni	..VQAG..	..D..I..	..X.X..	..IS..	..L..	..V..D..K..		
CAEVCO	..F..VQA..	..D..M..	..X.X..	..IS..	..L..	..V..D..K..		
IGA	I..LVQAG..A	R..PAT..	..E..	..IS..	..L..	..V..D..K..		
	240	250	260	270	280	290	300	310
MVV1514	EFWVRQNPPGP	~NVTVDQIMGV	QGTNQASQAN	MDQARQICLQ	WVITALRSVR	HMSHRPGN	PMLVH	QKNTESYE
SEUI	..T.M..QP..GG	..I..N..H..A..S..	..H..A..L..	..NT..	..PQ..A..V..			
Volterra	..R.N..PAAGGG	..A.A..S..A..A..	..S..A..A..	..NT..	..VN..N..V..			
Roccaver	..T.M..QP..GG	..N..H..A..S..	..H..A..L..K..	..NT..	..PQ..A..E..			
Fonni	..R.N..PAAGGG	..A.A..S..I..A..A..	..S..I..A..A..	..I..	..TN..P..A..			
CAEVCO	..R.N..P.AGGG	..A.A..N..A..A..	..N..A..A..	..I..G..A..	..F..PN..N..E..A..			
IGA	..R..QPA..GG	..A.A..A.A..	..A.A..I..G..A..	..F..PN..N..E..A..				
	320	330	340	350	360	370	380	390
MVV1514	LLEAIDAEP	TDPIKTYL	KVTL	SYTNASTDCQ	KQMDRT	GTRVQQAT	EEKMQACRDV	GSEGFKMQLLAQAL
SEUI	..AA..E..L..	..N.E..QKV	..NKA.TS..	..L..E.E.STY..	..X-XTGRKE			
Volterra	..Q..E..L..	..N.E..QKV	..NKA.TS..	..L..E.E.STY..	..XXQ.PQNR			
Roccaver	..AA..E..L..	..N.E..QKV	..NKA.TS..	..L..E.E.STY..	..X-XQG.RD			
Fonni	..Q..E..L..	..N.E..QKV	..NKA.TS..	..L..E.E.STY..	..D..XXQR.L.Q			
CAEVCO	..Q..D..L..	..A..NSE..H..V	..Q..S..	..I..GTAYQ	..XX..GKGN			
IGA	..V..Q..E..	..NSE..H..V	..Q..S..	..I..GTAYQ	..XX..EDG..			

Prot.matrice  
MA  
p16

Prot.capside  
CA  
p24



# Variabilità genetica- *p-16* e *P24*



Percentuale di similarità della *gag* protein

	MVV1514	SEUI	Volterra	Roccav.	Fonni	CAEVCO	1GA
<b>MVV1514</b>	ID	67,70	71,00	68,10	70,90	71,70	66,10
<b>SEUI</b>	67,70	ID	65,90	86,70	67,70	68,00	64,50
<b>Volterra</b>	71,00	65,90	ID	65,40	86,90	78,70	71,80
<b>Roccav.</b>	68,10	86,70	65,40	ID	66,20	67,70	65,40
<b>Fonni</b>	70,90	67,70	86,90	66,20	ID	80,90	73,40
<b>CAEVCO</b>	71,70	68,00	78,70	67,70	80,90	ID	73,30
<b>1GA</b>	66,10	64,50	71,80	65,40	73,40	73,30	ID

# Variabilità genetica- *env* protein

		10	20	30	40	50	60	70	80	90			
MV1514	GSCS*	KKLWLQ	AMPRLG	PKPSKKXX	EL**AC	LQWP	AKKVSQ	AEQGET	WSPHSEKHG	IKYYRS**KDN	RRKKNS	RDWYQ	VRKNHG*
SEUI	QX	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Volterra	QGA.DSA..	M.DV..	M.NLIR	IGYEL	TVNKM	N*L*IKK	IL*NX	~	~	~	~	~	~
Roccaveran	QX	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Fonni	QGAGDSG..	M.I..	GM.NLIT	T..	NV*I..	I..	KN*L*IKK	IL*NX	~	~	~	~	~
CAEVCO	QGACD*G..	M.T..	GV.NII	.G..	XIN.NK	CN*QV	AKVSV	LDX	~	~	~	~	~
IGA	HGAGDSAV.	MS.....	E*LII	..	~	~	~	~	~	~	~	~	~

gp 120

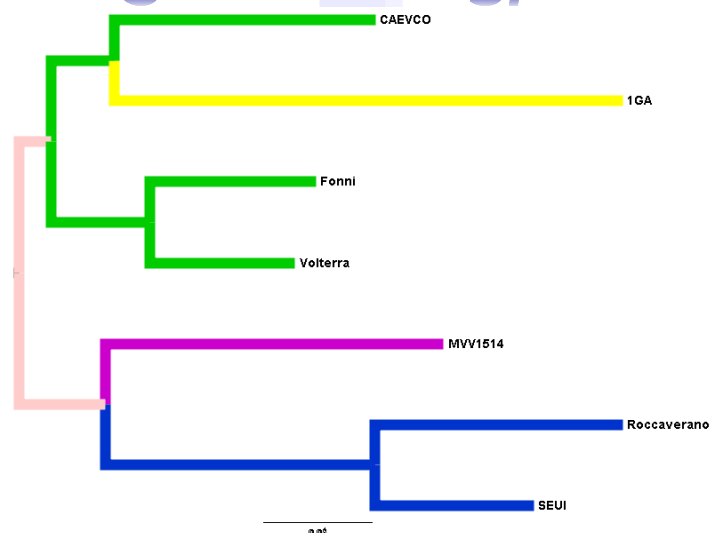
	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
MV1514	QVRKNHG*VLTSWGQKEK	LRR*IYX~GTM*KVVCTGGMGGIVGAANC	CVVGMSHV	GSEKRKPV	SSRRSDS	IGE*SWR	SEGAARRN			
SEUI	~	~	~	~	~	~	~	GGIYNLSVR	LW	*AHTG.DQ
Volterra	~	.TITRKTAXRQ.KYR.KVSED.LNG..TVCQIY.	~	XDRV..NTINIM.ITLYTN	NEX~X	*WG.IYHLNKRPI.	*SRKKCLR			
Roccaveran	~	~	~	~	~	~	~	..IHNY.IG.L.		*THMGCDQ
Fonni	~	.ALAXXRTXDK.KYTRIVS	~	~	.TICQ..~	XARVM.NTIS.MDITLYTN	TEX~X	*RG.IYHFNK*.IWY	.ASKKCNR	
CAEVCO	KE..RE.FTAGQQ.KYQPOVSKQ.GNRN.NPCFAYK	~	XDIPMEDITNN.DIARDKYVCX	~	~	~	~	~	~	~
IGA	~	XATNX~	Q.KYK.OVS	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	~	~	~	~						

gp 41

	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
MVV1514	GAARRNSACDLCD	EKFHSMGMS	TRGGLSRS	*TGV*KYI*GNLRGS	*TRLALEYLSLAFMA	NGKYEAM	DERK	*KGV	*GKNKQNEGR	
SEUI	HTG.DQC.RN...	EL.AV..B...	SIP..RERIQE	KQ.DI...	**DM..AHVP..L...	D.E..GLGGA	SAKQ	*NQTRX		
Volterra	RRKKLRHTSN..N	GVQ*...ATRC..*	CNR.*C.SRHIKR	LSGK..M.HI...V...	D...CKGV..TE*EQI	QN.K**.*K				
Roccaverar	HMGCDQCTSN..N	...TV...S.VP	PTKR*E.EHRHIGR	**D..MAD...L...	D...QH...GRAESA	*DSASX				
Fonni	SKKCNRGTRH..N	RI**...ATW..P	PERRIQEC	P*DTQR..LR...V..P..V...	D...EQQR..DA.QSR	*E.KQHDK..				
CAEVCO	HKKCVWGTS...N	RIRK...TRSV*	RNRIQ.CES.SSER	SRE..M..I...SL	EC*VLVK..YAR	ESTEK.*YKRG				
IGA	REKCVR.T.N...	RI**V...ANRS	P.PRLRIQ..K*R	I...S...V....I...	*CST.GKA.FT..PQKG					

	240	250	260	270	280	290	300	310	320												
MVV1514	KQ	EGRYR*	SGSR	RKNK	KILCA	ISLC	FTTM*	GVVLV	~	IY*	SRXX	RTC*	KNKN	KLH	SKS	SFLY	RKNAL	SSSP	AGIL	GKRG*	RKHE
SEUI	RX	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Volterra	**	*	KN.	*FTGG.	D*	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Roccaveran	SX	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Fonni	QHDK.	N.	*A.	A..D*	BQV.	L.	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
CAEVCO	*	YKRG.	GII.	NY.	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
IGA	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~

# Variabilità genetica- *gp120* e *gp41*<sup>TM</sup>



## Percentuale di similarità della *env* protein

	MVV1514	SEUI	Volterra	Roccav.	Fonni	CAEVCO	1GA
<b>MVV1514</b>	ID	54.70	65.30	52.60	65.20	62.40	53.00
<b>SEUI</b>	54.70	ID	56.50	76.10	58.00	55.00	52.20
<b>Volterra</b>	65.30	56.50	ID	54.70	79.50	70.20	58.00
<b>Roccav.</b>	52.60	76.10	54.70	ID	55.50	54.40	51.70
<b>Fonni</b>	65.20	58.00	79.50	55.50	ID	69.20	58.10
<b>CAEVCO</b>	62.40	55.00	70.20	54.40	69.20	ID	57.30
<b>1GA</b>	53.00	52.20	58.00	51.70	58.10	57.30	ID

# Considerazioni

Studio della variabilità genetica è fondamentale

- Può influenzare la diagnosi diretta
- Può influenzare la diagnosi indiretta

**Quanto e quando la variabilità genetica influenza i test diagnostici attualmente in uso ?**



**grazie per l'attenzione**

**Aggiornamento sulle *Lentivirus* dei piccoli ruminanti, 6 ottobre 2011, Sez. Firenze**